



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

Ionóforos de cálcio:
Aplicação em reprodução humana, implicações na
fertilização, desenvolvimento embrionário e sucesso
gestacional

Dissertação de Mestrado defendida em provas públicas para obtenção do
grau de mestre em Embriologia e Reprodução Humana orientada pela Dra.
Sofia Nunes

Núria Rafaela Correia Teixeira de Lima N°22207587
2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

Ionóforos de cálcio:
Aplicação em reprodução humana, implicações na
fertilização, desenvolvimento embrionário e sucesso
gestacional

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona, Centro
Universitário de Lisboa no dia 16/01/2025, perante o júri, nomeado pelo Despacho de
Nomeação n.º: N° 1055 / 2024, de 25 de novembro de 2024, com a seguinte
composição:

Presidente: Prof. Doutor Bruno Daniel da Costa Gomes;
Arguente: Prof^a. Doutora Patrícia Carla Coelho Rodrigues;
Orientadora: Mestre Ana Mafalda Leal Rato.

Núria Rafaela Correia Teixeira de Lima N°22207587
2024

Agradecimentos

À Universidade Lusófona de Tecnologias e Humanidades que novamente se fez presente num momento crucial da minha vida, o meu sincero agradecimento.

À minha orientadora e chefe Sofia Nunes, agradeço profundamente por todo o conhecimento transmitido durante o estágio e pela valiosa oportunidade de continuar a aprender e a crescer.

Aos professores, Patrícia Rodrigues, Mafalda Rato e Ignácio Miguel, que acompanharam este percurso com sabedoria e entusiasmo, a minha eterna gratidão. Obrigada por sonharem connosco e por tornarem possível a concretização não só do meu sonho, mas também dos sonhos das minhas colegas.

Às minhas queridas colegas de mestrado, com quem partilhei esta maravilhosa jornada ao longo destes dois anos, na primeira edição de um curso tão especial, o meu carinho e reconhecimento.

Aos meus colegas de estágio, que hoje são também meus colegas de trabalho, agradeço pela parceria e pela partilha de aprendizagens.

Aos meus amigos Filipe, Rafael, Shelsea, Joshua, Denise, Nadine, Ricardo, Ana Sofia, Rafaela e Ana Luiza, fico eternamente grata pelo apoio e amizade, que tanto significaram ao longo desta caminhada.

À Michelle pelas inúmeras vezes em que pacientemente ouviu as minhas explicações sobre a diferença entre uma ICSI e uma FIV convencional, demonstrando sempre interesse e compreensão.

E, por fim, mas de modo algum menos importante, aos meus pais Sónia e Zezinho e à minha irmã Luena, o meu mais profundo agradecimento. Obrigada pelo apoio incondicional, pelas horas incontáveis em que me ouviram falar incansavelmente sobre ciência, por acreditarem em mim, mesmo quando eu própria duvidei, por me apoiarem em todas as decisões e, acima de tudo, por me amarem incondicionalmente.

Resumo

A infertilidade é considerada um problema de saúde mundial, responsável por criar um impacto psicossocial, afetando muitos casais.

Pacientes com histórico de baixas taxas de fertilização ou falhas recorrentes na fecundação com ICSI e, conseqüentemente, desenvolvimento embrionário precário após tentativas consecutivas podem beneficiar de técnicas de ativação ovocitária artificial, utilizando ionóforos de cálcio.

Este trabalho aborda a utilização desse composto como técnica complementar em tratamentos de fertilização *in vitro*. A pesquisa visa avaliar a eficácia deste composto, analisando o seu impacto nas taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário, implantação e sucesso gestacional.

Os resultados indicaram uma melhoria significativa nas taxas de fertilização. Pacientes com infertilidade masculina e mulheres de idade materna avançada foram os mais beneficiados. No entanto, limitações como o pequeno tamanho amostral e a variabilidade dos protocolos entre os centros exigem mais pesquisas e padronização dos protocolos. A comparação entre as marcas de ionóforos de cálcio, calcimycin e ionomycin, sugere que a escolha deve ser criteriosa, considerando as características individuais dos pacientes.

Com pesquisas adicionais e otimização dos protocolos, os ionóforos de cálcio apresentam o potencial de melhorar as taxas de sucesso em fertilização *in vitro*, oferecendo uma alternativa promissora para casais com infertilidade.

Palavras-chave: ionóforos de cálcio, ICSI, ativação ovocitária, calcimycin, ionomycin.

Abstract

Infertility is considered a global health issue, responsible for creating a psychosocial impact that affects many couples.

Patients with a history of low fertilization rates or recurrent failures in fertilization through ICSI and, consequently, poor embryonic development after consecutive attempts may benefit from artificial oocyte activation techniques using calcium ionophores.

This study addresses the use of this compound as a complementary technique in vitro fertilization treatments. The research aims to assess the efficacy of this compound by analyzing its impact on fertilization rates, embryonic development, implantation, and pregnancy success.

The results indicated a significant improvement in fertilization rates. Male infertility patients and women with advanced maternal age benefited the most. However, limitations such as the small sample size and variability in protocols between centers require further research and standardization of protocols. The comparison between calcium ionophore brands, calcimycin and ionomycin, suggests that the choice should be made carefully, considering the individual characteristics of the patients.

With additional research and optimization of protocols, calcium ionophores have the potential to improve success rates in vitro fertilization, offering a promising alternative for couples facing infertility.

Key-words: Calcium ionophores, ICSI, oocyte activation, calcimycin, ionomycin.

