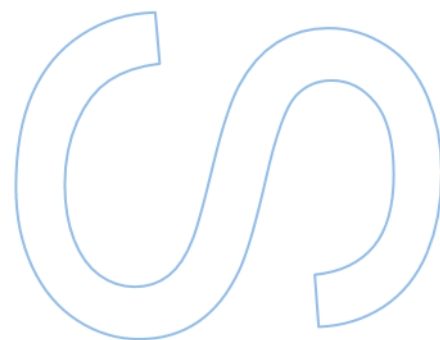
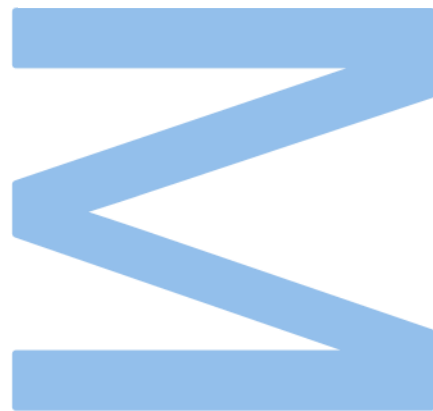
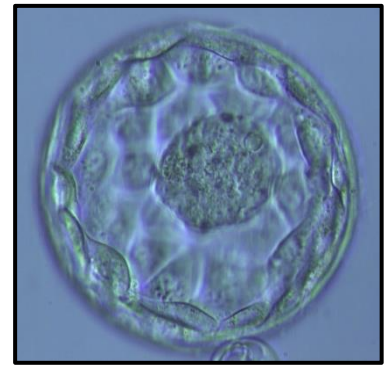


Blastocistos de Dia 5 e de Dia 6: Uma comparação de parâmetros laboratoriais e clínicos

Ana Beatriz Bessa Carvalho

Relatório de Estágio realizado no âmbito do mestrado em
Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2024





Blastocistos de Dia 5 e de Dia 6: Uma comparação de parâmetros laboratoriais e clínicos

Ana Beatriz Bessa Carvalho

Relatório de Estágio realizado no âmbito do mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2024

Orientador

Luís Filipe Costa de Castro, Professor Auxiliar, FCUP

Coorientador

Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Professor Auxiliar, FCUP

Supervisor externo na Entidade de Acolhimento

Maria Sofia Pinto Gama Lobo Xavier, Diretora de Laboratório, CHUSJ
Ione Gonçalves Tavares Reis, Embriologista Clínica, CHUSJ



SÃO JOÃO



Agradecimentos

A realização deste relatório de estágio não seria possível sem o apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Professor José Américo Sousa, diretor do Mestrado em Biologia Celular e Molecular, pela constante disponibilidade e acompanhamento durante estes dois anos.

Agradeço também aos Professores Luís Filipe Castro e Vasco Almeida pela oportunidade de concretização deste projeto e por me terem introduzido ao mundo incrível da Reprodução Medicamente Assistida.

Um muito obrigada às minhas supervisoras, Sofia Xavier e Yone Reis, pela orientação contínua, disponibilidade, incentivo e, acima de tudo, pela oportunidade de desenvolver este estágio. Obrigada também à restante equipa de biólogas, Renata Leite, Beatriz Vieira, Ana Patrícia Martins e Maria Garcia, por todo o conhecimento e conselhos partilhados comigo. Este tempo passado convosco permitiu-me aprender e crescer enquanto pessoa e cientista, sem nunca faltarem momentos de descontração e convívio.

Um agradecimento especial à restante equipa do CRI-MR por me receberem de braços abertos e me acolherem com a vossa constante boa disposição. Foi um prazer trabalhar convosco e vou certamente sentir saudades.

Um obrigada gigante aos meus amigos. As vossas brincadeiras e conversas animaram-me quando mais precisei e permitiram-me continuar nas alturas mais difíceis. E ao Pedro, por teres estado presente durante todo o meu percurso. O teu apoio incondicional permitiu-me chegar onde estou hoje.

Por fim, um enorme obrigada aos meus pais e irmã, por todo o apoio e, principalmente, por não me deixarem duvidar de mim mesma. Esta vitória é tão vossa como minha.

Resumo

Atualmente existe uma ausência de consenso quanto ao potencial de blastocistos de dia 6, com ritmo de desenvolvimento lento, relativamente a blastocistos de dia 5. Particularmente, não está claramente evidenciada a prioridade que se deve dar a um ritmo de desenvolvimento normal relativamente a uma boa qualidade embrionária aquando da seleção destes blastocistos para transferência.

Assim, no presente relatório de estágio pretendeu-se obter um melhor esclarecimento destas questões. Para isso, foram selecionados casos de *freeze-all* e realizada uma comparação dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6 no que respeita a parâmetros laboratoriais e clínicos.

Observou-se uma associação significativa dos blastocistos de dia 5 a qualidades embrionárias superiores e, conseqüentemente, a um maior aproveitamento embrionário, relativamente a blastocistos de dia 6. Clinicamente, verificou-se uma tendência de resultados clínicos superiores associados a blastocistos de dia 5 comparativamente a blastocistos de dia 6, que se mantém mesmo quando estes apresentam pior qualidade.

Este estudo sugere assim que o ritmo de desenvolvimento embrionário poderá ter mais impacto nos resultados clínicos comparativamente à qualidade embrionária e que deverá ser tido em conta prioritariamente aquando da seleção de um embrião para transferência. Este maior impacto do ritmo de desenvolvimento pode dever-se à sua associação com a ploidia dos embriões, hipótese que deverá ser explorada no futuro. Este estudo sublinha ainda a necessidade de se desenvolverem estudos com uma maior amostragem, para uma confirmação significativa das tendências aqui registadas.

Palavras-chave: Procriação medicamente assistida, transferência embrionária, ritmo de desenvolvimento, blastocisto, qualidade embrionária.

Abstract

Currently, there is no consensus regarding the potential of day 6 blastocysts, with a slow developmental rate, compared to day 5 blastocysts. Specifically, it has not been clearly established the priority that should be given to developmental rate comparatively to embryo quality when selecting an embryo for transfer.

Therefore, the present internship report aimed to shed more light on these questions. To do so, *freeze-all* cases were selected, and a comparison was made between day 5 and day 6 blastocysts in terms of laboratory and clinical parameters.

In fact, day 5 blastocysts were significantly associated with higher quality compared to day 6 blastocysts. Clinically, although it was not possible to draw robust statistical conclusions due to the limited sample size, day 5 blastocysts seemed to be associated with superior clinical outcomes compared to day 6 blastocysts. This trend was registered even when comparing low-quality day 5 blastocysts with high-quality day 6 blastocysts.

Thus, this study suggests that embryo developmental rate may have a greater impact on clinical outcomes compared to embryo quality, and it should be prioritized when selecting an embryo for transfer. This greatest impact of the development rate may be due to its association with embryo ploidy, which should be explored in the future. In addition, this study highlights the need for future studies with larger sample sizes to confirm the significant trends observed in this report.

Keywords: Assisted reproduction technology, embryo transfer, developmental rate, blastocyst, embryo quality.

Índice

Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
Introdução	1
1. Infertilidade	1
1.1 Conceitos e Estimativas	1
1.2 Avaliação da Infertilidade.....	2
1.3 Fator Feminino	2
1.3.1 Fator ovulatório.....	2
1.3.2 Fator cervical	3
1.3.3 Fator uterino	3
1.3.4 Fator tubo-peritoneal.....	3
1.4 Fator Masculino	4
1.5 Causa Idiopática.....	5
1.6 Influência da Idade, Estilo de Vida e Fatores Ambientais	5
2. Procriação Medicamente Assistida.....	8
2.1 Conceitos e Estimativas	8
2.2 Inseminação Intrauterina	9
2.3 Fertilização <i>in vitro</i>	10
2.3.1 Fertilização <i>in vitro</i> Convencional.....	10
2.3.2 Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides	11
2.4 Fecundação e Desenvolvimento Embrionário	13
2.4.1 Fecundação	13
2.4.2 Dia 3 e Dia 4 de Desenvolvimento Embrionário.....	14
2.4.3 Dia 5,6 e 7 de Desenvolvimento Embrionário	16
2.5 Cultura e Monitorização Embrionária	17
2.6 Qualidade embrionária.....	18

2.6.1	<i>Sistema ASEBIR</i>	19
	<i>Avaliação morfológica do ovócito – Dia 0</i>	19
	<i>Avaliação morfológica do zigoto – Dia 1</i>	20
	<i>Avaliação morfológica do embrião em fase de clivagem – Dia 2 e 3</i>	22
	<i>Avaliação morfológica do embrião em fase de mórula – Dia 4</i>	23
	<i>Avaliação morfológica do embrião em fase de blastocisto – Dia 5 e 6</i>	24
2.7	Aproveitamento Embrionário.....	26
2.7.1	Criopreservação	26
2.7.2	Transferência Embrionária	28
	Materiais e Métodos	31
1.	Processamento laboratorial.....	31
1.1.	Recuperação e processamento dos gametas femininos.....	31
1.2.	Processamento dos gametas masculinos.....	32
1.3.	Procedimento de cFIV	32
1.4.	Procedimento de ICSI.....	33
1.5.	Fecundação e Desenvolvimento Embrionário.....	33
1.6.	Criopreservação e Descongelação Embrionária	34
1.7.	Transferência Embrionária	35
1.8.	Acompanhamento pós-transferência	35
2.	Processamento Estatístico	36
	Resultados	39
1.	Análise Descritiva da População	39
2.	Parâmetros laboratoriais	41
2.1.	Fecundação.....	41
2.2.	Desenvolvimento Embrionário	46
2.3.	Qualidade Embrionária	50
3.	Parâmetros Clínicos	54
	Discussão	58
	Conclusão	66

Perspetivas futuras	68
Referências Bibliográficas	69

Lista de Tabelas

Tabela 1. Distribuição das mulheres consideradas para estudo por três grupos de idade.....	39
Tabela 2. Análise da associação entre o dia de desenvolvimento dos blastocistos e a qualidade morfológica por regressão logística ordinal.....	51
Tabela 3. Contribuição dos blastocistos de dia 5 e de dia 6 para uma gravidez bioquímica negativa e positiva.	54
Tabela 4. Contribuição de blastocistos de qualidade AB e C para uma gravidez bioquímica negativa e positiva.	55
Tabela 5. Contribuição dos blastocistos de dia 5 e de dia 6 para uma gravidez clínica negativa e positiva.	55
Tabela 6. Contribuição de blastocistos de qualidade AB e C para uma gravidez clínica negativa e positiva.	56

Lista de Figuras

Figura 1. Representação gráfica de cFIV	11
Figura 2. (A) Captação fotográfica do complexo <i>cumulus</i> - <i>coroa radiata</i> - ovócito (CCO) antes do processo de desnudação. (B) Captação fotográfica de um ovócito em metáfase II, após processo de desnudação.....	12
Figura 3. (A) Representação gráfica de ICSI. (B) Captação fotográfica de ICSI, cedida pelo CRI-MR do CHUSJ	13
Figura 4. Representação gráfica de um blastocisto.	16
Figura 5. (A) Captação fotográfica de um zigoto com 2 PN e 2 GP. (B) Captação fotográfica de um zigoto com 3 PN	21
Figura 6. (A) Captação fotográfica de um embrião ao dia 2 de desenvolvimento, com 4 blastómeros simétricos e de tamanho normal, sem presença de fragmentação, vacuolização ou multinucleação. (B) Captação fotográfica de um embrião ao dia 3 de desenvolvimento, com 7 blastómeros simétricos e de tamanho normal, sem aparente presença de fragmentação, vacuolização ou multinucleação.....	23
Figura 7. Captação fotográfica de um embrião ao dia 4 de desenvolvimento, em fase de mórula, apresentando uma estrutura compacta com células achatadas e pouco definidas.	24
Figura 8. Captação fotográfica de um embrião ao dia 5 de desenvolvimento, em fase de blastocisto.....	25
Figura 9. Classificação ASEBIR de blastocistos de dia 5 e de dia 6.	26
Figura 10. Frequência dos fatores de infertilidade nos casos selecionados.....	39
Figura 11. Diagrama de Venn representativo do número de casos com fatores de infertilidade femininos, fator de infertilidade masculino e infertilidade inexplicada.	40
Figura 12. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para os diferentes grupos etários em estudo.....	41
Figura 13. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para os diferentes grupos de fatores de infertilidade.	42
Figura 14. Diagrama de Venn que expõe a relação entre o número de casos em que se realizou cFIV e o número de casos em que se realizou ICSI.	43
Figura 15. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para as diferentes técnicas, cFIV e ICSI.	44
Figura 16. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para as diferentes técnicas, cFIV e ICSI, em função do grupo etário.	44

Figura 17. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para as diferentes técnicas de inseminação, cFIV e ICSI, em casos de ausência de fator de infertilidade masculino.	45
Figura 18. Boxplot relativo à distribuição da taxa de blastocistos para os diferentes grupos etários da mulher.	46
Figura 19. Boxplot relativo à distribuição da taxa de blastocistos para as diferentes técnicas de inseminação.	47
Figura 20. Boxplot relativo à distribuição da taxa de blastocistos para as diferentes técnicas de inseminação em função do grupo etário da mulher.	48
Figura 21. Boxplot relativo à percentagem de blastocistos de dia 6 para os diferentes grupos etários da mulher.	49
Figura 22. Boxplot relativo à percentagem de blastocistos de dia 6 para as diferentes técnicas de inseminação.	49
Figura 23. Boxplot relativo à distribuição da percentagem de blastocistos de dia 6 para as diferentes técnicas de inseminação em função do grupo etário da mulher.	50
Figura 24. Distribuição percentual da qualidade embrionária dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6.	51
Figura 25. Distribuição percentual da qualidade embrionária dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6, por grupo etário.	52
Figura 26. Distribuição percentual da qualidade embrionária dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6, por técnica de inseminação.	53
Figura 27. Distribuição do número de blastocistos transferidos de dia 5 e dia 6 em função do grupo etário e da qualidade embrionária (AB e C).	54

Lista de Abreviaturas

ASEBIR	ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN
CCO	CUMULUS OOPHORUS- COROA RADIATA- OVÓCITO
CFIV	FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> CONVENCIONAL
CHUSJ	CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DE SÃO JOÃO
CPN	CORPOS PRECURSORES NUCLEARES
CRI-MR	CENTRO DE RESPONSABILIDADE INTEGRADA - MEDICINA DA REPRODUÇÃO
FIV	FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i>
GNRH	HORMONA LIBERTADORA DE GONADOTROFINAS
GP	GLÓBULO POLAR
HCG	HORMONA CORIÓNICA HUMANA
ICSI	INJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDE
IUI	INSEMINAÇÃO INTRA UTERINA
MCI	MASSA CELULAR INTERNA
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE
PGT	TESTE GENÉTICO DE PRÉ-IMPLANTAÇÃO (<i>PREIMPLANTATION GENETIC TESTING</i>)
PMA	PROCREAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA
PN	PRONÚCLEOS
RPM	ROTAÇÕES POR MINUTO
SPM	MEIO DE PREPARAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
TEC	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES CRIOPRESERVADOS
TESE	EXTRAÇÃO TESTICULAR DE ESPERMATOZOIDES
TE	TROFOECTODERME

Introdução

1. Infertilidade

1.1 Conceitos e Estimativas

A infertilidade é uma doença do sistema reprodutor definida pela incapacidade de obter uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e desprotegidas (1).

A infertilidade é considerada primária se o casal nunca obteve uma gravidez clínica, e é considerada secundária se o casal conseguiu uma gravidez clínica anteriormente, ainda que esta tenha resultado em gravidez ectópica ou aborto (1).

Foi estimado que, ao longo da sua vida, 9,6% e 6,5% da população experienciou infertilidade primária e secundária, respetivamente (2). *Mascarenhas et al.* reportou diferenças de prevalência regional, em particular valores mais altos de infertilidade primária em países desenvolvidos e de infertilidade secundária em países em desenvolvimento. Estas estimativas apresentam uma certa relevância etiológica, uma vez que altas taxas de infertilidade secundária estão associadas a infeções patológicas nomeadamente no pós-parto ou transmitidas sexualmente (3, 4). No entanto, estas estimativas baseiam-se em estudos que variam muito em número e abordagem assinalando uma falta de consistência e uma necessidade de os sistematizar, nomeadamente nos critérios de inclusão/exclusão para infertilidade (5).

A infertilidade é uma condição que afeta tanto o indivíduo como o casal e implica consequências na sua saúde física, psicológica e emocional. De facto, parece claro que tanto mulheres como homens inférteis apresentam taxas superiores de disfunções sexuais e de doenças psicológicas, como a depressão e ansiedade, relativamente a mulheres e homens férteis, independentemente da região geográfica. Isto deve-se nomeadamente ao sentimento de insucesso no que toca ao cumprimento do planeamento familiar (6-10).

Para além disso, foi demonstrado que o stress e as preocupações sociais associados à infertilidade são mais severos nas mulheres inférteis do que nos homens inférteis. Isto advém do facto de, em diversas culturas, a fertilidade ser parte da identidade da mulher e esta ser, portanto, submetida a uma maior pressão psicológica (6, 11-13).

Assim, a grande prevalência da infertilidade e o seu impacto na vida de um casal assinalam a pertinência da sua abordagem e a necessidade de desenvolver tratamentos que consigam responder às necessidades dos doentes.

1.2 Avaliação da Infertilidade

O período de avaliação da infertilidade é um período de stress na vida de um casal infértil. Esta avaliação engloba o conhecimento não só do historial reprodutivo do casal, mas também da sua fisiologia reprodutiva, de modo a identificar a causa da infertilidade (1, 2).

A causa da infertilidade de um casal pode ser idiopática, feminina ou masculina, sendo comum, no mesmo casal, a combinação das duas últimas (1).

Aproximadamente 85% dos casais inférteis têm causa identificável, com igual percentagem de fator feminino e masculino. Já 15% têm causa idiopática (2).

1.3 Fator Feminino

A infertilidade feminina pode dever-se a diversos fatores, nomeadamente fatores ovulatórios, cervicais, uterinos e tubo-peritoneais (14).

1.3.1 Fator ovulatório

Um bom funcionamento ovulatório requer uma atividade normal por parte de diversos sistemas, especialmente na produção hormonal. Quando estes sistemas apresentam uma alteração de atividade, a função folicular é afetada, o que compromete a reserva e qualidade dos ovócitos e pode, em último caso, resultar em anovulação (14).

As disfunções ovulatórias são comuns e podem ser observadas em 15% dos casais inférteis e 40% das mulheres inférteis (16).

A causa mais comum é a síndrome dos ovários policísticos, representando 70% das mulheres com anovulação (17). Outras causas, ainda que menos predominantes, incluem as doenças da glândula pituitária e da tiróide, hiperplasia ou tumor suprarrenais, anovulação crónica idiopática e amenorreia hipotalâmica funcional. A última deriva nomeadamente de exercício físico excessivo e transtornos alimentares. De facto, mulheres com transtornos alimentares mostraram desenvolver anovulação mais frequentemente relativamente a mulheres sem transtornos alimentares (15, 18).

A ausência de ovulação é suspeita aquando de um ciclo menstrual irregular, amenorreia ou sangramento uterino anormal, e diagnosticada pela medição da progesterona basal e da temperatura corporal basal e por biópsia endometrial (19).

1.3.2 *Fator cervical*

A infertilidade associada ao fator cervical resulta de anomalias na produção de muco cervical ou na interação espermatozoides-muco cervical, que impedem a progressão dos espermatozoides para o útero (16).

Apresenta baixa predominância e está associada a um histórico de cirurgia, crioterapia ou infeções cervicais que poderão ter danificado as glândulas cervicais. A atividade anormal das glândulas leva à ausência de muco ou à alteração da sua constituição, formando assim uma barreira à passagem dos espermatozoides (14, 16).

1.3.3 *Fator uterino*

A infertilidade associada ao fator uterino é definida pela ausência de útero ou pela presença de um útero não funcional, e está intimamente relacionada com aborto recorrente (20).

A prevalência exata deste fator de infertilidade é atualmente desconhecida, havendo dificuldade em obter uma estimativa precisa devido à vasta heterogeneidade dos estudos. Assim, estudos reportaram uma prevalência que varia entre 2,1% e 16,7% das mulheres inférteis (20-22).

As causas podem ser congénitas ou adquiridas, variando entre pólipos, miomas, adenomiose e agenesia uterina. Estas anomalias interferem com a implantação do embrião no útero, nomeadamente através de um fluxo de sangue anormal, que impede o estabelecimento de uma gravidez (23, 24).

O diagnóstico é possível com recurso a diversas ferramentas, como por exemplo a histerossalpingografia e a histerossonografia (25).

1.3.4 *Fator tubo-peritoneal*

De modo a permitir a ocorrência de uma gravidez, é necessária a receção pelas trompas de Falópio do ovócito libertado do ovário e o desimpedimento dos canais que permitem a passagem dos espermatozoides para as trompas de Falópio e do ovócito fertilizado para o útero. A infertilidade associada ao fator tubo-peritoneal envolve o

bloqueio físico das trompas de Falópio e a sua incapacidade para receber o ovócito (14, 15).

Este fator feminino é um dos mais prevalentes e apresenta uma incidência de 25% a 35% dos casais inférteis (16), estando associado a endometriose e doença inflamatória pélvica (26).

O diagnóstico é feito recorrendo a histerossalpingografia, histerossonografia e, principalmente, a laparoscopia (27, 28).

1.4 Fator Masculino

A infertilidade masculina manifesta-se particularmente através de anomalias na amostra de ejaculado, não só em parâmetros macroscópicos, como o volume, pH, cor, cheiro, viscosidade e liquefação, mas também em parâmetros microscópicos, como a motilidade, morfologia e concentração (29, 30).

De modo a avaliar a anomalia associada ao fator masculino, são realizadas análises a amostras de ejaculado. Relativamente a estas análises, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu valores de referência, com o objetivo de distinguir amostras normais de amostras de casos de infertilidade (31).

Os critérios definidos pela OMS delineiam a percentagem normal de motilidade progressiva como sendo 32%. Abaixo de 32% considera-se astenozoospermia (31). A astenozoospermia é observada em 81% das amostras anormais de ejaculado, estando frequentemente associada a percentagens baixas de morfologia e concentração (32).

O limite de percentagem de morfologia normal é 4%. Abaixo de 4% considera-se teratozoospermia (31). Em amostras de ejaculado com teratozoospermia podem ser reconhecidos dois fenótipos principais, a macrozoospermia e a globozoospermia. A macrozoospermia é definida pela presença de uma grande percentagem de espermatozoides de cabeça irregular e alargada, que apresentam uma alta taxa de ploidia (33, 34). A globozoospermia é definida pela presença de uma grande percentagem de espermatozoides de cabeça redonda e com ausência de acrossoma, que apresentam incapacidade de penetração na zona pelúcida do ovócito (35).

Relativamente à concentração, o valor limiar encontra-se nos 15 milhões de espermatozoides por mililitro. Abaixo deste valor considera-se que a amostra de ejaculado apresenta oligozoospermia (31). Curiosamente, a concentração de espermatozoides nas amostras de ejaculado tem diminuído ao longo de várias décadas

(36, 37), o que reforça a contribuição crescente do fator masculino para o aumento da prevalência da infertilidade (38).

Uma amostra de ejaculado poderá apresentar apenas uma ou uma combinação destas anomalias. Casos de ausência total de espermatozoides, no ejaculado a fresco e concentrado, define-se como azoospermia (31).

Se então confirmada uma anomalia, são realizados estudos adicionais de modo a identificar a causa. As causas podem ser divididas em duas categorias: congénitas, como em casos de ausência de canais deferentes, ou adquiridas, como em casos de varicocelo. Entre 30% a 50% dos casos são idiopáticos (39-42).

Para além disso, a deteção de anomalias no ejaculado leva frequentemente à identificação de doenças e condições médicas que estão a afetar não só a fertilidade, mas a saúde e o bem-estar no geral (43).

1.5 Causa Idiopática

A causa idiopática refere-se à infertilidade que não é passível de ser explicada. O casal não apresenta um histórico de doença que afete a fertilidade e demonstra resultados normais nos exames físicos, endócrinos, genéticos e bioquímicos. Nestes casos, a infertilidade é provavelmente devida a uma alteração não detetada pelos exames atualmente em uso (44).

De facto, vários estudos defendem a possibilidade de casos de infertilidade idiopática se deverem frequentemente a causas genéticas, considerando que grande parte destas são ainda desconhecidas (45), particularmente modificações epigenéticas associadas a infertilidade masculina (46).

1.6 Influência da Idade, Estilo de Vida e Fatores Ambientais

Por motivos sociais e profissionais, os casais escolhem a maternidade em idades mais avançadas. No entanto, tal acarreta riscos, uma vez que há registos de aumento de infertilidade com o avançar da idade, especialmente em mulheres (14).

O pico de fertilidade de uma mulher ocorre por volta dos seus 25 anos, havendo uma redução ligeira após os 30 anos e uma redução abrupta a partir dos 35 anos (47). De facto, foi reportado um aumento da taxa de aneuploidia com o aumento da idade materna, principalmente a partir dos 35 anos (48). Mais ainda, *Leridon* reportou uma

maior taxa de aborto em casos de mulheres com 40 anos relativamente a mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos (49).

Como esperado, as taxas de gravidez aumentam para mulheres de idade avançada quando usados ovócitos oriundos de doação. Isto indica que os resultados negativos associados à gravidez de idade avançada poderão advir de anomalias nos ovócitos. Particularmente, o fuso meiótico destes ovócitos apresenta frequentemente deficiências no alinhamento dos cromossomas e na composição dos microtúbulos (50).

Relativamente a idade masculina avançada, vários estudos reportaram parâmetros de pior qualidade a nível do ejaculado destes indivíduos. Ainda que os dados sejam contraditórios em termos de concentração, uma diminuição foi confirmada a nível do volume do ejaculado e das taxas de motilidade e morfologia dos espermatozoides. Para além disso, foram também registadas alterações a nível genético (51-53). O acumular destas alterações pode afetar o sucesso reprodutivo do casal.

O estilo de vida dos membros do casal também afeta a sua fertilidade, nomeadamente por hábitos como o consumo de álcool, drogas e tabaco (54-58). Particularmente, *Sharara et al.* mostrou diminuição da reserva ovárica, fertilização e taxa de gravidez em mulheres fumadoras relativamente a mulheres não fumadoras (59).

Vários estudos revelaram ainda os efeitos negativos da obesidade sobre a fertilidade. Nomeadamente, a indução de alterações metabólicas e endócrinas que resultam, no caso dos homens, em concentração e motilidade espermáticas reduzidas (60, 61) e, no caso das mulheres, em alta incidência de anovulação (62, 63). De facto, foi reportado que mulheres com obesidade têm três vezes maior risco de infertilidade do que mulheres que não apresentam obesidade (64).

A carência nutricional e o exercício físico intenso também demonstraram impactar a fertilidade, influenciando especificamente o eixo hipotálamo-hipófise-gónada, o que aumenta, entre outros, o risco de distúrbios na ovulação (65, 66).

A fertilidade pode também ser afetada por fatores ambientais. Particularmente, a exposição prolongada a disruptores endócrinos, frequentemente presentes em pesticidas e fertilizantes, perturba várias vias de sinalização hormonal. Isto leva ao desenvolvimento de doenças ováricas nas mulheres e de disfunção testicular nos homens, o que diminui as taxas de fertilização (57, 67).

Outros fatores ambientais compreendem a exposição a radiação e metais pesados. Estes fatores originam espécies reativas de oxigénio que produzem stress oxidativo e afetam nomeadamente a ovulação, a função ovárica e a espermatogénese (68).

2. Procriação Medicamente Assistida

2.1. Conceitos e Estimativas

As técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) assumem particular relevância, uma vez que permitem a superação da infertilidade e o subsequente nascimento de milhões de crianças de casais inférteis, tornando-se, assim, parte integral da medicina moderna (69).

A PMA compreende a tecnologia de reprodução assistida que inclui o manuseamento *in vitro* de ovócitos, espermatozoides e embriões humanos com o propósito de reprodução. Os tratamentos são classificados como de primeira linha, sendo o caso da inseminação intrauterina (IIU) (70), ou de segunda linha, sendo o caso da fertilização *in vitro* (FIV), nos quais a junção dos gametas masculinos e femininos ocorre em ambiente laboratorial (71). São normalmente preferidos os métodos menos invasivos de primeira linha para início de tratamento (72). No entanto, regularmente é necessário recorrer a métodos de segunda linha, mais complexos.

A escolha entre estes tratamentos é realizada com base na avaliação inicial da infertilidade e em fatores como dados anteriores de ciclo, segurança e custos financeiros (71).

Um processo de PMA é, assim, longo e apresenta várias fases críticas que devem ser acompanhadas com rigor e pormenor. Uma falha numa destas fases pode pôr em risco a conceção e afetar o sucesso do tratamento (73). O sucesso do tratamento varia também conforme as características do tratamento e do próprio paciente (74).

O primeiro tratamento de fertilização *in vitro* convencional (cFIV) realizado com sucesso ocorreu em 1978 (75). Desde então já nasceram mais de 5 milhões de crianças resultantes de PMA e as proporções continuam a aumentar cada vez mais (76, 77). No entanto, estas proporções variam entre países, devido sobretudo à exigência financeira da PMA e à diferente receptividade cultural a estes tratamentos (78). Entre os diferentes continentes, a Europa apresenta-se como o mais ativo na realização destes tratamentos, com países que excedem as 5% crianças nascidas a partir de PMA (69, 79).

Este aumento da popularidade da PMA e o seu próprio desenvolvimento tecnológico têm provocado extensos debates políticos que resultam na imposição de limites

relativamente à realização destes tratamentos. No entanto, mesmo as leis relativas à PMA variam consideravelmente de país para país (69).

2.2. Inseminação Intrauterina

A IIU envolve a deposição de uma amostra de ejaculado previamente processada na cavidade superior uterina da mulher. Isto permite a superação das barreiras naturais envolvidas na ascendência dos espermatozoides pelo trato reprodutor feminino. É um tratamento de primeira linha minimamente invasivo que apresenta um bom custo-benefício com taxas de gravidez clínica entre 10% e 20% (70).

A IIU é recomendada em casos de casais com infertilidade de fator cervical ou ovulatório, fator imunológico, fator idiopático ou infertilidade masculina moderada. É imperativo que o homem não apresente oligospermia severa e que a mulher não apresente atresia cervical ou obstrução tubar bilateral (72).

Previsivelmente, a IIU é negativamente afetada pelo aumento da idade, tanto feminina como masculina. De facto, foi demonstrada uma diminuição significativa da taxa de gravidez clínica com o aumento da idade da mulher, especialmente quando esta ultrapassa os 35 anos. Isto deve-se essencialmente à diminuição do número e qualidade dos ovócitos. Da mesma forma, a taxa de gravidez clínica diminuiu significativamente com o aumento da idade do homem. Tal se deve à influência da qualidade espermática, que diminui com a idade masculina (80).

A IIU pode ser realizada com recurso a estimulação ovárica controlada, que envolve a estimulação do desenvolvimento de folículos maduros. A estimulação é realizada tendo em conta as características da paciente, de modo a reduzir complicações associadas, como gravidez múltipla ou síndrome de hiperestimulação ovárica (70, 80).

Assim, em relação a outros tratamentos de PMA, a IIU demonstra ser uma opção mais simples e barata, o que a torna mais facilmente aceite pelos casais inférteis. No entanto, devido a fatores diversos, apresenta uma taxa de gravidez menor (80, 81).

2.3. Fertilização *in vitro*

A FIV é um tratamento de segunda linha. Neste tipo de tratamento, a fertilização dos ovócitos pelo espermatozoide ocorre em laboratório, fora da cavidade uterina (82).

Estes tratamentos exigem a recolha não só de uma amostra de ejaculado contendo espermatozoides como também a recolha de ovócitos maduros por uma punção folicular. De modo a aumentar a taxa de recuperação de ovócitos durante a punção, é realizada previamente uma estimulação ovárica controlada de modo a estimular o desenvolvimento de folículos maduros (83). A amostra de ejaculado é também preparada previamente, por técnicas como *swim-up* e centrifugação por gradiente de densidade, que permitem a seleção de espermatozoides e o aumento da concentração daqueles com boa motilidade e morfologia (84, 85).

Os diferentes tratamentos de FIV variam sobretudo na técnica usada para a fertilização. Especificamente, os ovócitos de um ciclo poderão ser todos exclusivamente inseminados por cFIV ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), ou então divididos aleatoriamente pelas duas técnicas, constituindo, assim, um ciclo misto. A ocorrência de fecundação é avaliada no dia seguinte e os embriões que resultem daí são depois mantidos em cultura até decisão de transferir, criopreservar ou descartar (71).

A manipulação dos gametas e dos embriões é realizada em condições semelhantes às encontradas *in vivo*, isto é, num ambiente de luz, temperatura, humidade e pressão e qualidade do ar controladas. Deste modo, estes tratamentos são complexos e sensíveis, envolvendo a necessidade de uma grande perícia a nível laboratorial (86, 87). Por outro lado, estão associados a uma taxa de gravidez clínica superior à IIU, e são requeridos frequentemente em situações nas quais não se obteve resultados positivos recorrendo à última (88). Há ainda casais que, não apresentando critérios para iniciar tratamento de IIU, são diretamente reencaminhados para FIV.

2.3.1 Fertilização *in vitro* Convencional

A cFIV surgiu nos anos 60 e 70 e tem sido desde então uma das técnicas mais praticadas da PMA. É indicada principalmente em casos de infertilidade feminina, de infertilidade masculina leve ou de insucesso em ciclos de IIU prévios (89).

Na cFIV, os ovócitos são colocados numa placa de cultura com o *cumulus oophorus* intacto. Uma concentração conhecida de espermatozoides é adicionada à placa de Petri

que é posteriormente mantida numa incubadora com ambiente controlado (Figura 1). Esta é, portanto, uma técnica menos invasiva que não requer manipulação mecânica do ovócito (90).

A fertilização ocorre de forma semelhante à fertilização *in vivo*. O espermatozoide atravessa as células do *cumulus oophorus* até ligação dos seus recetores a glicoproteínas da zona pelúcida. Esta ligação despoleta uma reação acrossómica que resulta na libertação de enzimas do acrossoma, nomeadamente, a hialuronidase e a acrosina. A hialuronidase permite degradar o ácido hialurónico responsável pelas ligações entre as células que constituem as camadas da granulosa, *coroa radiata* e *cumulus oophorus* que envolvem o ovócito. A acrosina digere a zona pelúcida, permitindo a fusão das membranas de ambos os gâmetas e, consequentemente, a fertilização (91).

No dia seguinte ocorre a desnudação mecânica, momento em que é também avaliada a fecundação.

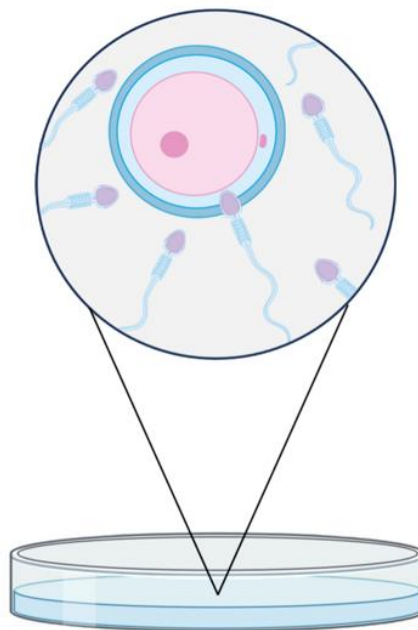


Figura 1. Representação gráfica de cFIV (não apresentada à escala). Os ovócitos são colocados numa placa de Petri juntamente com uma concentração conhecida de espermatozoides. O espermatozoide atravessa as células do *cumulus oophorus* (não representado) até ligação dos seus recetores a glicoproteínas da zona pelúcida. Esta ligação despoleta uma reação acrossómica que permite a fusão das membranas de ambos os gâmetas e, consequentemente, a fertilização.

2.3.2 Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

A ICSI foi inicialmente aplicada em casais inférteis no início dos anos 90, como solução para casos de infertilidade masculina severa. De facto, em 1992, *Palermo et al.* reportou os primeiros casos de nascimentos a partir de casais com infertilidade

masculina que recorreram a ICSI após insucesso em resultados de cFIV (92). Mais recentemente, a ICSI também tem sido indicada para casos de testes genéticos de pré-implantação ou para ovócitos oriundos de criopreservação (71).

No entanto, nas últimas décadas tem-se registado uma ampliação do uso da ICSI aos restantes casos. Assim, as taxas de uso da ICSI têm aumentado rapidamente em desfavorecimento das taxas de uso da cFIV (93). Notavelmente, este aumento não é justificado por uma melhoria nos resultados da PMA e é origem de extensos debates, uma vez que a ICSI é mais invasiva, complexa e requer mais tempo e recursos relativamente à cFIV (90, 94).

Na ICSI, a inseminação ocorre de forma mecânica e por intervenção humana. As células que envolvem o ovócito são inicialmente removidas por desnudação mecânica e por desnudação química com hialuronidase recombinante humana. Tal permite fazer uma avaliação da qualidade e maturidade dos ovócitos, que necessitam de estar em metáfase II para serem selecionados para o procedimento (Figura 2). Mais ainda, a desnudação permite uma melhor visualização do ovócito durante o procedimento (95).

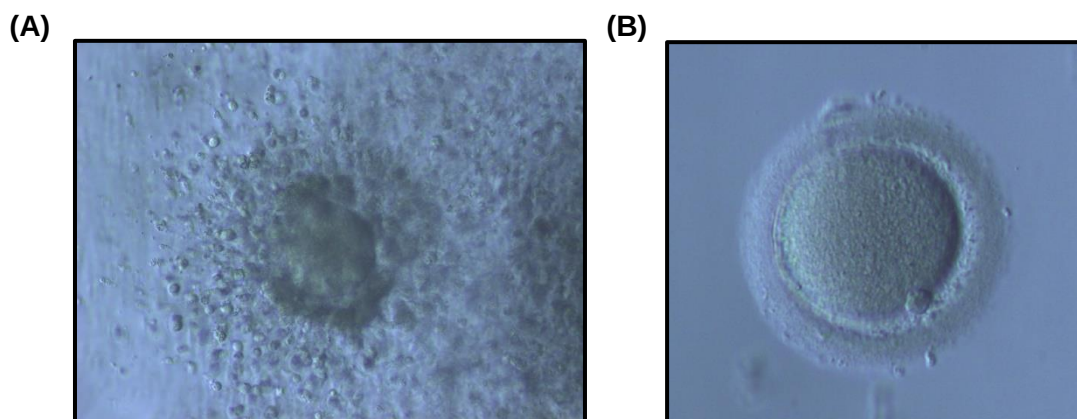


Figura 2. (A) Captação fotográfica do complexo *cumulus* - *coroa radiata* - ovócito (CCO) antes do processo de desnudação. **(B)** Captação fotográfica de um ovócito em metáfase II, após processo de desnudação. Imagens cedidas pelo Centro de Responsabilidade Integrada - Medicina da Reprodução (CRI-MR) do Centro Hospitalar Universitário de São João (CHUSJ).

O procedimento é realizado num microscópio invertido de microinjeção, que apresenta uma platina aquecida, que mantém a temperatura adequada, e microinjetores, que permitem a manipulação dos gâmetas. Um espermatozoide é selecionado para injeção com uma pipeta de injeção de acordo com as suas características de motilidade e morfologia (95). De notar que esta seleção é feita de forma subjetiva e depende do embriologista que realiza o procedimento. Após a seleção, é essencial que se faça uma quebra na cauda do espermatozoide, de modo a imobilizá-

lo e impedir que este cause perturbações no fuso cromático do ovócito após a injeção. Mais ainda, esta imobilização do espermatozoide perturba a sua membrana plasmática, o que favorece a libertação de fatores espermáticos que contribuem para a ativação do ovócito (96-98). Aliás, foram reportadas baixas taxas de fertilização em casos de injeção de espermatozoides móveis não submetidos a imobilização (99, 100).

Durante o procedimento, uma pipeta de sustentação sustenta o ovócito e posiciona-o preferencialmente de forma que o glóbulo polar (GP) se mantenha às 6 ou 12 horas. A pipeta de injeção contendo o espermatozoide selecionado é então inserida pela zona pelúcida numa posição perpendicular ao GP (Figura 3). Este ângulo de 90° é especialmente importante uma vez que permite evitar perturbar o fuso meiótico localizado regularmente perto do GP (71, 101).

Assim que a entrada da pipeta rompe a membrana plasmática do ovócito, há uma aspiração do citoplasma seguida da sua expulsão juntamente com o espermatozoide (100).

Desta forma, a ICSI permite evitar o comprometimento da fertilização que existe naturalmente associado à penetração do espermatozoide na zona pelúcida e à própria interação entre este e o ovócito (71).

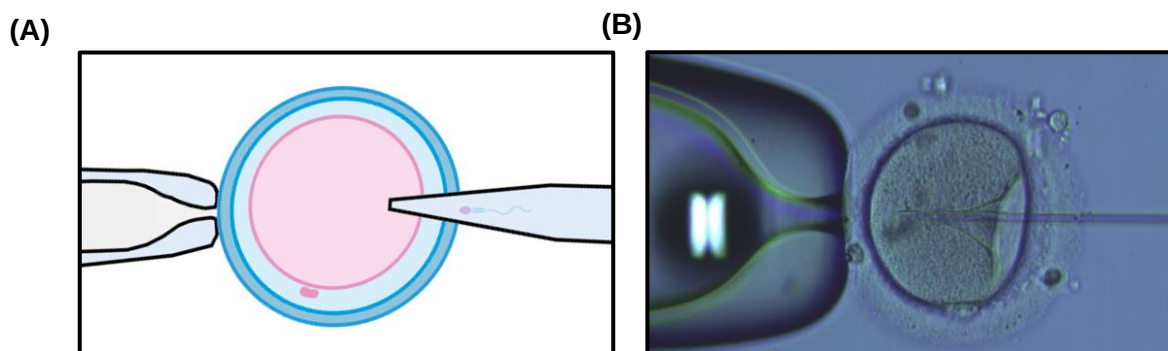


Figura 3. (A) Representação gráfica de ICSI (não apresentada à escala). **(B)** Captação fotográfica de ICSI, cedida pelo CRI-MR do CHUSJ. Uma pipeta de sustentação sustenta o ovócito e posiciona-o preferencialmente de forma que o GP se mantenha às 6 horas. A pipeta de injeção contendo o espermatozoide selecionado é inserida pela zona pelúcida numa posição perpendicular ao GP. Assim que a entrada da pipeta rompe o ovócito, há uma aspiração do citoplasma, que permite a ativação do ovócito, seguida da sua expulsão juntamente com o espermatozoide.

2.4. Fecundação e Desenvolvimento Embrionário

2.4.1 Fecundação

Após o procedimento de FIV, as placas são guardadas em incubadoras a 37 °C com 6% de CO₂ e 5% de O₂. A interação dos gametas após a fertilização irá impor uma sequência de eventos que dá origem a novas estruturas nucleares e a alterações de morfologia. Assim, 16 a 18 horas depois, a ocorrência de fecundação é avaliada

morfologicamente pela presença ou ausência de um zigoto com 2 GP e 2 pronúcleos (PN) (102).

Os zigotos normais são depois selecionados para novos meios de cultura, onde se vão desenvolver por diversas fases dinâmicas que implicam alterações significativas a nível da sua fisiologia, metabolismo e regulação molecular (103).

2.4.2 Dia 3 e Dia 4 de Desenvolvimento Embrionário

A partir do dia seguinte, inicia-se a fase de clivagem. É nesta fase que se registam as primeiras divisões celulares. Assim, ao dia 3 de desenvolvimento, é esperado que o embrião apresente 8 células, especificamente blastómeros, sendo estas facilmente distinguíveis ao microscópio (103, 104).

Neste dia, a atividade celular começa a ficar mais complexa e há ativação de vários genes que participarão no futuro desenvolvimento destas células (105).

Este dia é relevante também do ponto de vista laboratorial, uma vez que o embrião é frequentemente transferido para o útero da mulher ao terceiro dia de desenvolvimento. Não sendo transferido a este dia, opta-se frequentemente por criopreservação ou por continuar a sua cultura. Em alguns casos, recorre-se ainda a eclosão assistida (106, 107).

Ao dia 4 de desenvolvimento, o embrião é composto por 8 a 16 células e inicia-se na fase de mórula por um processo denominado compactação. Durante a compactação, os blastómeros contraem e aderem entre si por junções intercelulares, maximizando a sua área de contacto e diminuindo a área de superfície exposta ao meio. Após a compactação, o embrião revela-se como uma estrutura compacta com células achatadas e pouco definidas, que comunicam entre si funcionando como uma unidade (108-110).

Nesta fase registam-se também outras alterações determinantes da fisiologia do embrião. O embrião pré-compactação apresenta o genoma materno, assinalando baixa transcrição de genes, baixa atividade biossintética e baixo quociente respiratório. O embrião pós-compactação apresenta genoma embrionário, registando uma maior transcrição de genes, elevada atividade biossintética e elevado quociente respiratório (105, 111).

Esta fase do desenvolvimento embrionário está por isso associada a uma maior tolerância ao stress. De facto, um embrião em fase de pré-compactação, com baixa

transcrição de genes, é bastante vulnerável a alterações de ambiente, uma vez que tem capacidade limitada para manter funções a nível celular, como a regulação do pH intracelular. Já um embrião em fase de pós-compactação, submetido ao mesmo stress, tem maior capacidade de resposta e, como tal, o seu futuro desenvolvimento não é comprometido com a mesma gravidade (112, 113).

Para além disso, denotam-se diferenças a nível de requerimentos nutricionais. O embrião pré-compactação apresenta um metabolismo baseado na oxidação de piruvato, lactato e aminoácidos não essenciais. Após a compactação, o embrião tem necessidade de aminoácidos essenciais e não essenciais e prefere a glucose como fonte de energia (111). Em particular, *Gardner et al.* reportou que o consumo e metabolismo da glucose pode, aliás, servir como um marcador da viabilidade do embrião após a compactação (114).

Assim, a compactação representa o primeiro processo morfogenético associado à formação de um blastocisto (115). De facto, foi reportado que a precisão temporal com que ocorre a compactação é importante para o desenvolvimento de um blastocisto normal e pode ser preditiva da sua qualidade (116). Concomitante à compactação, ocorre a polarização das células, sendo estabelecidas duas populações de células com posicionamento e sinalização diferenciais para a formação tanto da TE como da MCI. As células à superfície do embrião diferenciam-se em TE enquanto as células posicionadas internamente dão origem à massa celular interna (117, 118).

2.4.3 Dia 5,6 e 7 de Desenvolvimento Embrionário

Considerando um ritmo de desenvolvimento normal, o embrião atinge a fase de blastocisto ao dia 5 de desenvolvimento. Neste dia, as células mais externas permitem a passagem de líquido que se acumula no espaço intercelular, criando uma cavidade denominada blastocélio. Neste embrião mais expandido, as células externas diferenciam-se na TE, compondo o epitélio do blastocisto. As células posicionadas internamente são pluripotentes e vão agrupar-se num dos polos do embrião, diferenciando-se em MCI (Figura 4). Eventualmente, a TE permitirá a implantação do embrião e dará origem às células da placenta. Já a MCI desenvolver-se-á nas células do feto (109, 119).

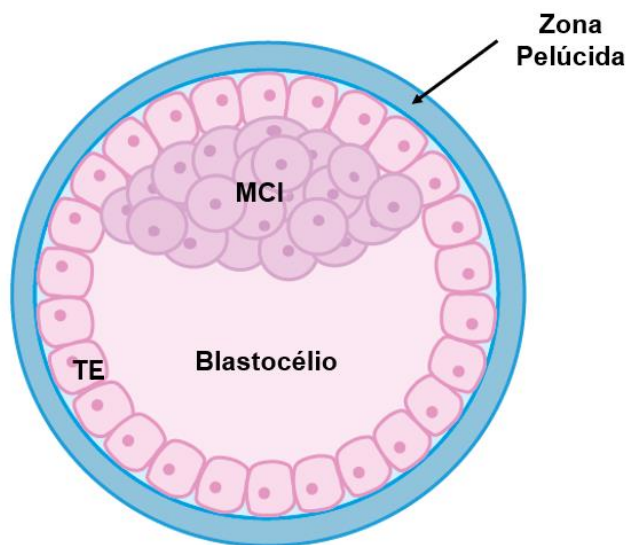


Figura 4. Representação gráfica de um blastocisto. O blastocisto apresenta uma cavidade com líquido no interior, denominada blastocélio, um conjunto de células ao redor que constituem a TE e um conjunto de células pluripotentes posicionadas internamente, constituindo a MCI. Todo o blastocisto é envolvido pela zona pelúcida.

Este dia de desenvolvimento é um dia relevante também a nível laboratorial. Após avaliação cuidada do blastocisto pelo embriologista, é frequente a sua criopreservação, descarte ou transferência para o útero da mulher. É também nesta fase que se realiza a biopsia embrionária em casos de ciclos de PGT (120).

Contudo, ainda que por norma os embriões atinjam a fase de blastocisto ao dia 5 de desenvolvimento, até 30% dos embriões apresentam um desenvolvimento mais lento e só atingem a fase de blastocisto ao dia 6 (121, 122). Este ritmo de desenvolvimento lento foi associado a aneuploidia (123). De facto, *Tong et al.* reportou uma taxa de euploidia significativamente maior em blastocistos de dia 5 comparativamente a blastocistos de dia 6 (124). Pelo contrário, também algumas investigações relataram taxas semelhantes de euploidia entre os embriões, concluindo que o ritmo de desenvolvimento não é influenciado pela genética (125).

Para além disso, não há ainda concordância quanto à viabilidade de um blastocisto de dia 6 comparativamente a um blastocisto de dia 5, e quanto à utilização do ritmo de desenvolvimento lento como um indicador de baixa viabilidade. Desta forma, os blastocistos de dia 6 têm sido considerados para utilização clínica, principalmente em casos em que o *pool* de embriões disponíveis para utilização é reduzido.

Tipicamente, se ao dia 6 de desenvolvimento o embrião não tem qualidade mínima para ser utilizado a nível clínico, este é descartado. No entanto, mais recentemente introduziu-se a extensão da cultura embrionária até dia 7. Particularmente, foi reportado que uma pequena proporção dos blastocistos de dia 6 que tipicamente seriam descartados, conseguem desenvolver-se em blastocistos de dia 7 com qualidade morfológica suficiente para serem usados a nível clínico (126). Contudo, os embriões que apenas atingem a fase de blastocisto neste dia revelaram ser menos viáveis e estar mais associados a aneuploidia, mesmo controlando fatores como a idade materna e a morfologia embrionária (127, 128). Tendo isto em conta, admite-se um pior prognóstico para embriões que apenas se desenvolveram em blastocisto a dia 7, não sendo aconselhada a sua utilização (129).

O dia 6 e dia 7 de desenvolvimento embrionário estão também associados ao fenómeno de eclosão embrionária. Durante a expansão do blastocisto há um aumento da pressão hidrostática, o que faz com que a zona pelúcida fique mais fina e eventualmente se rompa. Este pequeno rompimento, que acontece afastado do polo da MCI, leva à saída gradual do trofoblasto no período compreendido entre estes dias de desenvolvimento (130).

2.5 Cultura e Monitorização Embrionária

Durante o desenvolvimento embrionário, os embriões são mantidos em meios de cultura apropriados às diferentes necessidades das fases pelas quais estes se desenvolvem.

Os meios de cultura podem ser essencialmente categorizados como sistemas de cultura sequencial ou de monocultura.

Os sistemas de cultura sequencial envolvem dois meios de cultura. O primeiro meio apresenta os nutrientes e fontes de energia adequados ao desenvolvimento da fase de clivagem do embrião. O embrião é depois transferido para o segundo meio de cultura que suporta a extensão da cultura até à fase de blastocisto (131, 132).

Os meios de monocultura foram desenvolvidos para suportar o desenvolvimento do embrião desde a fase de zigoto até à fase de blastocisto sem ser necessária a sua alteração. Essencialmente, estes meios apresentam todos os nutrientes e fontes de energia que o embrião precisará durante o seu desenvolvimento, e baseiam-se no pressuposto que o embrião vá selecionando e usando especificamente o que precisa em cada fase do seu desenvolvimento (131, 132).

Independentemente do sistema de cultura aplicado, o embriologista monitoriza de forma cuidada toda a evolução embrionária.

A avaliação padrão é realizada ao microscópio. No entanto, esta implica remover o embrião da incubadora repetidamente durante o seu desenvolvimento, expondo-o a alterações de ambiente como temperatura, pH e níveis de oxigénio. Para além disso, tem a desvantagem de ser uma avaliação pontual que não reflete o desenvolvimento dinâmico do embrião, não considerando possíveis alterações durante o intervalo entre duas avaliações (133).

De modo a contrariar estas desvantagens, foi desenvolvido um sistema de monitorização *time-lapse*. Este sistema é composto por uma incubadora com uma câmara. A câmara regista várias imagens do embrião que são depois processadas em vídeo. Este sistema permite assim assistir ao desenvolvimento dinâmico do embrião, possibilitando a observação mais detalhada do seu ritmo e dos fenómenos morfocinéticos. Mais ainda, este sistema de monitorização, aplicado com um sistema de monocultura, permite manter o embrião na incubadora durante todo o seu desenvolvimento, não implicando as alterações de ambiente associadas à sua manipulação e avaliação (133, 134).

O desenvolvimento do embrião é assim acompanhado pelo embriologista que avalia o seu ritmo e qualidade embrionária conforme o que é esperado de cada fase do desenvolvimento. Apesar de a avaliação ser subjetiva e apresentar alguma variabilidade, esta acarreta bastante relevância a nível da atividade laboratorial pois é a principal influenciadora das decisões relativamente ao destino do embrião, isto é, se este é passível de ser aproveitado para transferência e criopreservação ou se deverá ser descartado (135).

2.6 Qualidade embrionária

O sucesso de um ciclo de PMA depende em grande medida da recetividade endometrial e da qualidade embrionária (136).

A avaliação da qualidade embrionária é uma das etapas mais importantes de um processo de PMA, uma vez que permite identificar e selecionar os embriões mais viáveis e com maior probabilidade de implantação, aumentando assim, por consequência, as probabilidades de sucesso quanto ao resultado do ciclo (135).

De modo a padronizar e otimizar a seleção do embrião, foram desenvolvidos sistemas de classificação da sua qualidade embrionária. Atualmente, há vários disponíveis, sendo que a escolha de qual utilizar pertence a cada centro de PMA.

O presente estágio foi desenvolvido num centro de PMA que opta pelo uso do sistema de classificação ASEBIR desenvolvido pela *Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción* (ASEBIR) (137).

2.6.1 Sistema ASEBIR

O sistema ASEBIR avalia a qualidade embrionária por categorias baseando-se em parâmetros morfológicos. As categorias estendem-se da A à D, com base no potencial de implantação do embrião. Assim sendo, a categoria A representa ótima qualidade e máxima capacidade de implantação do embrião, enquanto a categoria D representa qualidade baixa e probabilidade de implantação quase nula. No que toca ao aproveitamento embrionário, embriões de categoria A têm prioridade sobre embriões de categoria B ou C. Embriões de categoria D são descartados (137).

Contrariamente a outros sistemas de classificação, o sistema ASEBIR tem em conta a evolução prévia do embrião na avaliação do dia atual de desenvolvimento. Deste modo, só se considera um embrião de ótima qualidade aquele que apresenta um desenvolvimento correto desde o início da cultura (137).

Para além da avaliação de cada dia do desenvolvimento embrionário, este sistema também inclui a avaliação dos ovócitos e da própria ocorrência de fecundação.

Cada avaliação implica a observação morfológica de estruturas e alterações morfológicas dinâmicas. Assim sendo, a hora de observação para a avaliação destas fases de desenvolvimento apresenta extrema relevância e influencia a decisão final no sistema ASEBIR.

Avaliação morfológica do ovócito – Dia 0

O processo de maturação do ovócito envolve alterações a nível nuclear e citoplasmático. No entanto, estas alterações poderão não ser sincronizadas, o que leva

à formação de ovócitos com maturação nuclear, ou seja, em metáfase II, e que apresentam maturação citoplasmática deficiente (138).

Assim sendo, durante a avaliação procuram-se alterações morfológicas a nível citoplasmático, extracitoplasmático e do complexo *cumulus* - *coroa radiata* - ovócito (CCO).

Relativamente ao citoplasma, é esperado que este se apresente claro e sem acumulação de granulosidades, uma vez que a sua presença está associada a um baixo potencial de implantação (139).

A presença de agregados de retículo endoplasmático liso no citoplasma de um ovócito é também uma anomalia severa, estando associada a um desenvolvimento anormal do embrião e complicações obstétricas. (140).

A presença de inclusões citoplasmáticas e de vacúolos de grandes dimensões ($>14\mu\text{m}$) é também uma anomalia citoplasmática a ter em atenção, já tendo sido reportadas baixas taxas de fecundação nestes casos (141).

Relativamente a alterações extracitoplasmáticas, é tida em atenção a presença de anomalias na zona pelúcida e no aspeto do primeiro GP, em tamanho e fragmentação, assim como de um espaço perivitelino aumentado e com restos celulares. Este último foi descrito na literatura como estando associado a uma sobre maturação dos ovócitos (142).

Assim, os ovócitos de boa qualidade morfológica deverão apresentar uma forma arredondada, com um citoplasma claro e ausente de inclusões e um GP de tamanho apropriado, envoltos por uma zona pelúcida uniforme e clara de grossura aproximada a $20\mu\text{m}$ (129) (Figura 2B).

Avaliação morfológica do zigoto – Dia 1

No primeiro dia após a inseminação, é avaliada a ocorrência da fecundação pela observação do zigoto resultante.

A observação morfológica do zigoto é realizada entre as 16 e as 18 horas após a inseminação. A observação do zigoto fora deste intervalo de horas pode levar à não visualização das estruturas que indicam a ocorrência de fecundação, implicando uma interpretação errada (129).

Assim, a avaliação morfológica do zigoto compreende a visualização do número e aparência dos PN, dos GP e dos corpos precursores nucleares (CPN), assim como da ausência/presença de um halo citoplasmático (137).

O número de PN é avaliado juntamente com o número de GP. Mantêm-se em cultura todos os zigotos que apresentem 2 PN e 2 GP (Figura 5A) e descartam-se todos os que apresentem apenas 1 GP e todos os que apresentem mais de 2 PN. Particularmente, é recorrente a formação de zigotos de 3 PN (Figura 5B), cujo descarte é recomendado, devido à triploidia inerente ao embrião (143).

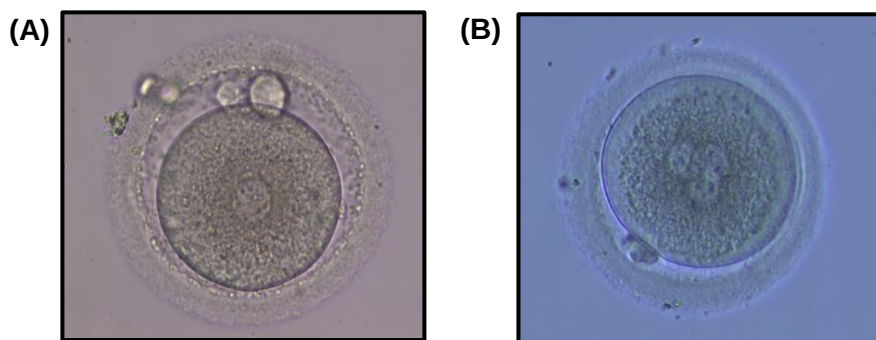


Figura 5. (A) Captação fotográfica de um zigoto com 2 PN e 2 GP. **(B)** Captação fotográfica de um zigoto com 3 PN. Geralmente estes zigotos são descartados, por presença de triploidia. Imagens cedidas pelo CRI-MR do CHUSJ.

No entanto, em casos em que o zigoto apresenta 1 PN e 2 GP, a avaliação varia com base na técnica escolhida para a inseminação. Se ICSI, recomenda-se o descarte do zigoto, uma vez que apenas 20% dos embriões que se desenvolvem são diploides. Se cFIV, a escolha de manter em cultura fica a cargo de cada centro de PMA, uma vez que 80% dos embriões que se desenvolvem apresentarão diploidia (137).

Os GP são também avaliados quanto ao seu tamanho, fragmentação e localização relativamente aos PN. Particularmente, é de esperar que o segundo GP esteja alinhado com os PN definindo o eixo e plano da primeira divisão mitótica (144).

Relativamente aos PN, é avaliada a simetria e a posição entre ambos e a sua localização no citoplasma. Em particular, é de esperar que estes sejam simétricos, adjacentes e com localização central no citoplasma. Os CPN são também avaliados quanto ao seu número e simetria e quanto à sua localização (144).

A presença de um halo citoplasmático, de tamanho adequado, é também uma característica positiva a ter em conta na avaliação do zigoto. De facto, foi descrito que

zigotos que apresentem halo citoplasmático desenvolvem-se em embriões com melhor qualidade relativamente a zigotos sem halo citoplasmático (145).

No entanto, não se inclui a qualidade inferida neste dia do desenvolvimento como parâmetro influenciador da categorização do futuro embrião.

Avaliação morfológica do embrião em fase de clivagem – Dia 2 e 3

A partir do segundo dia de desenvolvimento, o embrião é classificado de A a D com base nas observações feitas pelo embriologista. Esta classificação final do embrião depende do conjunto de avaliações e categorias atribuídas às suas diversas características.

A observação morfológica do embrião aos segundo e terceiro dias de desenvolvimento é realizada entre as 43 e as 45 horas e as 67 e as 69 horas após a inseminação, respetivamente (129).

Nestas observações são avaliados diversos parâmetros nomeadamente o número de células e o ritmo de divisão.

Considerando o segundo dia de desenvolvimento, espera-se um embrião de 4 células (146), que é classificado como categoria A. Um embrião de 5 células é considerado categoria B enquanto um de 2, 3 ou 6 células pertence a categoria C. Todos aqueles que apresentarem apenas 1 célula, ou, então, mais de 6 células, são classificados como categoria D. Por consequência é recomendado o seu descarte (137).

Ao terceiro dia de desenvolvimento, o embrião é avaliado tendo em consideração o número de células que apresentava ao dia 2 de desenvolvimento. Assim, é considerado de categoria A o embrião de dia 3 que apresente 7 a 8 células e que originou de um embrião de 4 células ao dia 2 de desenvolvimento. Todos os embriões de dia 3 que apresentarem não mais de 5 células, ou então, apenas mais 1 célula que o seu respetivo embrião de dia 2, são classificados como categoria D (137) (Figura 6).

Existem outras características submetidas a avaliação, que influenciam a classificação final dos embriões de dia 2 e de dia 3 de desenvolvimento.

Nomeadamente, o aparecimento de fragmentos celulares de origem blastomérica ocorre com certa frequência, sendo que a sua percentagem pode afetar a viabilidade do embrião (147). A percentagem de fragmentação é calculada em relação ao volume das células. Uma percentagem mais alta implica uma categoria inferior.

Os blastómeros são também avaliados conforme o seu tamanho e simetria. Se estes apresentam um tamanho compatível com o ciclo de divisão, o embrião encontra-se em estado-específico, correspondendo essa característica à categoria A. Se o tamanho dos blastómeros é incompatível com o ciclo de divisão, a categoria é inferior (137).

A observação de um núcleo por blastómero é um indicador de potencial de implantação (148). Contudo, é frequente a observação de multinucleação, isto é, de mais do que um núcleo em pelo menos um dos blastómeros do embrião, o que representa um mau prognóstico (149). Assim sendo, a ausência de multinucleação é uma característica de categoria A. A presença de uma célula binucleada num embrião de dia 2 ou duas células binucleadas num embrião de dia 3 são características de categoria C. Outros casos de multinucleação representam a categoria D, pelo que é recomendado o descarte do embrião.

Graves alterações citoplasmáticas também implicam categoria D. Nestas inclui-se o anel acitoplasmático, descrito como uma grande retração do citoplasma na periferia de um blastómero. Da mesma forma, também se inclui casos em que mais de 50% dos blastómeros apresentem vacúolos (137, 150).

O aspeto da zona pelúcida influencia também a categoria de qualidade do embrião, no sentido em que uma grossura excessiva, uma cor escura ou uma forma ovalada, implicam uma redução da categoria (137).

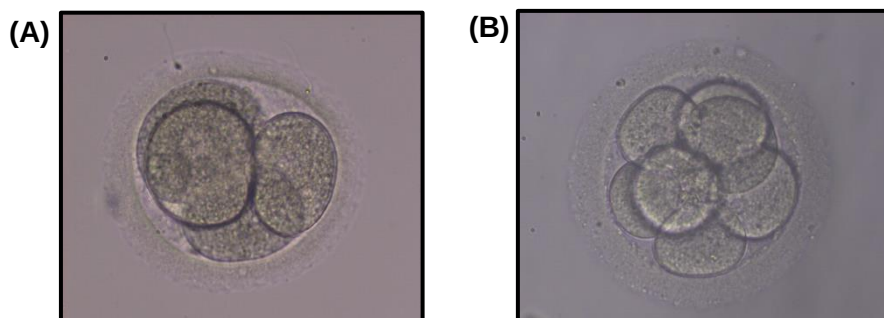


Figura 6. (A) Captação fotográfica de um embrião ao dia 2 de desenvolvimento, com 4 blastómeros simétricos e de tamanho normal, sem presença de fragmentação, vacuolização ou multinucleação. **(B)** Captação fotográfica de um embrião ao dia 3 de desenvolvimento, com 7 blastómeros simétricos e de tamanho normal, sem aparente presença de fragmentação, vacuolização ou multinucleação. Imagens cedidas pelo CRI-MR do CHUSJ.

Avaliação morfológica do embrião em fase de mórula – Dia 4

A observação morfológica do embrião ao quarto dia de desenvolvimento é realizada entre as 90 e 94 horas após a inseminação (129). São observadas características como

a sua divisão, adesão e compactação celulares, assim como as suas percentagens de fragmentação e vacuolização.

A avaliação deste embrião é dinâmica e parte da sua categoria ao dia 3 de desenvolvimento. Assim, o embrião mantém a sua categoria de dia 3 sempre que apresentar, ao dia 4, compactação total e mais de 8 células (137) (Figura 7).

Em casos de compactação parcial ou de não compactação, é reduzida a categoria que o embrião apresentava no dia 3. Um número de células inferior a 8, uma excessiva vacuolização ou uma fragmentação celular superior a 35 % poderão implicar categoria D (137).



Figura 7. Captação fotográfica de um embrião ao dia 4 de desenvolvimento, em fase de mórula, apresentando uma estrutura compacta com células achatadas e pouco definidas. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

Avaliação morfológica do embrião em fase de blastocisto – Dia 5 e 6

Devido a defeitos morfológicos nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário, apenas aproximadamente 40 a 60 % dos ovócitos fecundados inicialmente se desenvolvem e são mantidos em cultura até à fase de blastocisto (151). Como referido anteriormente, os embriões atingem a fase de blastocisto, por norma, ao dia 5. Em alguns casos de ritmo de desenvolvimento mais lento, o embrião atinge esta fase apenas ao dia 6 de desenvolvimento (121).

A observação morfológica do embrião aos quinto e sexto dias de desenvolvimento é realizada entre as 114 e as 118 horas e as 136 e as 140 horas após a inseminação, respetivamente (129).

Há várias estruturas a ter em atenção durante a avaliação de um blastocisto, nomeadamente a TF, a MCI e o blastocélio (Figura 8).

A TE é considerada categoria A sempre que se apresentar homogênea e com um número alto de células. A categoria diminui com a diminuição do número de células e o aumento da sua heterogeneidade (137).

Já a MCI é avaliada quanto ao seu tamanho e compactação. Esta pertence a categoria A sempre que se apresentar compacta e com um tamanho compreendido entre 3800 e 1900 μm^2 (152). A ausência de uma massa compacta e tamanhos inferiores aos valores de referência implicam a atribuição de uma categoria inferior.

Neste sistema de classificação, a categoria da TE tem maior impacto na classificação final do embrião comparativamente à categoria da MCI, como descrito na Figura 9. Em caso de registo de focos de degeneração, seja na TE ou na MCI, o embrião é considerado categoria D (137).

Outro parâmetro que influencia a classificação final do embrião é o estado de expansão do blastocélio. Assim, um blastocisto que se encontra totalmente expandido, ou até em eclosão, apresentará categoria superior relativamente a um blastocisto que ainda se encontra em expansão. Por outro lado, um blastocisto ainda em estado inicial ou em fase de cavitação representa um mau prognóstico pelo que apresenta categoria C- (127).

Para além disso, é de notar que, da mesma forma que acontece para a avaliação de outros dias de desenvolvimento, também para estes se penaliza a presença de fragmentação e vacuolização (137).

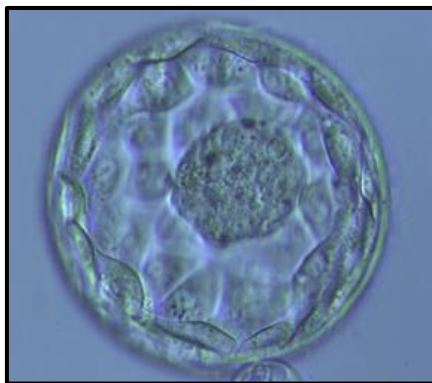


Figura 8. Captação fotográfica de um embrião ao dia 5 de desenvolvimento, em fase de blastocisto. O blastocisto apresenta-se expandido, com uma MCI compacta e uma TE homogênea e com um grande número de células. Imagem cedida pelo CRI-MR do CHUSJ.

O sistema ASEBIR considera desfavorável um embrião que apenas atinge a fase de blastocisto a dia 7 e não inclui a sua avaliação.

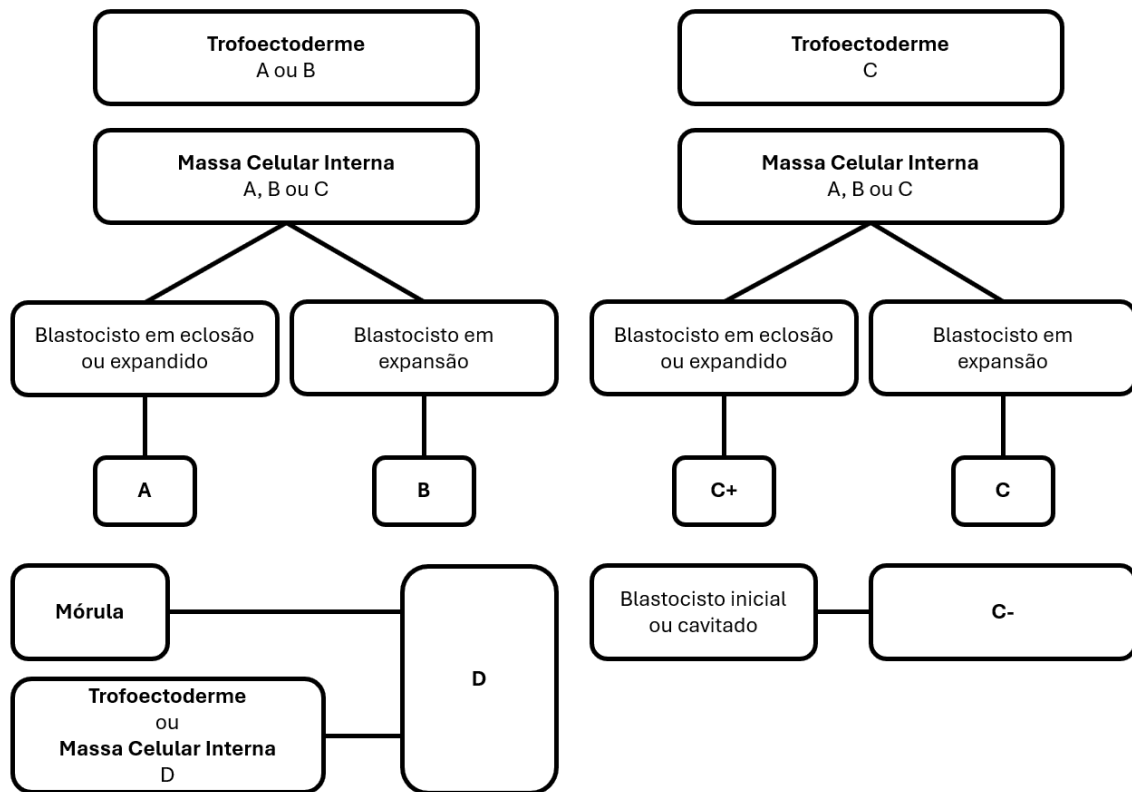


Figura 9. Classificação ASEBIR de blastocistos de dia 5 e de dia 6. A cada blastocisto é atribuída uma categoria final com base nas suas características morfológicas. Adaptado de ASEBIR (137).

2.7 Aproveitamento Embrionário

Embriões classificados como categoria A, B ou C têm potencial para serem aproveitados tanto para criopreservação como para transferência para o útero da mulher.

2.7.1 Criopreservação

A criopreservação é uma técnica que permite preservar estruturalmente células e tecidos em azoto líquido durante longos períodos. A sua utilidade estende-se à medicina da reprodução, uma vez que permite, em inúmeros processos de PMA, preservar ovócitos, espermatozoides e embriões (95).

Há vários processos de PMA que requerem criopreservação de gâmetas. Nomeadamente como forma de preservar a fertilidade, em casos de pacientes que serão submetidos a tratamentos que a afetam, como quimioterapia, radioterapia ou

certas cirurgias (153, 154). Mais ainda, torna-se útil em casos de pacientes azoospermicos submetidos a extração testicular de espermatozoides (TESE), assim como, naturalmente, em processos de doação tanto de ovócitos, como de espermatozoides (155, 156).

No contexto embrionário, a criopreservação revelou-se vantajosa também em diversas situações. Por um lado, permite a preservação e o posterior uso de embriões excedentários de um ciclo com mais do que um embrião com potencial de implantação. Isto revela-se importante especialmente numa era em que se prioriza as transferências únicas de embriões (157). Por outro lado, a criopreservação permite a estratégia *freeze-all*. Esta estratégia implica a criopreservação de todos os embriões com potencial de implantação de um certo ciclo, e o uso desses embriões num ciclo posterior (158). É particularmente útil em casos de PGT, até ser conhecido o resultado da biópsia embrionária quanto à possibilidade de serem ou não geneticamente transferíveis (159), ou em casos de risco de síndrome de hiperestimulação ovárica e de não recetividade do endométrio (158).

No entanto, a criopreservação implica risco de danos celulares associados a stress oxidativo, osmótico e de temperatura, em particular, com a formação de cristais de gelo (160). De modo a ultrapassar este problema, a criopreservação é realizada com recurso a crioprotetores. Os crioprotetores reduzem a água acumulada intracelularmente e diminuem a temperatura de congelação da solução, impedindo a formação de cristais de gelo (161, 162). Para além disso, a temperaturas baixas, os crioprotetores atingem um estado vítreo que funciona como uma matriz e permite a estabilização das células com a diminuição das suas reações moleculares (163).

Atualmente existem dois métodos principais de criopreservação, a congelação lenta e a vitrificação. A congelação lenta é recomendada para criopreservação de espermatozoides (164). Neste método é adicionada uma baixa concentração de crioprotetor, e a congelação é realizada progressivamente e a uma baixa taxa de arrefecimento. Isto permite a desidratação adequada das células e o evitar da cristalização do gelo (165, 166).

Já a vitrificação é recomendada para congelação de ovócitos e embriões (167, 168). De facto, foram registadas taxas de sobrevivência e de gravidez superiores para ovócitos e embriões criopreservados por vitrificação comparativamente a ovócitos e embriões criopreservados por congelação lenta (169, 170).

Na vitrificação são adicionadas maiores concentrações de crioprotetor, que, por sua vez, vai substituir largamente o conteúdo intracelular de água. O material a congelar é mergulhado diretamente em azoto líquido para uma congelação ultrarrápida que permite que as células solidifiquem até um estado vítreo (171). É, por isso, um método rápido, simples e económico (172).

A posterior desvitrificação é realizada de forma rápida de modo a evitar a recristalização do gelo.

2.7.2 Transferência Embrionária

A transferência embrionária é uma das intervenções mais sensíveis da PMA. Esta pode ser realizada a fresco, isto é, com embriões que resultaram do corrente ciclo, ou a partir de embriões desvitrificados de uma criopreservação prévia. A última é realizada em casos de *freeze-all* ou de embriões excedentários (173). Mais ainda, devido à assincronia com o endométrio, não é recomendada a transferência a fresco de embriões de dia 6 e de dia 7, sendo imperativo a sua transferência a partir dos embriões previamente criopreservados (174).

Outro aspeto importante desta intervenção é o número de embriões a transferir. Inicialmente, considerando as baixas taxas de gravidez registadas, a transferência de mais do que um embrião era considerada essencial de modo a aumentar a probabilidade de gravidez. No entanto, este tipo de transferência acarreta um grande risco de gravidez múltipla, que foi reportada como estando associada a efeitos adversos na saúde da mãe e dos nados-vivos (175). De forma a evitar a gravidez múltipla, instituiu-se recentemente a prática da transferência única de um embrião. Este tipo de transferência consiste na transferência de 1 embrião, em fase de clivagem ou de blastocisto, selecionado de um grupo de embriões com potencial de implantação (176). Naturalmente, a seleção do embrião para transferência única assume extrema importância e é baseada na sua fase de desenvolvimento e na avaliação da sua qualidade morfológica e do seu ritmo de desenvolvimento.

Relativamente à fase de desenvolvimento, a escolha de transferir o embrião em fase de clivagem ou em fase de blastocisto tem sido objeto de debate entre a comunidade científica. Por um lado, a transferência de embriões em fase de blastocisto é considerada mais fisiológica, já que o embrião é colocado na cavidade uterina num estado de desenvolvimento semelhante àquele encontrado *in vivo*. Por outro lado, o prolongamento da cultura embrionária até à fase de blastocisto permite não só uma previsão mais precisa quanto ao potencial de implantação do embrião como também

permite uma autosseleção dos embriões, uma vez que só os embriões viáveis e com potencial de desenvolvimento atingem esta fase avançada (177, 178). Assim, foram reportadas maiores taxas de gravidez clínica e de nados-vivos para transferências de embriões em fase de blastocisto relativamente a transferências de embriões em fase de clivagem (179). No entanto, a primeira está associada a uma diminuição do número de embriões com aproveitamento, facto que poderá estar intimamente relacionado com o stress inerente de uma cultura embrionária *in vitro* (180). Em particular, foram reportados quase três vezes mais cancelamentos de transferências de blastocistos relativamente a transferências de embriões em fase de clivagem, pelo que o último é mais recomendado em casos de baixo número de embriões disponíveis no ciclo (181).

Relativamente à qualidade morfológica, os embriões são selecionados conforme a classificação atribuída, tendo prioridade aqueles com melhor categoria.

Outro parâmetro a ter em conta na seleção de um embrião para transferência é o seu ritmo de desenvolvimento, em particular, se atingiu a fase de blastocisto a dia 5 ou apenas a dia 6.

Atualmente, a evidência científica aparenta ser algo contraditória. Diversos estudos sugeriram uma superioridade de blastocistos de dia 5 relativamente a blastocistos de dia 6, tanto para a taxa de gravidez clínica como para a taxa de nados vivos (182-187). Esta desvantagem dos blastocistos de dia 6 foi associada à sua maior relação com aneuploidia (123). No entanto, mesmo considerando blastocistos de dia 5 e de dia 6 euploides, os blastocistos de dia 5 continuaram a apresentar vantagem (186), o que indica que poderão existir outros fatores associados ao ritmo de desenvolvimento que implicam um menor potencial embrionário.

Por outro lado, algumas investigações apontaram uma similaridade das taxas de gravidez clínica e de nados vivos entre blastocistos de dia 5 e de dia 6, em particular para qualidades embrionárias semelhantes (121, 188-191).

Sendo assim, a norma dos centros de PMA é atribuir prioridade de transferência a embriões com ritmo de desenvolvimento normal, considerando qualidades morfológicas semelhantes.

Curiosamente, *Hu et al.* demonstrou desfechos clínicos similares ao comparar blastocistos de dia 6 de boa qualidade com blastocistos de dia 5 de má qualidade, sugerindo assim que estes apresentam o mesmo potencial (192). Já *Shi et al.* descreveu uma superioridade de blastocistos de dia 6, nomeadamente na taxa de nados vivos, quando estes apresentavam qualidade embrionária superior a blastocistos de dia 5,

sugerindo que a qualidade do blastocisto tem um impacto maior sobre os parâmetros clínicos do que o seu ritmo de desenvolvimento (193).

Deste modo, não há ainda um consenso quanto ao impacto do ritmo de desenvolvimento embrionário nos desfechos clínicos de um ciclo e quanto à sua importância relativamente à qualidade embrionária, em casos em que os embriões apresentem qualidades embrionárias diferentes, particularmente, em casos de ciclos que apresentem um blastocisto de dia 6 com qualidade embrionária superior a um blastocisto de dia 5.

Assim, no presente relatório de estágio pretendeu-se obter um melhor esclarecimento do potencial relativo dos blastocistos de diferente ritmo de desenvolvimento. Para isso, foram selecionados casos de *freeze-all* e foi estudado o processo desde a obtenção dos gametas até ao desenvolvimento dos blastocistos. Foi ainda realizada uma comparação dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6 no que respeita a parâmetros laboratoriais e clínicos.

Materiais e Métodos

1. Processamento laboratorial

1.1. Recuperação e processamento dos gametas femininos

Como preparação para recolha dos gametas femininos, é criado um protocolo de estimulação ovárica adequado a cada paciente. O protocolo envolve a administração de FSH juntamente com antagonistas da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) ou, em casos de protocolo longo, com agonistas de GnRH.

É realizada uma monitorização ecográfica que visa confirmar a existência de pelo menos 3 folículos ovários com diâmetro máximo superior a 17 mm. Após confirmação, é interrompida a administração de FSH e dos antagonistas/agonistas de GnRH, e é administrada hormona coriônica humana (hCG) para maturação final dos folículos.

36 horas após a administração da hCG é realizada a punção folicular para recolha dos ovócitos. A punção folicular é realizada com sedação, por via vaginal. É utilizada uma sonda vaginal juntamente com uma agulha que permite aspirar o líquido folicular para uma seringa de aspiração que contém meio de lavagem previamente equilibrado a 37 °C.

O líquido folicular é analisado ao esteriomicroscópio numa placa de Petri aquecida, no interior da Câmara de Fluxo Laminar Vertical. Os complexos CCO são identificados e recuperados para placas de lavagem, onde se retira, com auxílio de agulhas, a maioria das células das camadas da granulosa.

Os complexos CCO são depois transferidos para uma placa de cultura previamente preparada com meio de fertilização coberto por óleo mineral, e guardados na estufa a 37 °C, 6 % CO₂ e 5 % O₂.

Os ovócitos determinados para ICSI são desnudados 3,5 horas após a punção folicular, numa placa de desnudação, com 100 µL de enzima hialuronidase recombinante humana previamente equilibrada. De seguida, os ovócitos são submetidos a desnudação mecânica recorrendo a sucessivas aspirações com uma pipeta de desnudação. A qualidade e maturação dos ovócitos é depois avaliada, sendo separados para a placa de cultura aqueles que se encontram em metáfase II.

1.2. Processamento dos gâmetas masculinos

No mesmo dia da punção da mulher, ocorre a colheita de espermatozoides do respetivo parceiro, por masturbação. A amostra é mantida a temperatura ambiente durante o período de liquefação, que corresponde a aproximadamente 30 minutos. Após este período, a amostra é avaliada macroscopicamente e microscopicamente. A avaliação microscópica é realizada com recurso a uma câmara de Makler e a um microscópio de contraste de fase.

A amostra é depois processada por densidade de gradientes, o que permite a concentração e a separação dos espermatozoides do líquido seminal. O volume da colheita é adicionado a um tubo de centrifuga, com 1 mL de cada um dos gradientes (40 % (v/v) e 80 % (v/v)), que é centrifugado a 1400 rotações por minuto (RPM) por 15 a 20 minutos. O *pellet* resultante é ressuscitado em meio de preparação de espermatozoides (SPM) pré-equilibrado e centrifugado a 1600 RPM por 5 a 10 minutos. O sobrenadante é retirado e ao *pellet* é adicionado SPM. O tubo é posicionado com inclinação de aproximadamente 45 ° num suporte à temperatura ambiente durante 10 a 30 minutos, de forma a ocorrer o *swim-up* dos espermatozoides, isto é, a subida dos espermatozoides com melhor motilidade até à superfície do volume.

A amostra pós-*swim-up* é avaliada e recuperada para um novo tubo no volume apropriado à técnica que se vai realizar.

1.3. Procedimento de cFIV

Na cFIV a inseminação dos ovócitos recuperados ocorre aproximadamente 4 horas após a punção, em placas de cultura com meio de fertilização. A inseminação por cFIV ocorre nos ovócitos não desnudados, isto é, que ainda apresentam as camadas de células da granulosa.

Para isso, no interior de uma Câmara de Fluxo Laminar Vertical, ao esteriomicroscópio, é colocado na placa de cultura com os complexos CCO, um volume calculado de amostra pós-*swim-up* que contém 100 000 espermatozoides/mL.

Ao microscópio invertido, é avaliada a quantidade e motilidade dos espermatozoides na co-cultura, que é depois incubada a 37 °C, 6 % CO₂ e 5 % O₂.

No dia seguinte, é realizada a desnudação mecânica dos ovócitos e confirmada a fecundação, entre 16 e 18 horas após a inseminação.

1.4. Procedimento de ICSI

Para o procedimento de ICSI, preparam-se previamente placas de ICSI, onde ocorrem a manipulação dos gâmetas e o processo de microinjeção. Todo o procedimento de ICSI ocorre no microscópio invertido, com auxílio das pipetas *holding* e ICSI.

Um volume pretendido de amostra pós-*swim-up* é colocado em PVP, um meio viscoso, e incubado por 5 a 10 minutos. Neste intervalo de tempo, os espermatozoides móveis migram para junto das margens do PVP.

Os ovócitos previamente desnudados são colocados em gotas de meio de fertilização.

De seguida, é selecionado um espermatozoide com motilidade e morfologia normais. Com auxílio da pipeta ICSI é realizada uma quebra na cauda do espermatozoide de forma que este se mantenha imobilizado. O espermatozoide é depois aspirado pela cauda.

O ovócito é seguro pela pipeta *holding* e posicionado preferencialmente com o GP às 6 horas ou 12 horas. A pipeta ICSI é introduzida através da zona pelúcida na posição das 3 horas relativamente ao GP. Já no interior do ovócito, a pipeta ICSI é utilizada para aspirar ligeiramente o ooplasma de forma a romper a membrana do ovócito e permitir a subsequente injeção do espermatozoide selecionado.

Terminada a microinjeção, os ovócitos inseminados são transferidos para placas de cultura com meio de cultura adaptado à cultura de embriões em fase de clivagem, coberto por óleo mineral, e incubados a 37 °C, 6 % CO₂ e 5 % O₂.

No dia seguinte, é confirmada a fecundação, entre as 16 e as 18 horas após a inseminação.

1.5. Fecundação e Desenvolvimento Embrionário

A fecundação é confirmada no dia seguinte à inseminação, ao microscópio invertido, com base nos critérios definidos pelo sistema ASEBIR (137). Os zigotos são transferidos para nova placa de cultura, com meio de cultura adaptado à cultura de embriões em fase de clivagem.

Os embriões são depois incubados a 37 °C, 6 % CO₂ e 5 % O₂ até ao dia 3 de desenvolvimento.

O subsequente desenvolvimento dos zigotos é avaliado nos dias seguintes através de uma avaliação morfológica, com base nos critérios do sistema ASEBIR (137). A avaliação é pontual e realiza-se a horas específicas, explicitadas no sistema ASEBIR, com auxílio do microscópio invertido. Para cada dia, registam-se todas as características de relevância e é atribuída uma categoria ao embrião, A, B, C ou D.

Ao dia 3 de desenvolvimento, os embriões em fase de clivagem são transferidos para nova placa de cultura, com meio de cultura adaptado à cultura de embriões em fase blastocisto, coberta por óleo mineral. Os embriões são lavados na nova placa de cultura e distribuídos individualmente pelas gotas de meio, sendo, de seguida, incubados a 37 °C, 6 % CO₂ e 5 % O₂.

Considerando os casos de *freeze-all* retratados no presente relatório de estágio, ao dia 5 de desenvolvimento, todos os blastocistos com categoria A, B e C são criopreservados. Os embriões com má qualidade morfológica, isto é, de categoria D, são descartados. De notar que, ao dia 5 de desenvolvimento, foram descartados embriões de qualidade D que não estavam ainda em fase de blastocisto. Para efeitos de estudo, esses embriões serão considerados como blastocistos de dia 5 de qualidade D, mesmo não sendo blastocistos propriamente ditos.

Os embriões com atraso de desenvolvimento são transferidos para nova placa de cultura com meio adaptado à cultura de embriões em fase de blastocisto, até ao dia seguinte. Neste dia, todos os embriões de qualidade morfológica A, B ou C são criopreservados. Aqueles de má qualidade morfológica são descartados.

Devido à subjetividade da avaliação, as categorias A e B serão agrupadas e consideradas em conjunto para o estudo em questão.

1.6. Criopreservação e Descongelação Embrionária

Em casos *freeze-all*, todos os blastocistos de dia 5 e de dia 6 com boa qualidade morfológica são vitrificados. A vitrificação é realizada segundo o protocolo da Kitazato, com recurso a palhetas Cryotop. Os embriões são depois emersos de imediato em azoto líquido e guardados num contentor apropriado.

Assim que a mulher está preparada para iniciar o ciclo de transferência de embriões criopreservados (TEC), 1 a 2 embriões são escolhidos do *pool* de embriões que foram

congelados no ciclo anterior, para serem desvitrificados segundo protocolo da Kitazato. São escolhidos com preferência os de melhor qualidade morfológica e de ritmo de desenvolvimento normal.

Após a desvitrificação, o embrião é transferido para uma placa de cultura com meio adaptado à cultura de embriões em fase blastocisto. A qualidade embrionária é avaliada ao microscópio invertido logo após a desvitrificação, e re-avaliada passado 1 hora, de forma a confirmar se tem qualidade para realização da transferência.

1.7. Transferência Embrionária

A transferência dos embriões selecionados inicia-se pela passagem dos embriões da placa de cultura para uma placa de transferência com meio de fertilização, para lavagem, e meio adaptado à cultura de embriões em fase blastocisto, para carregamento do cateter. O cateter é carregado com meio, juntamente com os embriões selecionados, e é entregue à equipa médica responsável pela sua deposição na cavidade uterina. Todo o processo é monitorizado por ecografia transabdominal.

No final, o cateter é devolvido ao embriologista que confirma a transferência e certifica que o embrião não ficou retido no cateter.

1.8. Acompanhamento pós-transferência

Após a transferência, as pacientes continuam a ser seguidas para confirmação de gravidez bioquímica e clínica.

A gravidez bioquímica é confirmada através de um doseamento sérico de β -hCG realizado 12 dias após a transferência embrionária.

A gravidez clínica é confirmada 4 semanas após a transferência embrionária, em ultrassonografia, pela presença de saco gestacional intrauterino e deteção de atividade cardíaca fetal.

2. Processamento Estatístico

Os dados utilizados neste trabalho foram recolhidos de 104 ciclos *freeze-all*, realizados no CRI-MR, pertencente ao CHUSJ, com punções iniciadas no intervalo de 2020 a 2024, e que obtiveram pelo menos um embrião de dia 5 ou de dia 6. Foram desconsiderados os ciclos *freeze-all* com objetivo de PGT.

Os casais que realizaram os ciclos em estudo foram caracterizados segundo a sua idade e fator de infertilidade (ovulatório, tubar, endometriose, masculino, inexplicado e outro). A idade foi estudada em termos de média, desvio padrão e intervalos. As mulheres foram ainda divididas em três grupos etários: grupo 1: ≤ 30 anos; grupo 2: 31 a 35 anos e grupo 3: > 35 anos. Os fatores de infertilidade foram analisados quanto à sua frequência e distribuição, e divididos segundo a sua origem, feminina ou masculina.

A taxa de fecundação foi calculada dividindo o número de ovócitos fecundados pelo número total de ovócitos obtidos por punção, para cada mulher. Para cada grupo populacional em estudo, calculou-se a média e desvio padrão da taxa de fecundação. Foi estudada a influência da idade da mulher (considerando os três grupos etários), da técnica de inseminação e dos fatores de infertilidade ovulatório e masculino sobre esta taxa. Foi ainda averiguada uma eventual interação dos fatores idade da mulher e técnica de inseminação sobre este indicador.

Foi, também, calculada a taxa de blastocistos, dividindo o número de blastocistos obtidos sobre o número de ovócitos fecundados, para cada mulher. Para cada grupo populacional em estudo, calculou-se a média e desvio padrão da taxa de blastocistos. A influência da idade da mulher (considerando os três grupos etários) e da técnica de inseminação sobre esta taxa foi analisada. Foi novamente avaliada uma possível interação entre a idade da mulher e a técnica de inseminação.

Para estudar o ritmo de desenvolvimento dos embriões foi considerada a percentagem de blastocistos de dia 6, calculada em função do número total de blastocistos obtidos por mulher. Este indicador foi avaliado em relação ao grupo etário da mulher e à técnica de inseminação. Foi ainda avaliada uma possível interação entre a idade da mulher e a técnica de inseminação, no que respeita a esta percentagem.

Em relação à qualidade embrionária, foi calculada a percentagem de cada categoria de qualidade embrionária (AB, C e D) para blastocistos de dia 5 e de dia 6, dividindo o número de blastocistos de determinado dia com determinada categoria pelo número total de blastocistos desse mesmo dia, para cada mulher. Os valores foram agrupados

de acordo com o grupo populacional em estudo. A influência da idade da mulher e da técnica de inseminação sobre esta percentagem foi analisada.

Finalmente, foi estudada a ocorrência de gravidez bioquímica e clínica e avaliada a sua associação com diversos fatores, nomeadamente o dia e qualidade do blastocisto, a idade da mulher e a técnica de inseminação. Para tal, foram calculadas as taxas de gravidez bioquímica e clínica para cada grupo populacional. Foi, ainda, averiguada uma possível interação entre o dia e a qualidade do blastocisto sobre a ocorrência de gravidez clínica.

Para estas análises foram usados diversos métodos estatísticos. Assim, foi usado o teste exato de Fisher para avaliar uma eventual associação significativa entre duas variáveis categóricas numa tabela de contingência. Este teste mostra alguma robustez mesmo quando as amostras são pequenas e as frequências baixas.

Em situações nas quais os dados estavam estratificados em várias tabelas de contingência, foi utilizado o teste de Cochran-Mantel-Haenszel. Este teste permite a avaliação de associação entre duas variáveis categóricas, enquanto controla e ajusta por uma terceira variável categórica.

Nos casos em que se pretendeu comparar as médias entre grupos populacionais recorreu-se ao teste t de Welch (2 grupos) ou à análise de variância - ANOVA (3 ou mais grupos). Após o teste ANOVA, efetuaram-se comparações dos grupos dois a dois pelo teste *à posteriori* de Tukey.

Estes testes baseiam-se em dois pressupostos fundamentais:

1. A variável, cujas médias estão a ser comparadas, tem uma distribuição normal;
2. As variâncias dos vários grupos que estão a ser comparados são homogéneas.

O teste à normalidade das variáveis foi efetuado mediante o teste Shapiro-Wilk. A homogeneidade das variâncias foi avaliada pelo teste de Levene.

Sempre que o pressuposto de normalidade da distribuição das variáveis não foi atendido, recorreu-se aos testes não paramétricos de Mann-Whitney (2 grupos) ou de Kruskal-Wallis (3 ou mais grupos). Após o teste de Kruskal-Wallis, efetuaram-se comparações dos grupos dois a dois pelo teste *à posteriori* de Dunn.

Foi ainda realizada uma análise de regressão logística ordinal, útil para modelar a relação entre uma variável dependente ordinal e uma variável independente.

Especificamente, a regressão foi aplicada para avaliar a relação entre a qualidade morfológica dos blastocistos (variável dependente ordinal) e o seu dia de desenvolvimento (variável independente).

Toda a análise estatística foi conduzida recorrendo ao software R (194) e os resultados foram considerados estatisticamente significativos sempre que $p < 0,05$.

Resultados

1. Análise Descritiva da População

A idade das mulheres envolvidas nestes ciclos variou entre 23 e 40 anos, tendo como média $33,0 \pm 4,1$ anos. A idade dos homens variou entre 24 e 52 anos, tendo como média $35,4 \pm 5,4$ anos.

As mulheres consideradas para o presente estudo foram divididas em 3 grupos etários (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das mulheres consideradas para estudo por três grupos de idade.

Grupo	Intervalo de Idades	Número de mulheres
Grupo 1	≤ 30	29
Grupo 2	31-35	45
Grupo 3	> 35	30

O grupo 2, com mulheres de idade compreendida entre 31 e 35 anos, representa o maior número de casos, enquanto o grupo 1, com mulheres de idade compreendida entre 23 e 30 anos, representa o menor número de casos.

A frequência dos fatores de infertilidade “ovulatório”, “tubar”, “endometriose”, “masculino”, “inexplicada” e “outro”, encontra-se representada na Figura 10. A classe “outro” representa casos que recorreram a PMA sem ter infertilidade, como por exemplo, casos de inseminação *pós-mortem* e de casais homossexuais e serodiscordantes. Assim sendo, os casos de fator de infertilidade “outro” não serão considerados para o estudo de infertilidade.

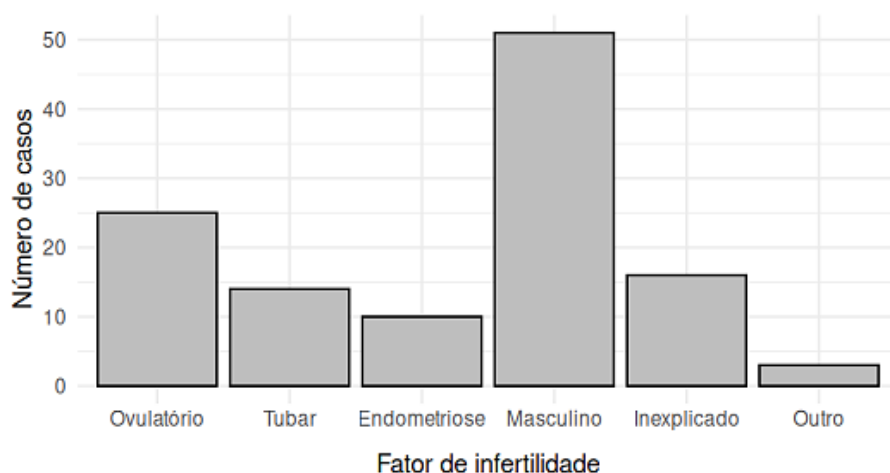


Figura 10. Frequência dos fatores de infertilidade nos casos seleccionados. Cada caso pode envolver um ou mais fatores de infertilidade. A classe “outro” representa casos que recorreram a PMA sem ter infertilidade.

Os fatores de infertilidade mais frequentes são o fator masculino, presente em 51 casos (49,0 %), e o ovulatório, presente em 25 casos (24,0 %). A endometriose é o fator de infertilidade com menos predominância nos casos em estudo, estando representada em apenas 10 dos casos em estudo (9,61 %).

A contribuição dos fatores feminino (ovulatório, tubar, endometriose), masculino e inexplicado para a infertilidade dos casais encontra-se evidenciada na Figura 11.

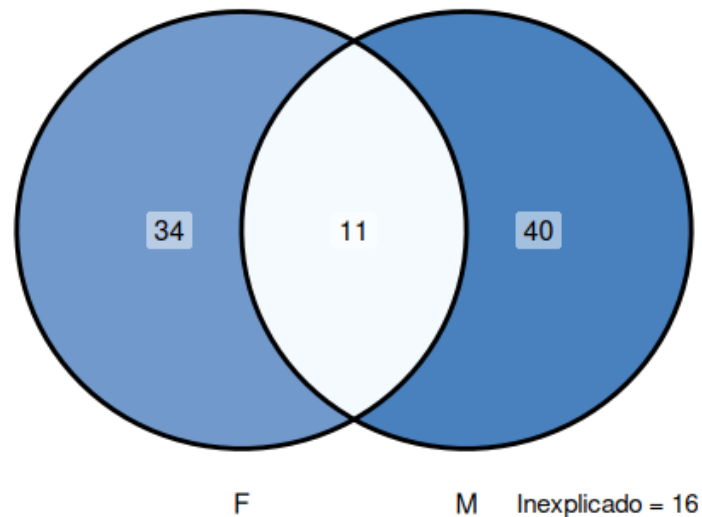


Figura 11. Diagrama de Venn representativo do número de casos com fatores de infertilidade femininos, fator de infertilidade masculino e infertilidade inexplicada. A área de interseção representa casos com fatores de infertilidade simultaneamente femininos e masculino.

40 casos de infertilidade devem-se exclusivamente a fator de infertilidade masculino (39,6 %), enquanto 34 se devem exclusivamente a fator de infertilidade feminino (33,7 %). 11 casos de infertilidade devem-se a uma combinação de fator de infertilidade masculino e feminino (10,9 %) e 16 casais apresentam infertilidade inexplicada (15,8%).

2. Parâmetros laboratoriais

2.1. Fecundação

Pretendeu-se estudar a influência de vários fatores sobre a fecundação dos ovócitos, nomeadamente a idade da mulher, o fator de infertilidade e a técnica de inseminação.

O número de ovócitos obtidos variou entre 4 e 39, com uma média de $18,1 \pm 6,3$ ovócitos obtidos por punção. Em média, $14,4 \pm 6,2$ ovócitos foram submetidos a cFIV, dos quais fecundaram $9,2 \pm 4,7$. Por outro lado, em média, $14,8 \pm 7,2$ ovócitos foram submetidos a ICSI, dos quais fecundaram $8,0 \pm 4,3$. No total, em média, foram fecundados com sucesso $10,5 \pm 4,8$ ovócitos dos obtidos em cada punção, variando entre um mínimo de 2 e um máximo de 22 ovócitos fecundados.

Assim, a média das taxas de fecundação é $59,0 \pm 19,1 \%$, existindo ciclos em que apenas 10% dos ovócitos fecundaram, e ciclos em que a totalidade dos ovócitos obtidos fecundaram.

De modo a estudar a influência da idade da mulher na fecundação dos ovócitos, foram calculadas as médias das taxas de fecundação segundo os grupos etários. O grupo 1 apresenta uma média das taxas de fecundação de $63,0 \pm 17,8 \%$, enquanto o grupo 2 e o grupo 3 apresentam uma média das taxas de fecundação de $62,0 \pm 17,6 \%$ e $50,6 \pm 20,4 \%$, respetivamente (Figura 12).

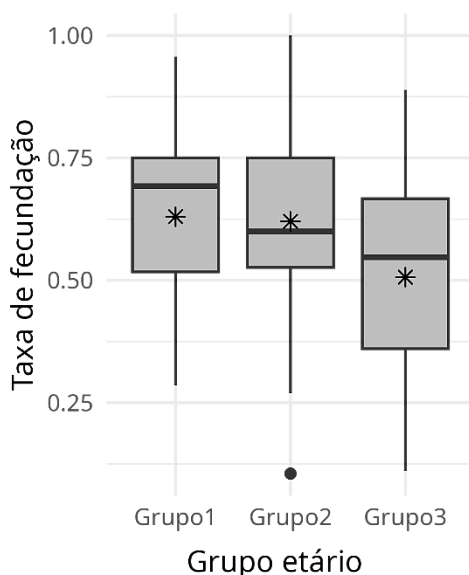


Figura 12. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para os diferentes grupos etários em estudo. A taxa de fecundação foi calculada considerando o número de ovócitos fecundados sobre o número de ovócitos obtidos por punção, por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de fecundação para o respetivo grupo etário.

As diferenças entre as médias das taxas de fecundação por grupo etário foram avaliadas quanto à sua significância estatística. O teste ANOVA revelou diferenças significativas entre os diferentes grupos (g.l. = 2; $F = 4,34$; $p < 0,05$). De facto, o teste par-a-par de Tukey confirmou uma média de taxas de fecundação significativamente inferior no Grupo 3 relativamente ao Grupo 1 e ao Grupo 2 ($p < 0,05$). Assim, infere-se que mulheres de idade mais avançada estão associadas a uma taxa de fecundação menor.

De modo a avaliar uma eventual influência diferencial dos fatores de infertilidade sobre a fecundação, foram calculadas as médias das taxas de fecundação por fator de infertilidade, para grupos de casais com exclusivamente 1 fator de infertilidade (ovulatório, tubar, endometriose, inexplicado, masculino) e para um grupo de casais com mais do que 1 fator de infertilidade, definido como “vários” (Figura 13).

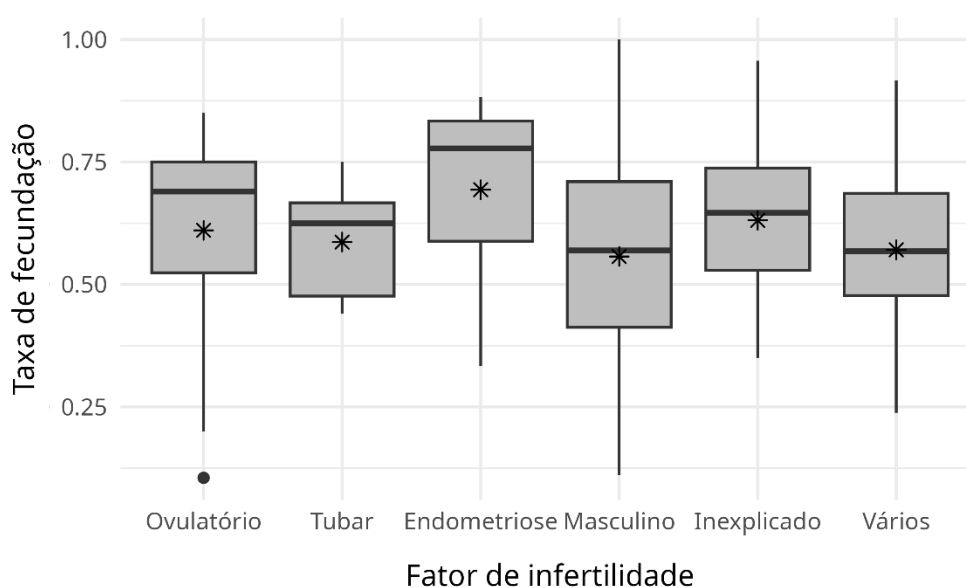


Figura 13. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para os diferentes grupos de fatores de infertilidade. Todos os fatores de infertilidade estão representados por casais que apresentam exclusivamente esse fator. O grupo “vários” é representado por casais com combinação de diferentes fatores de infertilidade. A taxa de fecundação foi calculada considerando o número de ovócitos fecundados sobre o número de ovócitos obtidos por punção, por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de fecundação para o respetivo grupo de fator de infertilidade.

Existe uma tendência para casais com vários fatores de infertilidade ou com fator de infertilidade exclusivamente masculino apresentarem taxas de fecundação ligeiramente mais baixas. No entanto, o teste ANOVA revelou que as diferenças entre os grupos não são estatisticamente significativas (g.l. = 5; $F = 0,95$; $p > 0,05$), pelo que não foi possível verificar uma influência significativa do fator de infertilidade sobre a taxa de fecundação.

Relativamente aos ciclos realizados como tratamento de PMA, a cFIV foi exclusivamente realizada em 32 % dos casos, enquanto a ICSI foi exclusivamente realizada em 44 % dos casos. Em 24 % dos casos foi realizado ciclo misto de cFIV/ICSI. Na Figura 14 encontram-se distribuídos, em número absoluto, os casos de acordo com o ciclo que se aplicou em cada um.

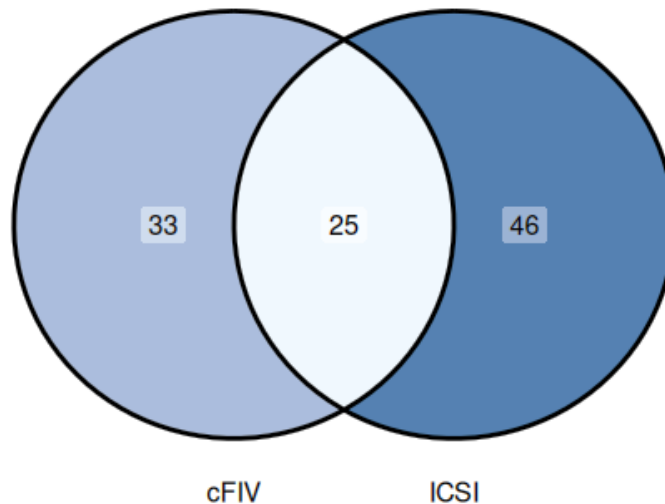


Figura 14. Diagrama de Venn que expõe a relação entre o número de casos em que se realizou cFIV e o número de casos em que se realizou ICSI. A área de interseção representa casos tratados com ciclos mistos cFIV/ICSI.

Pretendeu-se avaliar se a taxa de fecundação é influenciada pela técnica de inseminação, cFIV e ICSI. Para isso, os ovócitos foram divididos conforme a técnica de inseminação a que foram submetidos e, para cada caso, foi calculada a taxa de fecundação por técnica, e realizada a média das taxas de fecundação.

Assim, a cFIV apresenta uma média das taxas de fecundação de $64,7 \pm 20,7 \%$, havendo casos em que apenas 10 % dos ovócitos submetidos a cFIV fecundaram e casos em que todos os ovócitos submetidos a cFIV fecundaram. Já a ICSI está associada a uma média das taxas de fecundação de $55,5 \pm 21,6 \%$, existindo casos em que nenhum dos ovócitos submetidos a ICSI fecundaram e casos em que todos os ovócitos submetidos a ICSI fecundaram (Figura 15).

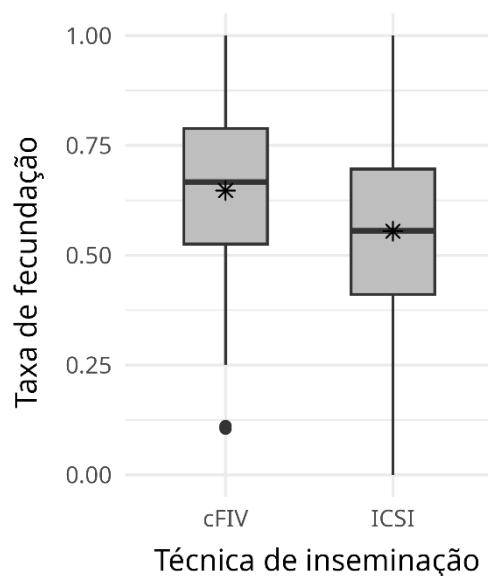


Figura 15. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para as diferentes técnicas, cFIV e ICSI. A taxa de fecundação foi calculada considerando o número de ovócitos fecundados sobre o número de ovócitos obtidos por punção, por técnica, por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de fecundação para a respetiva técnica.

Apesar da média das taxas de fecundação associada à técnica ICSI ser menor do que a média das taxas de fecundação relativa à técnica cFIV, o teste-t de Welch revelou que essas diferenças não são estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

O estudo foi também realizado tendo em conta o grupo etário da mulher, permitindo assim calcular as taxas de fecundação conforme a técnica de inseminação em função da idade da mulher, e inferir a possibilidade de existência de interação entre ambas (Figura 16).

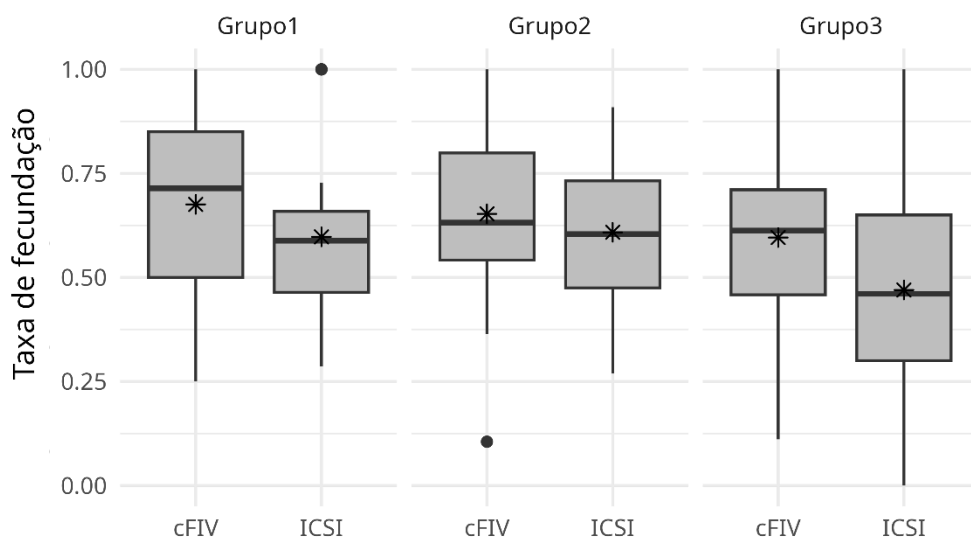


Figura 16. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para as diferentes técnicas, cFIV e ICSI, em função do grupo etário. A taxa de fecundação foi calculada considerando o número de ovócitos fecundados sobre o número de ovócitos obtidos por punção, por técnica, por mulher de cada grupo etário. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de fecundação para a respetiva técnica e grupo etário.

Em todos os grupos etários, a média das taxas de fecundação mostrou ser ligeiramente inferior em casos em que a inseminação foi realizada por ICSI relativamente aos casos em que a inseminação foi realizada por cFIV. No entanto, o teste-t de Welch revelou que essas diferenças não são estatisticamente significativas nos três grupos etários ($p > 0.05$).

Comparando a taxa de fecundação associada à cFIV entre os três grupos etários, verifica-se que o grupo 1 apresenta um valor médio ligeiramente superior. No entanto, o teste ANOVA revelou que essas diferenças não são estatisticamente significativas (g.l.= 2; $F = 0,626$; $p > 0,05$).

Da mesma forma, comparando a taxa de fecundação associada à ICSI entre os três grupos etários, verifica-se que o grupo 3 apresenta um valor médio inferior. No entanto, as diferenças entre estes valores são apenas marginalmente significativas ($p = 0,05$).

Foi ainda avaliada se a taxa de fecundação varia com a técnica de inseminação em casos de ausência de fator de infertilidade masculino (Figura 17). Para isso, foram isolados os casos sem fator de infertilidade masculino, e calculadas as taxas de fecundação conforme a técnica de inseminação.

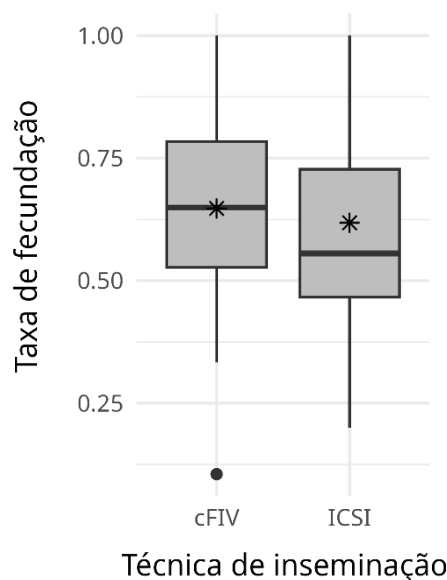


Figura 17. Boxplot relativo à distribuição da taxa de fecundação para as diferentes técnicas de inseminação, cFIV e ICSI, em casos de ausência do fator de infertilidade masculino. A taxa de fecundação foi calculada considerando o número de ovócitos fecundados sobre o número de ovócitos obtidos por punção, por técnica de inseminação, na condição de ausência de fator de infertilidade masculino. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de fecundação para a respetiva técnica de inseminação e na condição de ausência de fator de infertilidade masculino.

Nos casos de ausência de fator de infertilidade masculino, o teste-t de Welch revelou não existirem diferenças significativas entre as médias das taxas de fecundação para as duas técnicas de inseminação ($p > 0,05$), indicando que ambas contribuem de igual forma para a fecundação em casos que não apresentam fator de infertilidade masculino.

2.2. Desenvolvimento Embrionário

Dos 104 casos em estudo resultaram 862 blastocistos, correspondendo a $77,6 \pm 21,5$ % dos ovócitos fecundados. Nesse contexto, existem casos em que apenas 13,3 % dos ovócitos fecundados resultaram em blastocistos e casos em que a totalidade dos ovócitos fecundados resultou em embriões nesta fase de desenvolvimento.

Pretendeu-se, ainda, estudar a influência da idade da mulher e da técnica de inseminação sobre a taxa de blastocistos. Para isso, foram calculadas as médias das taxas de blastocistos para cada grupo populacional.

Assim, mulheres do grupo 1 obtiveram uma média de taxas de blastocistos de $78,5 \pm 23,0$ %, enquanto mulheres do grupo 2 e do grupo 3 obtiveram uma média de $84,1 \pm 17,6$ % e $67,0 \pm 21,9$ %, respetivamente (Figura 18).

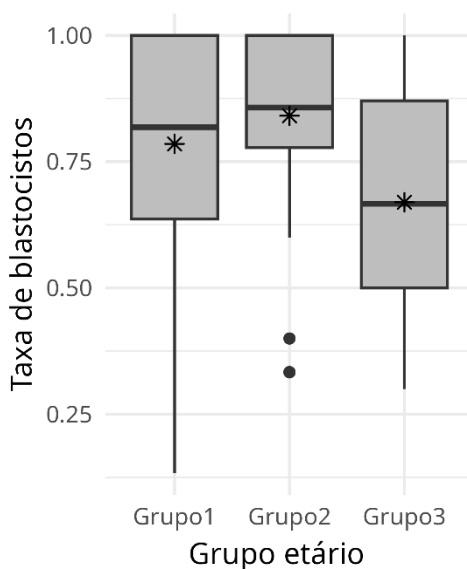


Figura 18. Boxplot relativo à distribuição da taxa de blastocistos para os diferentes grupos etários da mulher. A taxa de blastocistos foi calculada considerando o número de blastocistos sobre o número de ovócitos fecundados por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de blastocistos para o respetivo grupo etário.

O teste de Kruskal-Wallis confirmou que as diferenças entre grupos quanto à taxa de blastocistos são significativas (g.l. = 2; $X^2 = 11,3$, $p < 0,05$).

De facto, mulheres do grupo 3, de idade mais avançada, aparentam ter um menor número de blastocistos a partir dos seus ovócitos fecundados, relativamente a mulheres do grupo 1 e do grupo 2. O teste par-a-par de Dunn confirmou uma diminuição significativa desta taxa no grupo 3 relativamente ao grupo 2 ($p < 0,05$), e uma diminuição marginalmente significativa relativamente ao grupo 1 ($p = 0,05$).

Relativamente à técnica de inseminação, a média da taxa de blastocistos em mulheres com inseminação por cFIV foi de $77,5 \pm 25,2$ % enquanto nas mulheres que realizaram ICSI foi de $78,8 \pm 20,6$ % (Figura 19).

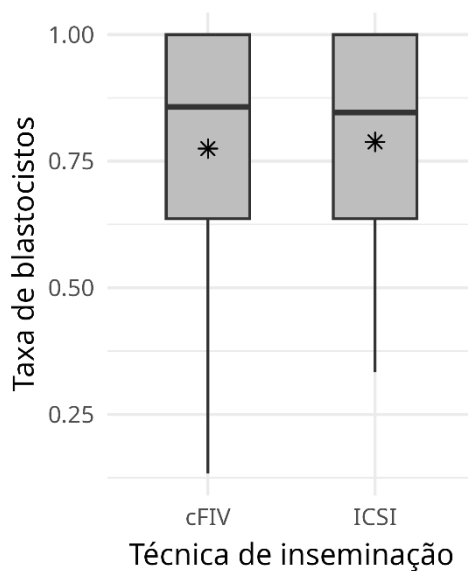


Figura 19. Boxplot relativo à distribuição da taxa de blastocistos para as diferentes técnicas de inseminação. A taxa de blastocistos foi calculada considerando o número de blastocistos sobre o número de ovócitos fecundados por técnica, por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de blastocistos para a respetiva técnica de inseminação.

Pelo teste de Mann-Whitney confirma-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre a taxa de blastocistos de casos nos quais os ovócitos foram inseminados por cFIV e casos nos quais os ovócitos foram inseminados por ICSI ($W = 19991,5$; $p > 0,05$).

De forma a averiguar uma possível interação entre a técnica de inseminação e a idade da mulher, foram calculadas taxas de blastocistos por técnica de inseminação em função do grupo etário (Figura 20).

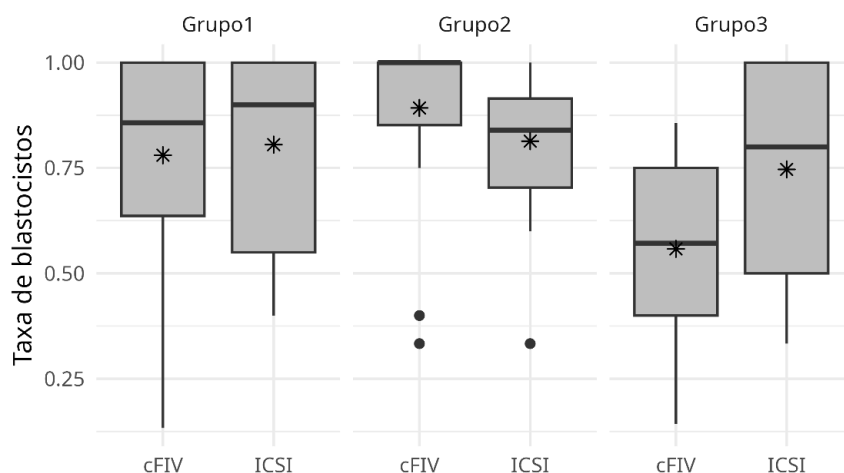


Figura 20. Boxplot relativo à distribuição da taxa de blastocistos para as diferentes técnicas de inseminação em função do grupo etário da mulher. A taxa de blastocistos foi calculada considerando o número de blastocistos sobre o número de ovócitos fecundados, por técnica de inseminação, por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da taxa de blastocistos para a respetiva técnica de inseminação para cada grupo etário.

A taxa de blastocistos do grupo cFIV aparenta variar em relação à taxa de blastocistos do grupo ICSI conforme o grupo etário. De facto, o teste Mann-Whitney revelou que considerando o grupo 1 não existem diferenças significativas entre as taxas de blastocistos dos grupos cFIV e ICSI ($W = 190$; $p > 0,05$). No entanto, revelou um aumento significativo da taxa de blastocistos do grupo cFIV em relação ao grupo ICSI no grupo 2 ($W = 413$; $p < 0,05$) e, pelo contrário, uma diminuição significativa da taxa de blastocistos do grupo cFIV em relação ao grupo ICSI no grupo 3 ($W = 86$; $p < 0,05$).

Comparando a taxa de blastocistos do grupo cFIV por grupo etário verifica-se que existem diferenças significativas, de acordo com o teste de Kruskal Wallis (g.l.= 2; $X^2 = 16,6$; $p < 0,05$). Especificamente, o teste par-a-par de Dunn revelou uma diminuição significativa na taxa de blastocistos do grupo cFIV no grupo 3 relativamente ao grupo 1 e ao grupo 2 ($p < 0,05$). Em relação à taxa de blastocistos do grupo ICSI verifica-se que não existem diferenças significativas entre os grupos etários (g.l. = 2; $X^2 = 1,1$; $p > 0,05$).

Para além disso, pretendeu-se avaliar separadamente os blastocistos de dia 5 e os blastocistos de dia 6. Assim, dos 862 blastocistos considerados para estudo, 432 foram descartados ou vitrificados ao dia 5 (50,1 %), enquanto 430 apresentaram desenvolvimento lento e apenas foram descartados ou vitrificados ao dia 6 (49,9 %). De modo a testar a influência da idade da mulher no ritmo de desenvolvimento dos embriões, foi calculada a percentagem de embriões de dia 6 em função do total de blastocistos obtidos em cada um dos grupos etários (Figura 21).

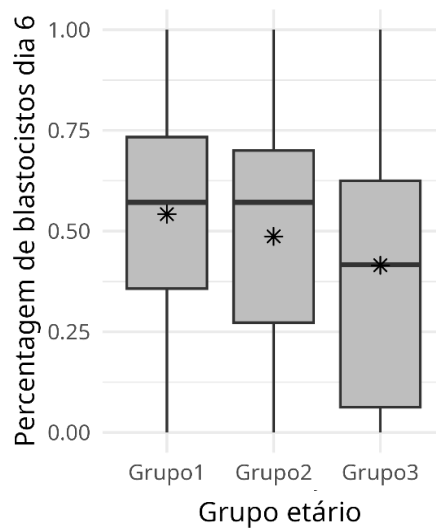


Figura 21. Boxplot relativo à percentagem de blastocistos de dia 6 para os diferentes grupos etários da mulher. A percentagem foi calculada considerando o número de blastocistos de dia 6 sobre o número de blastocistos total para cada mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da percentagem de blastocistos de dia 6 para o respetivo grupo etário.

Apesar da média das percentagens de blastocistos de dia 6 ser inferior no grupo 3, o teste de Kruskal-Wallis não detetou nenhuma diferença significativa entre grupos etários (g.l. = 2; $X^2 = 2,1$; $p > 0,05$), sugerindo que a idade da mulher não tem influência no ritmo de desenvolvimento do embrião.

Dos 432 blastocistos de dia 5, 22,3 % foram obtidos por cFIV e 27,8 % foram obtidos por ICSI. Da mesma forma, dos 430 blastocistos de dia 6, 25,5 % foram obtidos por cFIV e 24,4 % foram obtidos por ICSI. De modo a testar a influência da técnica de inseminação no ritmo de desenvolvimento dos embriões, foi calculada a média das percentagens de embriões de dia 6 em casos em que a inseminação foi realizada por cFIV relativamente a casos em que a inseminação foi realizada por ICSI (Figura 22).

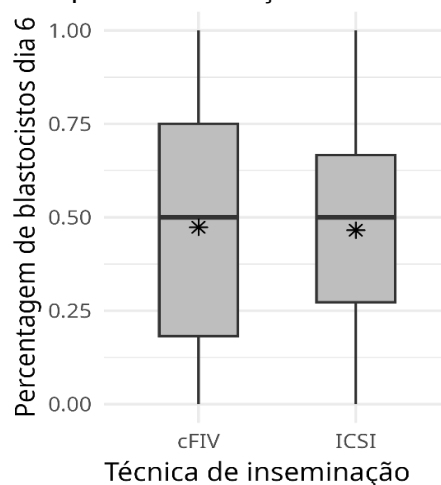


Figura 22. Boxplot relativo à percentagem de blastocistos de dia 6 para as diferentes técnicas de inseminação. A percentagem foi calculada considerando o número de blastocistos de dia 6 sobre o número de blastocistos total para cada técnica de inseminação por mulher. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da percentagem de blastocistos de dia 6 para a respetiva técnica de inseminação.

Pelo teste de Mann-Whitney não foram detetadas diferenças significativas no que diz respeito à percentagem de blastocistos de dia 6 entre os dois grupos ($W = 2032$; $p > 0,05$), sugerindo que as técnicas de inseminação não influenciam diferencialmente o ritmo de desenvolvimento do embrião.

De forma a averiguar uma possível interação entre a técnica de inseminação e a idade da mulher, foram calculadas percentagens de blastocistos de dia 6 por técnica de inseminação em função do grupo etário (Figura 23).

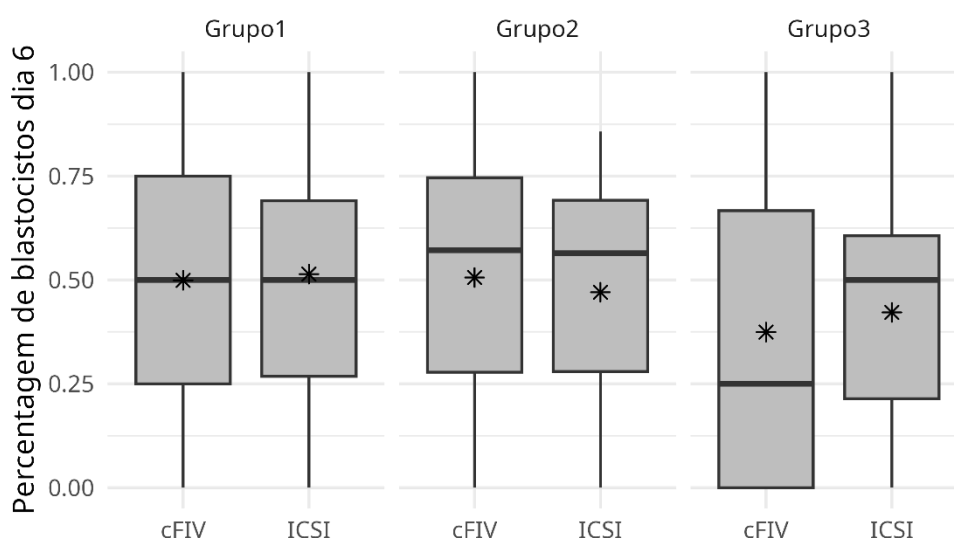


Figura 23. Boxplot relativo à distribuição da percentagem de blastocistos de dia 6 para as diferentes técnicas de inseminação em função do grupo etário da mulher. A percentagem foi calculada considerando o número de blastocistos de dia 6 sobre o número de blastocistos total por técnica de inseminação, para cada mulher de cada grupo etário. A linha e o asterisco apresentados em cada caixa representam a mediana e a média, respetivamente, da percentagem de blastocistos de dia 6 para a respetiva técnica de inseminação, para cada grupo etário.

Para cada grupo etário, o teste Mann-Whitney revelou não existirem diferenças significativas entre as medianas das percentagens dos grupos cFIV e ICSI (Grupo 1: $W = 199$; Grupo 2: $W = 320$; Grupo 3: $W = 145,5$; $p > 0,05$). Mais ainda, tanto o grupo cFIV como o grupo ICSI demonstraram não variar significativamente entre os diferentes grupos etários. Assim, exclui-se a hipótese de existir interação entre a técnica de inseminação e a idade da mulher no que concerne ao ritmo de desenvolvimento do embrião (cFIV: g.l. = 2; $\chi^2 = 1,0$; ICSI: g.l. = 2; $\chi^2 = 0,8$; $p > 0,05$).

2.3. Qualidade Embrionária

Com o objetivo de estudar a associação entre o dia de desenvolvimento em blastocisto e a qualidade embrionária, foi calculada a percentagem de cada categoria de qualidade para os blastocistos de dia 5 e para os blastocistos de dia 6 (Figura 24).

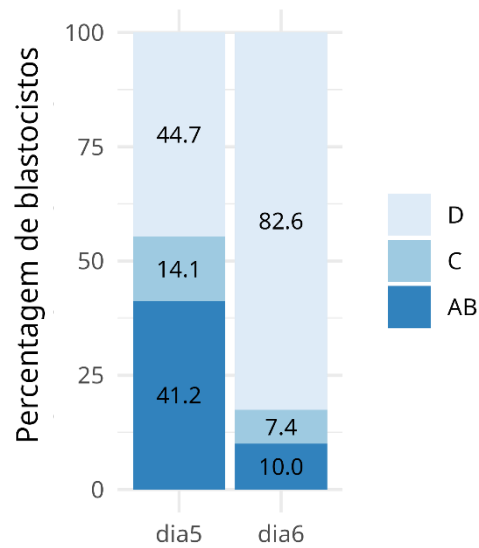


Figura 24. Distribuição percentual da qualidade embrionária dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6. As barras representam as diferentes qualidades embrionárias: AB, C e D.

A partir da Figura 24 é possível constatar uma maior percentagem de embriões de qualidade que permite aproveitamento embrionário (AB+C) no grupo de blastocistos de dia 5 comparativamente ao grupo de blastocistos de dia 6 (55,3 % vs 17,4 %). Particularmente, existe um evidente aumento de embriões de qualidade AB e uma diminuição dos de qualidade D no dia 5 relativamente ao dia 6. De facto, o teste exato de Fisher confirmou uma associação fortemente significativa entre o dia e a qualidade embrionária ($p < 0,001$).

Para além disso, uma análise de regressão logística ordinal foi realizada para avaliar a relação entre a qualidade morfológica dos blastocistos e o seu dia de desenvolvimento (Tabela 2).

Tabela 2. Análise da associação entre o dia de desenvolvimento dos blastocistos e a qualidade morfológica por regressão logística ordinal.

	Coeficiente	t	p
Dia 6	-1,78	-11,3	< 0,001
D C	-0,22	-2,3	0,019
C AB	0,37	3,8	< 0,001

Esta análise permite constatar um decréscimo significativo da qualidade embrionária do dia 5 para o dia 6. Os blastocistos de dia 6 estão associados a piores qualidades morfológicas em comparação aos blastocistos de dia 5, conforme o coeficiente negativo

(-1,78) e um valor de p extremamente significativo ($< 0,001$). Isso sugere que, em média, os blastocistos de dia 6 têm menor probabilidade de ter boas qualidades morfológicas.

De modo a testar a influência da idade da mulher na qualidade embrionária, foi calculada a proporção de qualidade AB, C e D em casos de blastocistos de dia 5 e de dia 6, para cada grupo etário (Figura 25).

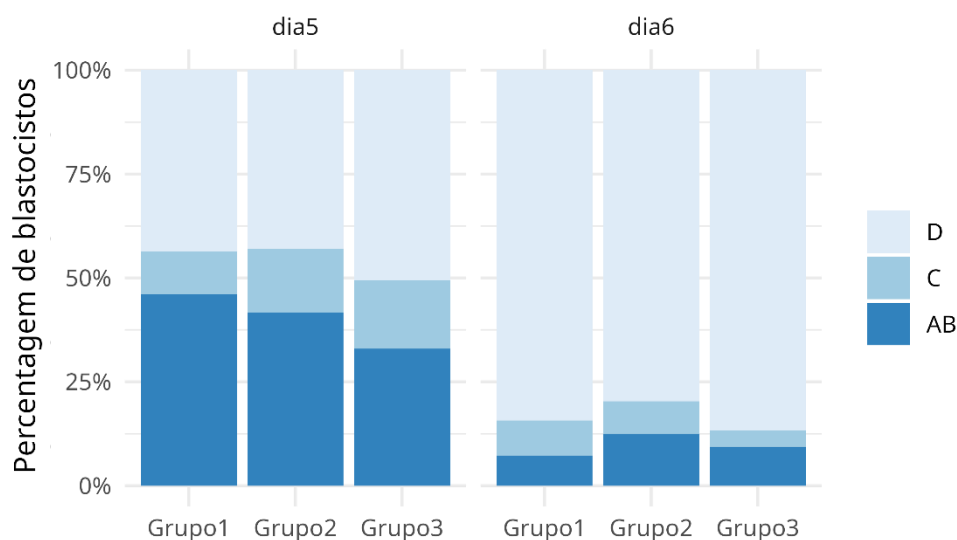


Figura 25. Distribuição percentual da qualidade embrionária dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6, por grupo etário. As barras representam as diferentes qualidades embrionárias: AB, C e D.

O teste Cochran-Mantel-Haenszel permitiu constatar a existência de uma associação global estatisticamente significativa entre a qualidade dos blastocistos e o seu dia de desenvolvimento em blastocisto, considerando os diferentes grupos etários (g.l. = 2; $M^2 = 138,9$; $p < 0,05$). Para identificar os grupos etários em que essa associação é significativa, foram realizados testes exatos de Fisher *a posteriori* por grupo etário, os quais confirmaram que a associação do dia 6 a uma qualidade inferior, previamente observada, é consistente em todos os grupos de idade da mulher ($p < 0,05$).

Para além disso, o teste Cochran-Mantel-Haenszel permitiu verificar que não existe uma associação significativa entre a proporção de qualidade embrionária e o grupo etário, para cada dia (g.l. = 4; $M^2 = 3,9$; $p > 0,05$). Isto sugere que a idade da mulher não afeta a qualidade embrionária em blastocistos de dia 5 e em blastocistos de dia 6.

De modo a testar a influência da técnica de inseminação na qualidade embrionária, foi calculada a proporção de qualidade AB, C e D em casos de blastocistos de dia 5 e de dia 6, para grupos de inseminação realizada por cFIV e para grupos de inseminação realizada por ICSI (Figura 26).

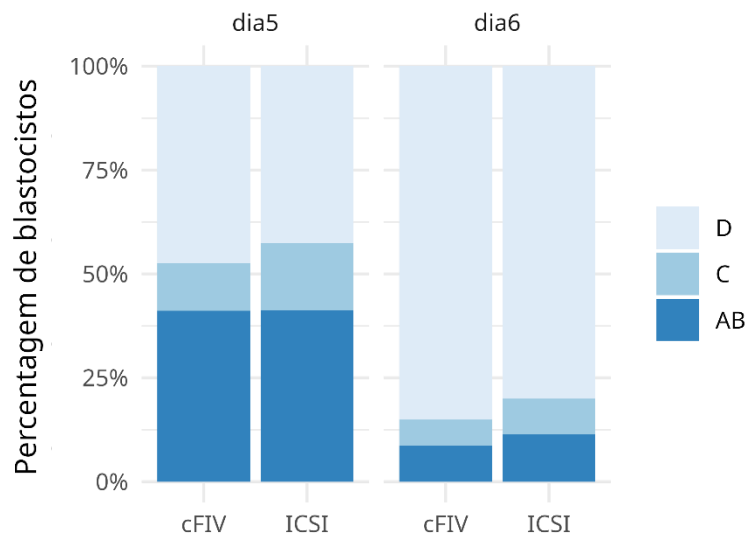


Figura 26. Distribuição percentual da qualidade embrionária dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6, por técnica de inseminação. As barras representam as diferentes qualidades embrionárias: AB, C e D.

Da mesma forma, o teste Cochran-Mantel-Haenszel demonstrou a existência de uma associação estatisticamente significativa entre a qualidade dos blastocistos e o seu dia de desenvolvimento em blastocisto, considerando as diferentes técnicas de inseminação (g.l. = 2; $M^2 = 137,14$; $p < 0,05$). Para cada uma das técnicas de inseminação, foram realizados testes exatos de Fisher *a posteriori*, os quais confirmaram que a associação do dia 6 a uma qualidade inferior, previamente observada, é consistente tanto para casos com inseminação por cFIV como para casos com inseminação por ICSI ($p < 0,05$).

Também para a técnica de inseminação, o teste Cochran-Mantel-Haenszel evidenciou que não existe uma associação significativa com a proporção de qualidade embrionária em cada um dos dias de desenvolvimento em blastocisto (g.l. = 2; $M^2 = 3,7$; $p > 0,05$). Isto sugere que a técnica de inseminação não afeta a qualidade embrionária em blastocistos de dia 5 e em blastocistos de dia 6.

3. Parâmetros Clínicos

Dos 866 blastocistos obtidos, 314 foram vitrificados e 87 foram posteriormente transferidos. Destes, 75 são blastocistos de dia 5 e 12 são blastocistos de dia 6. Na Figura 27 apresenta-se o número de transferências por dia e qualidade dos blastocistos e grupo etário da respetiva mulher.

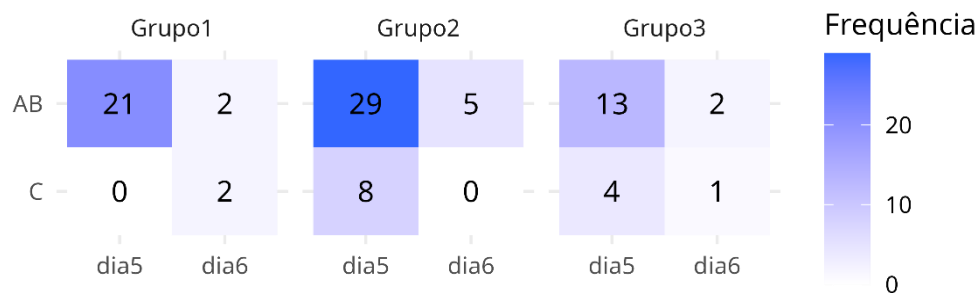


Figura 27. Distribuição do número de blastocistos transferidos de dia 5 e dia 6 em função do grupo etário e da qualidade embrionária (AB e C). A escala de cor é proporcional à frequência dos embriões em cada categoria.

Os grupos com maior número de transferências correspondem a mulheres de grupo 1 e 2, que transferiram blastocistos de dia 5 de qualidade AB. Pelo contrário, os grupos com menor número de transferências correspondem a mulheres que transferiram blastocistos de dia 6, especialmente de qualidade embrionária baixa.

Assim, pretendeu-se avaliar a ocorrência de gravidez bioquímica e clínica considerando a influência dos fatores dia e qualidade dos blastocistos, idade da mulher e técnica de inseminação.

Dos 87 blastocistos transferidos, 52 blastocistos deram origem a gravidez bioquímica positiva, contribuindo para uma taxa de gravidez bioquímica global de 59,8 %. Na Tabela 3 encontra-se a sua distribuição pelos dias de desenvolvimento em blastocisto.

Tabela 3. Contribuição dos blastocistos de dia 5 e de dia 6 para uma gravidez bioquímica negativa e positiva.

Gravidez Bioquímica	Dia 5		Dia 6	
-	29	38,7 %	6	50,0 %
+	46	61,3 %	6	50,0 %

Para os blastocistos de dia 5, uma maior proporção está associada a uma gravidez bioquímica positiva em comparação com a gravidez bioquímica negativa. Já os

blastocistos de dia 6 apresentam uma igual proporção de resultados positivos e negativos. Assim, a taxa de gravidez bioquímica foi ligeiramente superior nos casos em que foram transferidos blastocistos de dia 5.

De modo a avaliar a influência da qualidade embrionária na taxa de gravidez bioquímica, os blastocistos foram ainda distribuídos consoante a sua qualidade embrionária (Tabela 4).

Tabela 4. Contribuição de blastocistos de qualidade AB e C para uma gravidez bioquímica negativa e positiva.

Gravidez Bioquímica	AB		C	
-	27	37,5%	8	53,3%
+	45	62,5 %	7	46,7 %

Os blastocistos de qualidade AB estão associados a uma percentagem de gravidez bioquímica positiva superior relativamente à percentagem de gravidez bioquímica negativa. Os blastocistos de qualidade C apresentam proporções de gravidez bioquímica positiva e negativa similares. Assim, a taxa de gravidez bioquímica foi ligeiramente superior nos casos em que foram transferidos blastocistos de qualidade superior (AB).

Dos 52 blastocistos que resultaram em gravidez bioquímica, 44 avançaram no desenvolvimento e deram origem a gravidez clínica positiva, contribuindo para uma taxa de 50,6 %. A Tabela 5 indica a sua distribuição pelos dias de desenvolvimento em blastocisto.

Tabela 5. Contribuição dos blastocistos de dia 5 e de dia 6 para uma gravidez clínica negativa e positiva.

Gravidez Clínica	Dia 5		Dia 6	
-	36	48,0%	7	58,3%
+	39	52,0 %	5	41,7 %

Os blastocistos de dia 5 apresentam uma percentagem superior para gravidez clínica positiva relativamente a gravidez clínica negativa. Pelo contrário, os blastocistos de dia 6 apresentam uma percentagem inferior para gravidez clínica positiva relativamente a gravidez clínica negativa. Constata-se assim que a taxa de gravidez clínica foi superior nos casos em que foram transferidos blastocistos de dia 5.

A ocorrência de gravidez clínica foi também avaliada tendo em conta a qualidade embrionária (Tabela 6).

Tabela 6. Contribuição de blastocistos de qualidade AB e C para uma gravidez clínica negativa e positiva.

Gravidez Clínica	AB		C	
-	35	48,6%	8	53,3%
+	37	51,4 %	7	46,7 %

Os blastocistos de qualidade AB apresentam uma percentagem superior para gravidez clínica positiva relativamente a gravidez clínica negativa. Pelo contrário, os blastocistos de qualidade C apresentam uma percentagem inferior para gravidez clínica positiva relativamente a gravidez clínica negativa. Assim, constata-se que a taxa de gravidez clínica foi superior nos casos em que foram transferidos blastocistos de qualidade superior.

Apesar das diferenças observadas, o teste exato de Fisher permitiu constatar que não existe uma associação estatisticamente significativa entre a gravidez bioquímica e clínica e os fatores dia e qualidade dos blastocistos ($p > 0,05$).

Considerou-se, também, o dia de desenvolvimento e a qualidade embrionária do blastocisto, em simultâneo. Assim, a partir de testes exatos de Fisher foi possível concluir que os seguintes conjuntos de grupos não demonstraram diferenças significativas no que respeita à gravidez clínica:

1. Blastocistos de dia 5 de qualidade AB e de qualidade C (52,4 % vs 50,0 %; $p > 0,05$);
2. Blastocistos de dia 5 e de dia 6 de qualidade AB (52,4 % vs 44,4 %, $p > 0,05$);
3. Blastocistos de dia 5 de qualidade C e blastocistos de dia 6 de qualidade AB (50,0 % vs 44,4 %; $p > 0,05$).

No entanto, a ausência de associações significativas entre a ocorrência de gravidez e os fatores considerados deverá ser encarada com prudência devido à baixa amostragem de transferências de blastocistos de dia 6 e de blastocistos de qualidade C, assim como da sua disparidade com o número de transferências de blastocistos de dia 5 e de blastocistos de qualidade AB.

Adicionalmente, foi avaliada individualmente a influência da idade da mulher e da técnica de inseminação na taxa de gravidez bioquímica e na taxa de gravidez clínica.

Os testes exatos de Fisher revelaram não existirem associações significativas entre a gravidez bioquímica e clínica e os grupos etários, assim como entre a gravidez bioquímica e clínica e a técnica de inseminação (cFIV e ICSI) ($p > 0,05$).

Discussão

A ausência de consenso quanto ao potencial de blastocistos de dia 6, com ritmo de desenvolvimento lento, relativamente a blastocistos de dia 5, levanta dúvidas quanto à sua seleção no contexto de uma transferência embrionária. Assim, ainda que os centros de PMA permitam, de um modo geral, a transferência de blastocistos de dia 5 e de dia 6, a dúvida na seleção do embrião mais apto a transferir mantém-se, especialmente na presença de um blastocisto de dia 6 de qualidade embrionária superior a um blastocisto de dia 5.

No presente relatório de estágio foi realizada uma comparação de blastocistos de dia 5 e blastocistos de dia 6 no que respeita a parâmetros laboratoriais e clínicos, com o objetivo de esclarecer a dúvida na seleção de um embrião para transferência.

Assim, foram selecionados casos de *freeze-all* e foi estudado todo o processo desde a obtenção dos gametas ao desenvolvimento embrionário e os resultados de gravidez.

Relativamente à estratégia *freeze-all*, os grupos menos representados são o grupo 1 e o grupo 3, que correspondem às mulheres mais novas e às mulheres de idade mais avançada, respetivamente. O baixo número de mulheres mais novas em tratamento *freeze-all* pode estar associado ao facto de, atualmente, os casais começarem a tentar engravidar em idades mais avançadas e, daí, a necessidade de tratamentos de PMA surgir mais tarde (14). Por outro lado, mulheres de idade mais avançada têm, no geral, menos risco de síndrome de hiperestimulação ovárica (195), não apresentando, por isso, uma necessidade tão notável de recorrer à estratégia *freeze-all*.

Relativamente aos fatores de infertilidade, os casais deste estudo refletem o panorama geral (15). Especificamente, o número de casos com fator exclusivamente masculino é semelhante ao número de casos com fator exclusivamente feminino, representando uma contribuição equilibrada do homem e da mulher para a infertilidade. Mais ainda, o fator ovulatório destacou-se também aqui como o mais predominante nas mulheres, com o fator tubar e a endometriose correspondendo a um menor número de casos. No entanto, parte deste valor elevado relativamente ao fator ovulatório parte do facto de que mulheres com alterações na ovulação apresentam frequentemente uma resposta exacerbada à medicação e são, por isso, reencaminhadas para realizar *freeze-all*.

Como já reportado em estudos anteriores (15), a infertilidade inexplicada representa aproximadamente 15% dos casos. Uma percentagem mais pequena deve-se a casais

com infertilidade tanto feminina como masculina. Assim, conclui-se que a realidade da infertilidade global está transcrita no grupo de casais selecionados para este estudo.

A necessidade de recorrer à estratégia *freeze-all* deve-se regularmente a uma resposta exacerbada dos ovários das mulheres à estimulação ovárica, implicando o desenvolvimento de um grande número de folículos (196). Deste modo, é compreensível que, nos casos analisados, a média de ovócitos obtidos por punção seja elevada.

No entanto, um número elevado de ovócitos não implica uma elevada taxa de fecundação. De facto, esta é influenciada por outros fatores, como a idade. Mulheres com mais de 35 anos apresentaram uma taxa de fecundação menor relativamente a mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos. Tal está de acordo com estudos publicados que reportaram alterações moleculares, celulares e morfológicas nos ovócitos dependentes do avançar da idade. Estas alterações contribuem para o declínio da qualidade ovocitária e, subsequentemente, da fertilização (197).

Pelo contrário, a fecundação mostrou não estar relacionada com nenhum fator de infertilidade em específico. Seria de esperar que os fatores de infertilidade associados diretamente aos gametas envolvidos na fertilização, isto é, o fator ovulatório e o fator masculino, estivessem associados a uma taxa de fecundação inferior. O fator ovulatório é, nestes casos, contornado com um protocolo de estimulação ovárica, o que pode justificar as semelhanças da respetiva taxa de fecundação com as taxas de fecundação associadas a outros fatores. Relativamente ao fator masculino, a ausência de diferenças significativas na taxa de fecundação pode dever-se ao facto de, na grande maioria dos casos com fator masculino grave, a inseminação ser realizada por ICSI, envolvendo, por isso, a escolha de um espermatozoide de boas características (95).

A inseminação foi realizada recorrendo às técnicas de inseminação *in vitro*, cFIV e ICSI. As duas técnicas não divergiram significativamente quanto à taxa de fecundação associada, mesmo quando distribuídas segundo o grupo etário da respetiva mulher.

Especificamente, para mulheres acima dos 35 anos, foram publicados vários estudos que demonstram a ausência de diferenças significativas entre as duas técnicas (198, 199). No presente estudo, essa ausência mantém-se, ainda que a cFIV aparente ter uma certa tendência para apresentar valores superiores de taxa de fecundação relativamente à ICSI. Esta ligeira diferença poderá ser justificada pelo facto da cFIV permitir a competição e seleção natural do espermatozoide mais compatível com o ovócito. Por outro lado, a ICSI envolve não só a escolha apenas visual de um espermatozoide pelo embriologista, mas também o risco de provocar danos no ovócito

aquando da sua microinjeção, o que é especialmente crítico considerando ovócitos envelhecidos (200, 201).

Ainda assim, nas últimas décadas as taxas de uso da ICSI têm aumentado rapidamente em desfavorecimento das taxas de uso da cFIV, uma vez que a sua utilização se tem ampliado para além dos casos com fator de infertilidade masculino (93, 202). No presente estudo, a taxa de fecundação associada às duas técnicas de inseminação foi avaliada em casos de ausência de fator de infertilidade masculino, tendo-se confirmado que, de facto, a ICSI não tem vantagem sobre a cFIV nestes casos.

Aproximadamente 78% dos ovócitos fecundados deram origem a embriões em fase de blastocisto, o que corresponde a uma percentagem relativamente alta em comparação com o descrito em artigos já publicados (151). Aqueles que não se desenvolveram até à fase de blastocisto poderão ter sido vitrificados em fases de desenvolvimento anteriores, como a fase de clivagem, ou descartados por má qualidade.

Mulheres com idade superior a 35 anos obtiveram menos blastocistos comparativamente a mulheres com idade igual ou inferior a 35 anos, o que reflete a menor taxa de fecundação já registada para estas mulheres. Este resultado é suportado por *Sainte-Rose et al.* que registou uma diminuição da taxa de blastocistos global com o avançar da idade materna (203). Neste estudo, contudo, as taxas de blastocistos globais são inferiores às aqui registadas. Tal pode ser justificado pelo facto de, no presente relatório, terem sido também considerados os embriões de categoria D que não se apresentavam ainda em fase de blastocisto ao dia 5, o que por si, aumenta o número global de blastocistos registado por caso.

Considerando a técnica de inseminação, a taxa de blastocistos variou precisamente nas mulheres acima dos 35 anos. Neste grupo etário, curiosamente, a taxa de blastocistos foi significativamente inferior no grupo cuja inseminação foi realizada por cFIV. Deste modo, esta diminuição no grupo cFIV parece ser a causa da diminuição na taxa de blastocistos global das mulheres com idade superior a 35 anos. Tal contrasta com a taxa de fecundação superior registada anteriormente para esta técnica de inseminação. Isto significa que, apesar dos casos inseminados por cFIV apresentarem um maior número de ovócitos fecundados, houve um menor desenvolvimento destes até à fase de blastocisto, ou seja, houve uma maior percentagem de embriões descartados ou congelados em fases de desenvolvimento anteriores. Não existe particular tendência para escolher criopreservar embriões de cFIV de mulheres de idade avançada em fases de desenvolvimento anteriores, pelo que se pode assumir esta

diminuição da taxa de blastocistos como sendo consequência do descarte dos embriões por má qualidade embrionária.

Assim, parece existir uma correlação entre a cFIV realizada em ovócitos de mulheres de idade avançada e uma pior qualidade embrionária em fases de desenvolvimento iniciais. No entanto, artigos previamente publicados admitem não existir vantagem da ICSI em relação à cFIV no que respeita a mulheres de idade avançada (204). Especificamente, *Haas et al.* concluiu não existirem diferenças significativas entre técnicas de inseminação no que respeita à qualidade dos embriões em fase de clivagem de mulheres em idade avançada (198).

Por outro lado, no grupo de mulheres de idade compreendida entre os 30 e os 35 anos, a taxa de blastocistos foi significativamente superior quando a inseminação foi realizada por cFIV. Tal poderá indicar uma menor percentagem de embriões descartados em fases de desenvolvimento anteriores em casos de inseminação por cFIV, possivelmente derivada da própria condição mais fisiológica na qual ocorreu a inseminação.

Para melhor esclarecer este contraste de resultados, deverão ser realizados estudos posteriores focados na criopreservação e descarte dos embriões em fases anteriores de desenvolvimento, no presente conjunto de casos.

Curiosamente, as proporções de blastocistos de dia 5 e de dia 6 são aproximadamente 50%, o que significa que perto de metade dos embriões de dia 5 apresentam desenvolvimento tardio e são deixados em cultura prolongada até dia 6. Estas proporções parecem não variar com a idade. De facto, mulheres mais jovens e mulheres de idade avançada apresentaram uma percentagem semelhante de embriões de dia 6. Tal indica que a idade da mulher não tem influência no ritmo de desenvolvimento dos embriões, o que está de acordo com o descrito em artigos já publicados (203).

Por outro lado, as proporções também não variaram de acordo com a técnica de inseminação. De facto, o grupo com inseminação por cFIV apresentou uma proporção de embriões de dia 6 semelhante ao grupo com inseminação por ICSI, mesmo quando distribuídos por idade da mulher. Tal indica que a técnica de inseminação não tem influência no ritmo de desenvolvimento dos embriões, o que vai de encontro a estudos previamente publicados (205).

Apesar da proporção semelhante, os blastocistos de dia 5 e os blastocistos de dia 6 apresentam uma evidente divergência na sua qualidade embrionária. De facto, os

blastocistos de dia 5 de boa qualidade são bem mais abundantes do que os blastocistos de dia 6. Naturalmente, os blastocistos de dia 6 estão mais associados a categoria D, ou seja, a pior qualidade, e são descartados com mais frequência. Desta forma, há um aproveitamento embrionário muito superior associado aos blastocistos de dia 5 relativamente aos blastocistos de dia 6. Apenas aproximadamente 17 % dos blastocistos de dia 5 em cultura prolongada são recuperados em termos de aproveitamento a dia 6. Considerando que o ritmo de desenvolvimento embrionário está intimamente interligado com a qualidade embrionária, uma possível explicação para a pior qualidade dos blastocistos de dia 6 reside precisamente no facto de os blastocistos de dia 6 resultarem de embriões de dia 5 com ritmo de desenvolvimento lento, ou seja, embriões que ao dia 5 se apresentavam em fase de compactação ou de blastocisto inicial.

A divergência de qualidade entre os blastocistos de dia 5 e de dia 6 manteve-se mesmo considerando diferentes grupos de idade. Mais ainda, as proporções de qualidade tanto dos blastocistos de dia 5 como dos blastocistos de dia 6 não se alteraram conforme a idade da mulher. Isto indica que a idade materna não influencia a qualidade dos blastocistos e que mulheres de idade mais avançada, mesmo estando associadas a ovócitos mais envelhecidos, não produzem embriões de pior qualidade. De facto, *Saint-Rose et al.* reportou uma taxa de blastocistos de boa morfologia semelhante entre grupos de idade. Em particular, concluiu uma ausência de associação entre a idade da mulher e a organização da TE e da MCI dos blastocistos (203).

Para além disso, não foram registadas diferenças de qualidade entre blastocistos de inseminação por cFIV e de inseminação por ICSI, o que indica que a técnica de inseminação não apresenta influência sobre a qualidade dos blastocistos, sejam estes de dia 5 ou de dia 6. Este resultado vai de encontro ao estudo de *Landuyt et al.*, que indicou a ausência de diferenças significativas entre as técnicas no que respeita a originarem blastocistos de boa qualidade. Adicionalmente, confirmou que esta ausência se mantém mesmo tendo em conta a idade materna (205). No presente estudo, a qualidade embrionária não foi testada considerando simultaneamente a técnica de inseminação e a idade materna. No entanto, esse teste traz relevância e deverá ser conduzido no futuro, de modo a averiguar, nos casos seleccionados, se esta ausência também se regista ou se há novamente uma associação da cFIV com a idade materna avançada no que respeita à qualidade embrionária.

Por norma, os centros de PMA permitem a transferência de blastocistos de dia 6, ainda que estes embriões apresentem um ritmo de desenvolvimento mais lento do que

se esperaria. No entanto, a prioridade é atribuída a blastocistos de dia 5, sempre que estes apresentem qualidade embrionária igual ou superior a blastocistos de dia 6.

Assim, considerando as diferenças de qualidade embrionárias registadas no presente estudo, o número superior registado para transferências de blastocistos de dia 5 relativamente a transferências de blastocistos de dia 6 vai de encontro ao esperado. Da mesma forma, para o mesmo dia de desenvolvimento, é dada prioridade a transferências de blastocistos de categoria A e B relativamente a blastocistos de categoria C, o que justifica a disparidade numérica das transferências em termos de categorias de qualidade embrionária.

Estas disparidades, juntamente com a baixa amostragem de transferências de blastocistos de dia 6 e de blastocistos de categoria C, retiram poder estatístico aos testes efetuados. Por esse motivo, não é possível concluir com certeza a associação dos resultados clínicos com o ritmo de desenvolvimento e a qualidade embrionários. Assim, ainda que os resultados sejam não significativos, existem algumas tendências que deverão ser estudadas posteriormente com uma maior amostragem.

Especificamente, existe uma tendência para blastocistos de dia 5 estarem associados a uma taxa de gravidez global superior, tanto bioquímica como clínica, relativamente a blastocistos de dia 6. Mais ainda, comparando blastocistos de dia 5 e de dia 6 de boa qualidade, parece haver uma tendência para os blastocistos de dia 5 apresentarem melhores resultados em termos de gravidez clínica. Não foi possível concluir se este resultado se mantém considerando blastocistos de dia 5 e de dia 6 de baixa qualidade devido ao baixo número de casos de amostragem.

Vários artigos previamente publicados focaram-se nos resultados clínicos de transferências de blastocistos de dia 5 e de dia 6. Muitos reportaram uma vantagem de blastocistos de dia 5 relativamente a dia 6 no que respeita a gravidez bioquímica e clínica (182, 183, 184, 185), o que sustenta a tendência registada nos resultados do presente relatório. Foi publicada ainda uma meta-análise que destacou os resultados clínicos considerando vários tipos de ciclos de transferência. Em ciclos de transferência de embriões previamente criopreservados, concluiu que, de facto, transferências de blastocistos de dia 5 apresentam maiores taxas de gravidez bioquímica e gravidez clínica em comparação com transferências de blastocistos de dia 6 (187). *Taylor et al.* atribuiu esta diferença à taxa de aneuploidia. Blastocistos de dia 6 apresentam uma taxa de aneuploidia superior a blastocistos de dia 5, o que pode afetar o sucesso da implantação e da gravidez (123). No entanto, *Irani et al.* também apresentou resultados clínicos superiores para blastocistos de dia 5, mesmo considerando apenas blastocistos

euploides, concluindo que a aneuploidia não é o único fator intrínseco a afetar o menor potencial dos blastocistos de dia 6 (186).

Assim, sublinha-se que, num *pool* de embriões com blastocistos de diferentes ritmos de desenvolvimento e de qualidades embrionárias semelhantes é aconselhável atribuir prioridade aos blastocistos de ritmo de desenvolvimento normal.

Relativamente à influência da qualidade embrionária sobre os resultados clínicos, é de notar uma tendência para uma maior taxa de gravidez bioquímica e gravidez clínica associada aos blastocistos de qualidade A ou B em comparação com os blastocistos de qualidade C. Este resultado verificou-se, também, ao comparar especificamente blastocistos de dia 5 de categorias A ou B com blastocistos de dia 5 de categoria C. Tal é expectável e foi verificado em artigos previamente publicados (206). Assim, confirma-se que, considerando um *pool* de embriões composto por blastocistos de diferentes qualidades embrionárias e igual ritmo de desenvolvimento, é aconselhável a prioridade daqueles de melhor qualidade embrionária.

No entanto, o *pool* de embriões a partir do qual é selecionado o embrião para transferência apresenta frequentemente blastocistos de diferentes ritmos de desenvolvimento e diferentes qualidades embrionárias. Assim, é relevante a comparação de resultados clínicos entre blastocistos de dia 5 e de dia 6 de diferentes qualidades embrionárias, uma vez que permite determinar a importância do ritmo de desenvolvimento em relação à qualidade embrionária aquando da seleção do embrião com maior potencial.

Deste modo, realizou-se uma comparação de resultados clínicos entre blastocistos de dia 5 de baixa qualidade e blastocistos de dia 6 de boa qualidade. Curiosamente, parece existir uma tendência para blastocistos de dia 5 de baixa qualidade apresentarem melhores resultados relativamente a blastocistos de dia 6 de boa qualidade. Seria interessante averiguar se esta tendência é significativa, uma vez que tal indicaria que o ritmo de desenvolvimento do embrião tem uma maior influência nos resultados clínicos relativamente à respetiva qualidade embrionária, e que, portanto, este deverá ter prioridade no que respeita à seleção do embrião a transferir.

A tendência registada no presente relatório é contrariada por artigos previamente publicados. Por um lado, *Hu et al.* descreveu resultados clínicos semelhantes entre blastocistos de dia 5 de baixa qualidade e blastocistos de dia 6 de boa qualidade, concluindo que estes apresentam o mesmo potencial e que uma boa qualidade embrionária compensa um ritmo de desenvolvimento lento (192). Por outro lado, *Shi et*

al. indicou um maior potencial nos blastocistos de dia 6 de boa qualidade relativamente a blastocistos de dia 5 de baixa qualidade, sugerindo que a qualidade embrionária apresenta mais relevância do que o ritmo de desenvolvimento e que, portanto, esta deverá ter prioridade no que respeita à seleção do embrião a transferir (193).

No entanto, este contraste de resultados deverá ser encarado com cautela. Como já referido, o ritmo de desenvolvimento mais lento inerente aos blastocistos de dia 6 está frequentemente associado a aneuploidia, que afeta a implantação dos embriões (123). Portanto, em estudos em que os blastocistos foram transferidos sem ser determinada a sua ploidia, como é o caso do presente relatório de estágio, os resultados mais negativos associados aos blastocistos de dia 6, incluindo aqueles que apresentam uma qualidade embrionária superior, poderão advir não do ritmo de desenvolvimento por si só, mas sim de uma possível aneuploidia associada. Para garantir um melhor entendimento desta dinâmica será necessário estudar futuramente os resultados clínicos de transferências de blastocistos de dia 5 e de dia 6 especificamente euploides.

Adicionalmente, foi possível estudar a influência da idade da mulher e da técnica de inseminação sobre as taxas de gravidez bioquímica e de gravidez clínica globais. Contrariamente a artigos previamente publicados (49), aqui não se registou a influência da idade sobre os resultados clínicos. Por outro lado, como já confirmado por artigos previamente publicados (207), também aqui não se registou influência da técnica de inseminação sobre estes resultados clínicos. Devido à baixa amostragem não foi possível estudar a variação destes resultados em função da qualidade embrionária e do dia de desenvolvimento em blastocisto. Será, por isso, relevante a revisão deste estudo no futuro, com uma maior amostragem.

Conclusão

Não existe um consenso quanto ao potencial de blastocistos de dia 6 relativamente a blastocistos de dia 5. Particularmente, o impacto do ritmo de desenvolvimento embrionário nos resultados clínicos, relativamente à qualidade embrionária, não se apresenta completamente esclarecido. Deste modo, existe ainda dúvida na seleção para transferência do embrião com mais potencial, especialmente em casos de ciclos que apresentem um blastocisto de dia 6 com qualidade embrionária superior a um blastocisto de dia 5.

Assim, no presente relatório de estágio pretendeu-se obter um melhor esclarecimento do potencial dos blastocistos de diferente ritmo de desenvolvimento. Para isso, foram selecionados casos de *freeze-all* e foi estudado o processo desde a obtenção dos gametas até ao desenvolvimento dos blastocistos. Foi realizada também uma comparação dos blastocistos de dia 5 e dos blastocistos de dia 6 no que respeita a parâmetros laboratoriais e clínicos.

Relativamente à estratégia *freeze-all*, foi verificada uma maior predominância de mulheres de idade compreendida entre 31 e 35 anos, o que confirma a menor propensão das mulheres de idade avançada a hiperestimulação ovárica e o menor recorrer das mulheres mais jovens a tratamentos de PMA.

Verificou-se ainda que a fecundação não é influenciada pela técnica de inseminação, mas, pelo contrário, pela idade da mulher. Particularmente, mulheres de idade avançada apresentaram uma menor taxa de fecundação, o que pode estar relacionado com a respetiva idade ovocitária e subsequente pior qualidade dos ovócitos. Mulheres de idade avançada apresentaram também uma menor taxa de blastocistos, especialmente quando a técnica de inseminação escolhida foi a cFIV, o que indica uma possível correlação entre a cFIV realizada em ovócitos de mulheres de idade avançada e uma pior qualidade embrionária em fases de desenvolvimento iniciais.

Neste estudo, observou-se ainda que o atraso no ritmo de desenvolvimento dos blastocistos é relativamente comum, com cerca de 50% dos embriões a não atingir a fase de blastocisto no dia 5. Naturalmente, os blastocistos de dia 6 foram associados a uma pior qualidade embrionária, com apenas aproximadamente 17 % contribuindo para o *pool* de embriões com aproveitamento. Verificou-se, ainda, que tanto o ritmo de desenvolvimento como a qualidade embrionária não são afetados pela idade materna ou pela técnica de inseminação.

Devido à baixa amostragem de transferências, não foi possível concluir com certeza a influência dos diversos fatores sobre os resultados clínicos. No entanto, registou-se uma aparente influência do ritmo de desenvolvimento e da qualidade embrionária sobre a taxa de gravidez bioquímica e a taxa de gravidez clínica. Especificamente, um ritmo de desenvolvimento mais lento e uma qualidade embrionária mais baixa apresentam uma tendência para estarem associados a piores resultados clínicos. Adicionalmente, foi sugerido que o ritmo de desenvolvimento contribui de forma mais relevante que a qualidade embrionária para o potencial do embrião, e que tal contribuição pode advir de uma associação com a aneuploidia. Assumindo tal, o ritmo de desenvolvimento deverá ser considerado prioritário em relação à qualidade embrionária durante a seleção para transferência de um embrião com ploidia desconhecida.

Perspetivas futuras

O presente estudo é limitado pelo número reduzido de amostras de transferências de blastocistos de dia 6 e de blastocistos de categoria C. Para além da baixa amostragem, existe uma grande disparidade de tamanho de amostra com as transferências de blastocistos de dia 5 e as transferências de blastocistos de categoria AB. Estas disparidades, juntamente com a baixa amostragem, limitam o poder estatístico. Assim, é necessário repetir o estudo considerando um maior número de amostras relativamente a blastocistos de dia 6 e a blastocistos de categoria C.

Adicionalmente, será interessante averiguar se a qualidade embrionária dos blastocistos de dia 6 é influenciada pelo nível de atraso que apresentavam no desenvolvimento ao dia 5. Particularmente, se embriões que no dia 5 se encontravam em fase de compactação estão mais associados a piores qualidades embrionárias no dia 6 relativamente a embriões que se encontravam em fase de blastocisto inicial.

Para além disso, é de considerar que anomalias cromossómicas, que implicam falhas na implantação, são frequentemente a origem do atraso no ritmo de desenvolvimento dos embriões (123). Assim, a taxa de gravidez mais baixa pode ser consequência da aneuploidia associada aos blastocistos de dia 6. Deste modo, será relevante no futuro confirmar as diferenças de euploidia entre blastocistos de dia 5 e de blastocistos de dia 6 e averiguar se blastocistos de dia 6 euploides estão associados a uma taxa de gravidez significativamente diferente ou semelhante relativamente aos blastocistos de dia 5 euploides. Especificamente, determinar se os piores resultados clínicos associados aos blastocistos de dia 6 são derivados de um ritmo de desenvolvimento mais lento ou se estão associados especificamente a anomalias cromossómicas.

Referências Bibliográficas

1. Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11). 2018.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS medicine*. 2012;9(12):e1001356.
3. Chemaitelly H, Majed A, Abu-Hijleh F, Blondeel K, Matsaseng TC, Kiarie J, et al. Global epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in infertile populations: systematic review, meta-analysis and metaregression. *Sexually transmitted infections*. 2021;97(2):157-69.
4. Sharma S, Mittal S, Aggarwal P. Management of infertility in low resource countries. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2009;116:77-83.
5. Organization WH. Infertility prevalence estimates, 1990–2021: World Health Organization; 2023.
6. Luk BH-K, Loke AY. The impact of infertility on the psychological well-being, marital relationships, sexual relationships, and quality of life of couples: A systematic review. *Journal of sex & marital therapy*. 2015;41(6):610-25.
7. Albayrak E, Günay O. State and trait anxiety levels of childless women in Kayseri, Turkey. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*. 2007;12(4):385-90.
8. Noorbala AA, Ramezanzadeh F, Abedinia N, Naghizadeh MM. Psychiatric disorders among infertile and fertile women. *Social psychiatry and psychiatric epidemiology*. 2009;44:587-91.
9. Dyer S, Lombard C, Van der Spuy Z. Psychological distress among men suffering from couple infertility in South Africa: a quantitative assessment. *Human reproduction*. 2009;24(11):2821-6.
10. Gao J, Zhang X, Su P, Liu J, Shi K, Hao Z, et al. Relationship between sexual dysfunction and psychological burden in men with infertility: a large observational study in China. *The journal of sexual medicine*. 2013;10(8):1935-42.
11. Ho TTT, Le MT, Truong QV, Nguyen VQH, Cao NT. Psychological burden in couples with infertility and its association with sexual dysfunction. *Sexuality and Disability*. 2020;38(1):123-33.
12. Beaurepaire J, Jones M, Thiering P, Saunders D, Tennant C. Psychosocial adjustment to infertility and its treatment: male and female responses at different stages of IVF/ET treatment. *Journal of psychosomatic research*. 1994;38(3):229-40.
13. Anderson K, Sharpe M, Rattray A, Irvine D. Distress and concerns in couples referred to a specialist infertility clinic. *Journal of psychosomatic research*. 2003;54(4):353-5.
14. McKnight K, McKenzie LJ. Evaluation of infertility, ovulation induction and assisted reproduction. *Endotext [Internet]*. 2016.
15. Carson SA, Kallen AN. Diagnosis and management of infertility: a review. *Jama*. 2021;326(1):65-76.

16. Makar RS, Toth TL. The evaluation of infertility. *Pathology Patterns Reviews*. 2002;117(suppl_1):S95-S103.
17. Sirmans SM, Pate KA. Epidemiology, diagnosis, and management of polycystic ovary syndrome. *Clinical epidemiology*. 2013;1-13.
18. Boutari C, Pappas PD, Mintziori G, Nigdelis MP, Athanasiadis L, Goulis DG, et al. The effect of underweight on female and male reproduction. *Metabolism*. 2020;107:154229.
19. Medicine PCotASfR. Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2015;103(6):e44-e50.
20. Sallee C, Margueritte F, Marquet P, Piver P, Aubard Y, Lavoué V, et al. Uterine factor infertility, a systematic review. *Journal of clinical medicine*. 2022;11(16):4907.
21. Masoumi SZ, Parsa P, Darvish N, Mokhtari S, Yavangi M, Roshanaei G. An epidemiologic survey on the causes of infertility in patients referred to infertility center in Fatemeh Hospital in Hamadan. *Iranian journal of reproductive medicine*. 2015;13(8):513.
22. Benbella A, Aboulmakarim S, Hardizi H, Zaidouni A, Bezaad R. Infertility in the Moroccan population: an etiological study in the reproductive health centre in Rabat. *Pan African Medical Journal*. 2018;30(1).
23. Taylor E, Gomel V. The uterus and fertility. *Fertility and sterility*. 2008;89(1):1-16.
24. Hatasaka H. Clinical management of the uterine factor in infertility. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. 2011;54(4):696-709.
25. Saravelos SH, Cocksedge KA, Li T-C. Prevalence and diagnosis of congenital uterine anomalies in women with reproductive failure: a critical appraisal. *Human reproduction update*. 2008;14(5):415-29.
26. Medicine PCotASfR. Role of tubal surgery in the era of assisted reproductive technology: a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2015;103(6):e37-e43.
27. Evers JL, Land JA, Mol BW, editors. Evidence-based medicine for diagnostic questions. *Seminars in reproductive medicine*; 2003: Copyright© 2003 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New
28. Medicine PCotASfR. Optimal evaluation of the infertile female. *Fertility and sterility*. 2006;86(5 Suppl 1):S264-S7.
29. Kolesnikova L, Kolesnikov S, Kurashova N, Bairova T. Causes and factors of male infertility. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2015;70(5):579-84.
30. Sharma A. Male infertility; evidences, risk factors, causes, diagnosis and management in human. *Ann Clin Lab Res*. 2017;5(3):188.
31. Organization WH. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 2021;6th ed.
32. Curi S, Ariagno J, Chenlo P, Mendeluk GR, Pugliese M, Sardi Segovia L, et al. Asthenozoospermia: analysis of a large population. *Archives of andrology*. 2003;49(5):343-9.

33. Devillard F, Metzler-Guillemain C, Pelletier R, DeRobertis C, Bergues U, Hennebicq S, et al. Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Human Reproduction*. 2002;17(5):1292-8.
34. Nistal M, Paniagua R, Herruzo A. Multi-tailed spermatozoa in a case with asthenospermia and teratospermia. *Virchows Archiv B*. 1978;26:111-8.
35. Fesahat F, Henkel R, Agarwal A. Globozoospermia syndrome: an update. *Andrologia*. 2020;52(2):e13459.
36. Punab M, Poolamets O, Paju P, Vihlajev V, Pomm K, Ladva R, et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. *Human reproduction*. 2017;32(1):18-31.
37. Sengupta P, Nwagha U, Dutta S, Krajewska-Kulak E, Izuka E. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. *African health sciences*. 2017;17(2):418-27.
38. Kumar N, Singh AK. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of human reproductive sciences*. 2015;8(4):191-6.
39. Dohle G, Colpi G, Hargreave T, Papp G, Jungwirth A, Weidner W, et al. EAU guidelines on male infertility. *European urology*. 2005;48(5):703-11.
40. Medicine PCotASfR. Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2014;102(6):1556-60.
41. Damsgaard J, Joensen UN, Carlsen E, Erenpreiss J, Jensen MB, Matulevicius V, et al. Varicocele is associated with impaired semen quality and reproductive hormone levels: a study of 7035 healthy young men from six European countries. *European urology*. 2016;70(6):1019-29.
42. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho C-L, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. *The Lancet*. 2021;397(10271):319-33.
43. Tvrdá E, Agarwal A, Alkuhaimi N. Male reproductive cancers and infertility: a mutual relationship. *International journal of molecular sciences*. 2015;16(4):7230-60.
44. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, De Mouzon J, Sokol R, et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*. 2017;32(9):1786-801.
45. Mustafa M, Sharifa A, Hadi J, Illzam E, Aliya S. Male and female infertility: causes, and management. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*. 2019;18(9):27-32.
46. Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive biomedicine online*. 2018;36(3):327-39.
47. Schwartz D, Mayaux MJ. Female fecundity as a function of age: results of artificial insemination in 2193 nulliparous women with azoospermic husbands. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 1982;37(8):548-50.

48. Li J, Chen J, Sun T, Zhang S, Jiao T, Chian R-C, et al. Chromosome aneuploidy analysis in embryos derived from in vivo and in vitro matured human oocytes. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19:1-7.
49. Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Human reproduction*. 2004;19(7):1548-53.
50. Collins J, Crosignani P, Baird D, Cohen J, Diedrich K, Evers H, et al. ESHRE Capri Workshop Group. Diagnosis and management of the infertile couple: missing information. 2004.
51. Mazur DJ, Lipshultz LI. Infertility in the aging male. *Current urology reports*. 2018;19:1-9.
52. Okonofua FE, Ntoimo LFC, Omonkhua A, Ayodeji O, Olafusi C, Unuabonah E, et al. Causes and risk factors for male infertility: a scoping review of published studies. *International Journal of General Medicine*. 2022:5985-97.
53. Johnson SL, Dunleavy J, Gemmell NJ, Nakagawa S. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis. *Ageing research reviews*. 2015;19:22-33.
54. Sharma R, Harlev A, Agarwal A, Esteves SC. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen. *European urology*. 2016;70(4):635-45.
55. Ricci E, Al Beitawi S, Cipriani S, Candiani M, Chiaffarino F, Viganò P, et al. Semen quality and alcohol intake: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2017;34(1):38-47.
56. Gundersen TD, Jørgensen N, Andersson A-M, Bang AK, Nordkap L, Skakkebaek NE, et al. Association between use of marijuana and male reproductive hormones and semen quality: a study among 1,215 healthy young men. *American journal of epidemiology*. 2015;182(6):473-81.
57. Bala R, Singh V, Rajender S, Singh K. Environment, lifestyle, and female infertility. *Reproductive sciences*. 2021;28:617-38.
58. Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, Menafrà D, Pozza C, Pivonello R, et al. Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reproductive biology and endocrinology*. 2018;16:1-11.
59. Sharara FI, Beatse SN, Leonardi MR, Navot D, Scott Jr RT. Cigarette smoking accelerates the development of diminished ovarian reserve as evidenced by the clomiphene citrate challenge test. *Fertility and sterility*. 1994;62(2):257-62.
60. Alshahrani S, Ahmed AF, Gabr A, Abalhassan M, Ahmad G. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*. 2016;48(10):1125-9.
61. Oghagbon E, Jimoh A, Adebisi S. Seminal fluid analysis and biophysical profile: findings and relevance in infertile males in Ilorin, Nigeria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. 2004;5(3):280-4.

62. Grodstein F, Goldman MB, Cramer DW. Body mass index and ovulatory infertility. *Epidemiology*. 1994;5(2):247-50.
63. Dağ ZÖ, Dilbaz B. Impact of obesity on infertility in women. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*. 2015;16(2):111.
64. Silvestris E, De Pergola G, Rosania R, Loverro G. Obesity as disruptor of the female fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2018;16:1-13.
65. Sutton-McDowall ML, Gilchrist RB, Thompson JG. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. *Reproduction*. 2010;139(4):685.
66. Chen T, Stott P, Athorn R, Bouwman E, Langendijk P. Undernutrition during early follicle development has irreversible effects on ovulation rate and embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 2012;24(6):886-92.
67. Saalu L, Osinubi A. Environmental endocrine disruptors of testicular function. *African Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2009;8(1):15-25.
68. Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human reproduction update*. 2008;14(4):345-57.
69. De Geyter C. Assisted reproductive technology: impact on society and need for surveillance. Best practice & research *Clinical endocrinology & metabolism*. 2019;33(1):3-8.
70. Allahbadia GN. Intrauterine insemination: Fundamentals revisited. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*. 2017;67(6):385-92.
71. Huang JYJ, Rosenwaks Z. Assisted reproductive techniques. *Human fertility: methods and protocols*. 2014:171-231.
72. Group TECW. Intrauterine insemination. *Human Reproduction Update*. 2009;15(3):265-77.
73. Farquhar C, Marjoribanks J. Assisted reproductive technology: an overview of Cochrane Reviews. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018(8).
74. Prevention CfDCa. Assisted Reproductive Technology (ART) Success Rates 2024 [Available from: <https://www.cdc.gov/art/reports/index.html>].
75. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet*. 1978;312(8085):366.
76. Dyer S, Chambers GM, de Mouzon J, Nygren K-G, Zegers-Hochschild F, Mansour R, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology 2008, 2009 and 2010. *Human reproduction*. 2016;31(7):1588-609.
77. Chambers GM, Dyer S, Zegers-Hochschild F, de Mouzon J, Ishihara O, Banker M, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2014. *Human Reproduction*. 2021;36(11):2921-34.

78. Präg P, Mills MC. Cultural determinants influence assisted reproduction usage in Europe more than economic and demographic factors. *Human Reproduction*. 2017;32(11):2305-14.
79. European IVF Monitoring Consortium ftESoHR, Embryology, Wyns C, De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, et al. ART in Europe, 2018: results generated from European registries by ESHRE†. *Human Reproduction Open*. 2022;2022(3).
80. Wang X, Zhang Y, Sun H-L, Wang L-T, Li X-F, Wang F, et al. Factors affecting artificial insemination pregnancy outcome. *International Journal of General Medicine*. 2021;3961-9.
81. Abdelkader AM, Yeh J. The Potential Use of Intrauterine Insemination as a Basic Option for Infertility: A Review for Technology-Limited Medical Settings. *Obstetrics and Gynecology International*. 2009;2009(1):584837.
82. Choe J, Shanks AL. In vitro fertilization. 2020.
83. Jungheim ES, Meyer MF, Broughton DE, editors. Best practices for controlled ovarian stimulation in in vitro fertilization. *Seminars in reproductive medicine*; 2015: Thieme Medical Publishers.
84. Hashimoto S, Goda S, Akamatsu Y, Yamanaka M, Morimoto Y. AL-002 Effects of sperm preparation on sperm DNA fragmentation and morphology. *Reproductive BioMedicine Online*. 2008(16):S-28.
85. Ricci G, Perticarari S, Boscolo R, Montico M, Guaschino S, Presani G. Semen preparation methods and sperm apoptosis: swim-up versus gradient-density centrifugation technique. *Fertility and Sterility*. 2009;91(2):632-8.
86. Bartolacci A, Tondo F, Alteri A, Solano Narduche L, de Girolamo S, D'Alessandro G, et al. The task matters: A comprehensive review and proposed literature score of the effects of chemical and physical parameters on embryo developmental competence. *Life*. 2023;13(11):2161.
87. Swain JE, Carrell D, Cobo A, Meseguer M, Rubio C, Smith GD. Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential. *Fertility and sterility*. 2016;105(3):571-87.
88. Gekka Y, Nakagawa K, Watanabe H, Kuroda K, Horikawa T, Takamizawa S, et al. Comparison of Pregnancy Outcomes Between Fresh Embryo Transfer in a Natural IVF Cycle and IUI Cycle Among Infertile Young Women. *Journal of Reproduction & Infertility*. 2022;23(2):93.
89. Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z. *Textbook of assisted reproductive techniques*: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2018.
90. Balli M, Cecchele A, Pisaturo V, Makieva S, Carullo G, Somigliana E, et al. Opportunities and limits of conventional IVF versus ICSI: it is time to come off the fence. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(19):5722.
91. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biology of the Cell*. 2000;92(3-4):255-66.

92. 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.
93. Boulet SL, Mehta A, Kissin DM, Warner L, Kawwass JF, Jamieson DJ. Trends in use of and reproductive outcomes associated with intracytoplasmic sperm injection. *Jama*. 2015;313(3):255-63.
94. Zheng D, Nguyen QN, Li R, Dang VQ, editors. *Is Intracytoplasmic Sperm Injection the solution for all in unexplained infertility?* Seminars in Reproductive Medicine; 2020: Thieme Medical Publishers, Inc.
95. Rosenwaks Z, Wassarman P. *Human Fertility*: Springer; 2016.
96. Yanagida K, Katayose H, Hirata S, Yazawa H, Hayashi S, Sato A. Influence of sperm immobilization on onset of Ca²⁺ oscillations after ICSI. *Human Reproduction*. 2001;16(1):148-52.
97. Dozortsev D, Qian C, Ermilov A, Rybouchkin A, De Sutter P, Dhont M. Sperm-associated oocyte-activating factor is released from the spermatozoon within 30 minutes after injection as a result of the sperm-oocyte interaction. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1997;12(12):2792-6.
98. Chou C-W, Chen S-U, Chang C-H, Tsai Y-Y, Huang C-C. Aggressive sperm immobilization improves reproductive outcomes in patients with suboptimal semen parameters and previous ICSI fertilization failure. *Scientific Reports*. 2024;14(1):5363.
99. Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H, Katayose H, Sato A. Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. *Fertility and sterility*. 1995;63(6):1241-5.
100. Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R. Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolema. *Human Reproduction*. 1996;11(3):540-7.
101. Girsh E. *A textbook of clinical embryology*: Cambridge University Press; 2021.
102. Elder K. In vitro fertilization. *Preimplantation Genetic Diagnosis*. 2001:53-78.
103. Shahbazi MN. Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development*. 2020;147(14):dev190629.
104. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RAR. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012;139(5):829-41.
105. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988;332(6163):459-61.
106. Graham MC, Hoeger KM, Phipps WR. Initial IVF-ET experience with assisted hatching performed 3 days after retrieval followed by day 5 embryo transfer. *Fertility and sterility*. 2000;74(4):668-71.

107. Bungum M, Bungum L, Humaidan P, Andersen CY. Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. *Reproductive BioMedicine Online*. 2003;7(1):98-104.
108. Firmin J, Ecker N, Rivet Danon D, Özgüç Ö, Barraud Lange V, Turlier H, et al. Mechanics of human embryo compaction. *Nature*. 2024:1-6.
109. Firmin J, Maître J-L, editors. Morphogenesis of the human preimplantation embryo: bringing mechanics to the clinics. *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 2021: Elsevier.
110. Turlier H, Maître J-L, editors. Mechanics of tissue compaction. *Seminars in cell & developmental biology*; 2015: Elsevier.
111. Gardner DK, Wale PL. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertility and sterility*. 2013;99(4):1062-72.
112. Gardner DK, Lane M. Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reproduction, Fertility and Development*. 2005;17(3):361-70.
113. Rooke J, McEvoy T, Ashworth C, Robinson J, Wilmot I, Young L, et al. Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. *Theriogenology*. 2007;67(3):639-47.
114. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertility and sterility*. 2001;76(6):1175-80.
115. Coticchio G, Lagalla C, Sturmey R, Pennetta F, Borini A. The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. *Human reproduction update*. 2019;25(4):422-38.
116. Harada Y, Maeda T, Fukunaga E, Shiba R, Okano S, Kinutani M, et al. Selection of high-quality and viable blastocysts based on timing of morula compaction and blastocyst formation. *Reproductive Medicine and Biology*. 2020;19(1):58-64.
117. Zhu M, Zernicka-Goetz M. Principles of self-organization of the mammalian embryo. *Cell*. 2020;183(6):1467-78.
118. Anani S, Bhat S, Honma-Yamanaka N, Krawchuk D, Yamanaka Y. Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development*. 2014;141(14):2813-24.
119. Chan CJ, Costanzo M, Ruiz-Herrero T, Mönke G, Petrie RJ, Bergert M, et al. Hydraulic control of mammalian embryo size and cell fate. *Nature*. 2019;571(7763):112-6.
120. Takeuchi K. Pre-implantation genetic testing: past, present, future. *Reproductive Medicine and Biology*. 2021;20(1):27-40.
121. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertility and sterility*. 2008;89(1):20-6.

122. Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, et al. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Human reproduction*. 2014;29(6):1173-81.
123. Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Wilson JM, Crain JL, Griffin DK. Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates between day 5 and day 6 blastocysts. *Reproductive biomedicine online*. 2014;29(3):305-10.
124. Tong J, Niu Y, Wan A, Zhang T. Comparison of day 5 blastocyst with day 6 blastocyst: evidence from NGS-based PGT-A results. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022:1-9.
125. Kimelman D, Confino R, Okeigwe I, Lambe-Steinmiller J, Confino E, Shulman LP, et al. Assessing the impact of delayed blastulation using time lapse morphokinetics and preimplantation genetic testing in an IVF patient population. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2019;36:1561-9.
126. Hammond ER, Cree LM, Morbeck DE. Should extended blastocyst culture include Day 7? *Human Reproduction*. 2018;33(6):991-7.
127. Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Human reproduction (Oxford, England)*. 1998;13(3):676-81.
128. Tiegs A, Sun L, Patounakis G, Scott Jr R. Worth the wait? Day 7 blastocysts have lower euploidy rates but similar sustained implantation rates as Day 5 and Day 6 blastocysts. *Human Reproduction*. 2019;34(9):1632-9.
129. Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, et al. Alpha scientists in reproductive medicine and ESHRE special interest group of embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011;26(6):1270-83.
130. Sathananthan H, Gunasheela S, Menezes J. Mechanics of human blastocyst hatching in vitro. *Reproductive biomedicine online*. 2003;7(2):228-34.
131. Gardner DK, Lane M. Culture systems for the human embryo. *Textbook of assisted reproductive techniques: CRC Press*; 2017. p. 242-66.
132. Macklon N, Pieters M, Hassan M, Jeucken P, Eijkemans M, Fauser B. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in-vitro human blastocyst development. *Human Reproduction*. 2002;17(10):2700-5.
133. Sciorio R. Use of time-lapse monitoring in medically assisted reproduction treatments: a mini-review. *Zygote*. 2021;29(2):93-101.
134. Technology EWGoT-L, Apter S, Ebner T, Freour T, Guns Y, Kovacic B, et al. Good practice recommendations for the use of time-lapse technology. *Human Reproduction Open*. 2020;2020(2):hoaa008.
135. Pellegrini L, Cozzolino M. Embryo quality evaluation and cryopreservation. *Management of Infertility: Elsevier*; 2023. p. 309-16.
136. Simon A, Laufer N. Assessment and treatment of repeated implantation failure (RIF). *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2012;29:1227-39.

137. ASEBIR. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) Madrid ...; 2015.
138. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Human reproduction update*. 2003;9(3):237-49.
139. Rita de Cássia SF, Braga DPdAF, Semiao-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli Jr A, Borges Jr E. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. *Fertility and sterility*. 2010;94(3):1115-7.
140. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommerguber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reproductive biomedicine online*. 2008;16(1):113-8.
141. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and sterility*. 2005;83(6):1635-40.
142. Miao Y-L, Kikuchi K, Sun Q-Y, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human reproduction update*. 2009;15(5):573-85.
143. Boada M, Ponsá M. Características morfológicas y ultra-estructurales de cigotos y embriones anormales tras FIV/ICSI. *R ev. Asoc Est Bio Rep*. 2008;13(2).
144. Scott L. Predicting Embryo Development. *Manual on Assisted Reproduction*: Springer; 2000. p. 321-38.
145. Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari A-M, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Human Reproduction*. 2001;16(10):2177-81.
146. Holte J, Berglund L, Milton K, Garelo C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction*. 2007;22(2):548-57.
147. Pelinck M-J, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ, van Echten-Arends J, Arts EG. Embryo quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified natural cycle in vitro fertilization. *Fertility and sterility*. 2010;94(2):527-34.
148. Saldeen P, Sundström P. Nuclear status of four-cell preembryos predicts implantation potential in in vitro fertilization treatment cycles. *Fertility and sterility*. 2005;84(3):584-9.
149. Royen EV, Mangelschots K, Vercruyssen M, Neubourg DD, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human reproduction*. 2003;18(5):1062-9.
150. Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. The cleavage stage embryo. *Human Reproduction*. 2012;27(suppl_1):i50-i71.

151. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and sterility*. 1998;69(1):84-8.
152. Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and sterility*. 2001;76(6):1157-67.
153. Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH, et al. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *Journal of clinical oncology*. 2013;31(19):2500-10.
154. Rienzi L, Ubaldi FM. Oocyte versus embryo cryopreservation for fertility preservation in cancer patients: guaranteeing a women's autonomy. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015;32(8):1195-6.
155. Di Santo M, Tarozzi N, Nadalini M, Borini A. Human sperm cryopreservation: update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for ART. *Advances in urology*. 2012;2012(1):854837.
156. Hezavehei M, Sharafi M, Kouchesfahani HM, Henkel R, Agarwal A, Esmaeili V, et al. Sperm cryopreservation: A review on current molecular cryobiology and advanced approaches. *Reproductive biomedicine online*. 2018;37(3):327-39.
157. Cutting R. Single embryo transfer for all. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2018;53:30-7.
158. Griesinger G, Schultz L, Bauer T, Broessner A, Frambach T, Kissler S. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention by gonadotropin-releasing hormone agonist triggering of final oocyte maturation in a gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in combination with a "freeze-all" strategy: a prospective multicentric study. *Fertility and sterility*. 2011;95(6):2029-33. e1.
159. Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Falcone T, Fossum G, et al. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertility and sterility*. 2018;109(3):429-36.
160. Ozimic S, Ban-Frangez H, Stimpfel M. Sperm cryopreservation today: Approaches, efficiency, and pitfalls. *Current Issues in Molecular Biology*. 2023;45(6):4716-34.
161. Pomeroy KO, Comizzoli P, Rushing JS, Lersten IL, Nel-Themaat L. The ART of cryopreservation and its changing landscape. *Fertility and Sterility*. 2022;117(3):469-76.
162. Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 2004;25(6):375-88.
163. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnology and bioengineering*. 2009;104(4):719-28.
164. Tongdee P, Sukprasert M, Satirapod C, Wongkularb A, Choktanasiri W. Comparison of cryopreserved human sperm between ultra rapid freezing and slow programmable freezing: effect on motility, morphology and DNA integrity. *J Med Assoc Thai*. 2015;98(Suppl 4):S33-42.

165. Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative medicine research*. 2017;6(1):12-8.
166. Gao D, Critser J. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR journal*. 2000;41(4):187-96.
167. 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. *Fertility and sterility*. 2008;90(1):186-93.
168. Cobo A, Diaz C. Clinical application of oocyte vitrification: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertility and sterility*. 2011;96(2):277-85.
169. Doyle JO, Richter KS, Lim J, Stillman RJ, Graham JR, Tucker MJ. Successful elective and medically indicated oocyte vitrification and warming for autologous in vitro fertilization, with predicted birth probabilities for fertility preservation according to number of cryopreserved oocytes and age at retrieval. *Fertility and sterility*. 2016;105(2):459-66.e2.
170. Rezazadeh Valojerdi M, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L, Hassani F, Movaghar B. Vitrification versus slow freezing gives excellent survival, post warming embryo morphology and pregnancy outcomes for human cleaved embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2009;26:347-54.
171. Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biology of reproduction*. 2002;67(6):1671-80.
172. AbdelHafez FF, Desai N, Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive biomedicine online*. 2010;20(2):209-22.
173. Zaat T, Zagers M, Mol F, Goddijn M, van Wely M, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2021(2).
174. Richter KS, Shipley SK, McVearry I, Tucker MJ, Widra EA. Cryopreserved embryo transfers suggest that endometrial receptivity may contribute to reduced success rates of later developing embryos. *Fertility and sterility*. 2006;86(4):862-6.
175. Tiitinen A. Prevention of multiple pregnancies in infertility treatment. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2012;26(6):829-40.
176. Medicine PCotSfARTaPCotASfR. Elective single-embryo transfer. *Fertility and Sterility*. 2012;97(4):835-42.
177. Glujovsky D, Farquhar C. Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms? *Fertility and sterility*. 2016;106(2):244-50.
178. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage? *Reproductive biomedicine online*. 2016;32(2):142-6.
179. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or

cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2008;23(1):91-9.

180. Glujovsky D, Retamar AMQ, Sedo CRA, Ciapponi A, Cornelisse S, Blake D. Cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane database of systematic reviews*. 2022(5).

181. Medicine PCotASfR, Technology PCotSfAR. Blastocyst culture and transfer in clinically assisted reproduction: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 2018;110(7):1246-52.

182. Li Yx, Wang J, Sun Tz, Lv Mq, Ge P, Li Hn, et al. Pregnancy outcomes after day 5 versus day 6 blastocyst-stage embryo transfer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*. 2020;46(4):595-605.

183. Haas J, Meriano J, Laskin C, Bentov Y, Barzilay E, Casper RF, et al. Clinical pregnancy rate following frozen embryo transfer is higher with blastocysts vitrified on day 5 than on day 6. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2016;33:1553-7.

184. Desai N, Ploskonka S, Goodman L, Attaran M, Goldberg JM, Austin C, et al. Delayed blastulation, multinucleation, and expansion grade are independently associated with live-birth rates in frozen blastocyst transfer cycles. *Fertility and sterility*. 2016;106(6):1370-8.

185. Tubbing A, Shaw-Jackson C, Ameye L, Colin J, Rozenberg S, Autin C. Increased live births after day 5 versus day 6 transfers of vitrified-warmed blastocysts. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2018;35:417-24.

186. Irani M, O'Neill C, Palermo GD, Xu K, Zhang C, Qin X, et al. Blastocyst development rate influences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts. *Fertility and sterility*. 2018;110(1):95-102. e1.

187. Bourdon M, Pocate-Cheriet K, Finet de Bantel A, Grzegorzcyk-Martin V, Amar Hoffet A, Arbo E, et al. Day 5 versus Day 6 blastocyst transfers: a systematic review and meta-analysis of clinical outcomes. *Human Reproduction*. 2019;34(10):1948-64.

188. Hiraoka K, Hiraoka K, Miyazaki M, Fukunaga E, Horiuchi T, Kusuda T, et al. Perinatal outcomes following transfer of human blastocysts vitrified at day 5, 6 and 7. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*. 2009;6.

189. Sunkara SK, Siozos A, Bolton VN, Khalaf Y, Braude PR, El-Toukhy T. The influence of delayed blastocyst formation on the outcome of frozen-thawed blastocyst transfer: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*. 2010;25(8):1906-15.

190. El-Toukhy T, Wharf E, Walavalkar R, Singh A, Bolton V, Khalaf Y, et al. Delayed blastocyst development does not influence the outcome of frozen-thawed transfer cycles. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2011;118(13):1551-6.

191. Kaye L, Will EA, Bartolucci A, Nulsen J, Benadiva C, Engmann L. Pregnancy rates for single embryo transfer (SET) of day 5 and day 6 blastocysts after cryopreservation by vitrification and slow freeze. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2017;34:913-9.

192. Hu J, Zheng J, Li J, Shi H, Wang H, Zheng B, et al. D6 high-quality expanded blastocysts and D5 expanded blastocysts have similar pregnancy and perinatal outcomes following single frozen blastocyst transfer. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1216910.
193. Shi W, Zhou H, Chen L, Xue X, Shi J. Live birth rate following frozen-thawed blastocyst transfer is higher in high-grade day 6 blastocysts than in low-grade day 5 blastocysts. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;13:1066757.
194. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. In: *Computing RfS*, editor. 2024.
195. Schirmer III DA, Kulkarni AD, Zhang Y, Kawwass JF, Boulet SL, Kissin DM. Ovarian hyperstimulation syndrome after assisted reproductive technologies: trends, predictors, and pregnancy outcomes. *Fertility and sterility*. 2020;114(3):567-78.
196. Sciorio R, Esteves SC. Clinical utility of freeze-all approach in ART treatment: a mini-review. *Cryobiology*. 2020;92:9-14.
197. Moghadam ARE, Moghadam MT, Hemadi M, Saki G. Oocyte quality and aging. *JBRA Assisted Reproduction*. 2022;26(1):105.
198. Haas J, Miller TE, Nahum R, Aizer A, Kirshenbaum M, Zilberberg E, et al. The role of ICSI vs. conventional IVF for patients with advanced maternal age—a randomized controlled trial. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2021;38:95-100.
199. Sunderam S, Boulet SL, Kawwass JF, Kissin DM. Comparing fertilization rates from intracytoplasmic sperm injection to conventional in vitro fertilization among women of advanced age with non- male factor infertility: a meta-analysis. *Fertility and sterility*. 2020;113(2):354-63. e1.
200. of Embryology ESIG. The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive BioMedicine Online*. 2017;35(5):494-510.
201. Rubino P, Viganò P, Luddi A, Piomboni P. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Human reproduction update*. 2016;22(2):194-227.
202. Franasiak JM, Polyzos NP, Neves AR, Yovich JL, Ho TM, Vuong LN, et al. Intracytoplasmic sperm injection for all or for a few? *Fertility and Sterility*. 2022;117(2):270-84.
203. Sainte-Rose R, Petit C, Dijols L, Frapsauce C, Guerif F. Extended embryo culture is effective for patients of an advanced maternal age. *Scientific Reports*. 2021;11(1):13499.
204. Tannus S, Son W-Y, Gilman A, Younes G, Shavit T, Dahan M-H. The role of intracytoplasmic sperm injection in non-male factor infertility in advanced maternal age. *Human Reproduction*. 2017;32(1):119-24.
205. Van Landuyt L, De Vos A, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A. Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. *Fertility and sterility*. 2005;83(5):1397-403.

206. Kirillova A, Lysenkov S, Farmakovskaya M, Kiseleva Y, Martazanova B, Mishieva N, et al. Should we transfer poor quality embryos? Fertility research and practice. 2020;6:1-7.

207. Jiang Y, Song G, Zhang X-H, Miao S-B, Wu X-H. Frozen blastocysts: Assessing the importance of day 5/day 6 blastocysts or blastocyst quality. Experimental and Therapeutic Medicine. 2022;23(5):1-6.