Lista de Siglas

AOA	Ativação ovocitária artificial
CaMK II	Quinase dependente de cálcio e calmodulina
CE	Conformidade europeia
CI	Intervalo de confiança
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ET	<i>Embryo transfer</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
gDNA	<i>Genomic deoxyribonucleic acid</i>
HCG	Gonadotrofina coriônica humana
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IMSI	<i>Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection</i>
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IVI	Instituto Valenciano de Infertilidade
MPF	Maturation-promoting factor
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PLC-zeta	Fosfolipase C zeta
PMA	Procriação medicamente assistida
RN	Recém-nascido
RR	<i>Risk ratio</i>
SD	Desvio padrão
tB	Blastulação completa
TEC	Transferência de embriões congelados
tPBb2	Extrusão do segundo corpo polar
tPN	Aparecimento do pronúcleo
tPNf	Desaparecimento do pronúcleo
TQE	<i>Top quality embryo</i>
tSB	Início da blastulação

Lista de Símbolos

P Probabilidade

ζ Zeta

Índice

Agradecimentos	1
Resumo	2
Abstract.....	3
Lista de Siglas.....	4
Lista de Símbolos	5
Índice	6
Índice de Figuras	8
Capítulos I. Introdução	9
1.1 Fundamentos da Ativação Ovocitária.....	10
1.2 Ionóforos de Cálcio.....	12
1.3 Como são utilizados os ionóforos de cálcio em reprodução medicamente assistida?	14
1.3.1 Calcimycin (A23187).....	14
1.3.2 Ionomycin.....	15
1.4. Objetivos	16
Capítulo II. Implicações na Fertilização, Desenvolvimento embrionário, Taxa Implantacional e Gestação	17
2.1. Implicação na Fertilização	18
2.2. Desenvolvimento Embrionário	21
2.3. Taxa Implantacional e Gestação.....	26
Capítulo III. Comparação de Duas Marcas de Ionóforos.....	32
3.1 Calcimycin vs Ionomycin	33
3.1.1 Protocolo Calcimycin.....	33
3.1.2 Protocolo Ionomycin.....	33
3.2 Resultados	34
Capítulo IV. Complicações após a Utilização dos Ionóforos de Cálcio	36
Capítulo V. Impacto na Idade Materna e Fatores Masculinos nos Resultados dos Tratamentos	39
5.1 Idade Materna	40
5.2 Fator Masculino	41
Capítulo VI. Limitações e Desafios Futuro	43
6.1 Tamanho amostral.....	44
6.2 Variabilidade nos protocolos	45
6.3 Riscos e efeitos adversos	46

Conclusão	48
Referências Bibliográficas	51

Índice de Figuras

Figura 1. Representação da via do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), demonstrando o processo de sinalização responsável pela libertação de cálcio do retículo endoplasmático, essencial para a ativação celular e outros processos biológicos	11
Figura 2. Representação de um ovócito destacando os processos de ativação ovocitária de forma natural e artificial	12
Figura 3. Representação da estrutura química do ionóforo de cálcio calcimycin (A23187) (Calcium ionophore A23187	13
Figura 4. Procedimento de ativação ovocitária artificial utilizando ionóforos de cálcio (calcimycin) após injeção intracitoplasmática (ICSI)	14
Figura 5. Procedimento de ativação ovocitária artificial utilizando ionóforos de cálcio ionomycin após injeção intracitoplasmática (ICSI) juntamente com cloreto de cálcio (CaCl ₂).....	15
Figura 6. Efeito da ativação ovocitária com ionóforos de cálcio em pacientes com espermatozoides obtidos de origens distintas	19
Figura 7. Comparação dos resultados obtidos com a aplicação do ionóforo de cálcio A23187 em relação aos ciclos anteriores sem o uso de ionóforos	21
Figura 8. Comparação do desenvolvimento pré-implantacional entre estudos utilizando ionóforos de cálcio (calcimycin) e grupos de controlo (ICSI convencional)	23
Figura 9. Análise de subgrupos (categorizados relativamente a idade correspondente a 40 anos) do grupo POSEIDIN com utilização de ionóforos de cálcio e sem utilização de ionóforos	24
Figura 10. Resultados do estudo do grupo que utilizou ativação ovocitária artificial com ionóforos de cálcio (calcimycin) apresentado em percentagens	28
Figura 11. Resultados neonatais de crianças nascidas após tratamento de ativação ovocitária artificial com ionóforos de cálcio	29
Figura 12. Comparação de duas marcas de ionóforos comercializadas e o desenvolvimento embrionário	34

Capítulo I

Introdução

1.1 Fundamentos da Ativação Ovocitária

A infertilidade é considerada um problema de saúde mundial afetando 15% da população, é responsável por criar um impacto psicossocial, afetando de maneira significativa o bem-estar de muitos casais, dos quais 80% encontra uma solução através de métodos de reprodução medicamente assistida (Chen *et al.*, 2022, p 1).

Originalmente, o tratamento de reprodução medicamente assistida surgiu e foi aplicado com o objetivo de auxiliar mulheres que possuíam problemas a nível tubário na década de 70. Atualmente, a fertilização *in vitro* é considerada um dos tratamentos mais eficazes para infertilidade. No decorrer do tempo, percebeu-se que a fertilização *in vitro* convencional desempenhava um papel menos eficiente quando as características do sémen apresentavam parâmetros considerados abaixo dos normais, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (Zheng *et al.*, 2019, p 1).

Em 1992, a injeção intracitoplasmática (ICSI) foi introduzida, uma técnica que consiste em inserir diretamente através de micromanipulação um único espermatozoide no interior de um ovócito (Palermo *et al.*, 1992).

A taxa de falha de fecundação em tratamentos de fertilização *in vitro* convencionais foi reportada em até 50% dos casais com problemas de infertilidade masculina moderadas (oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia). No entanto, esse índice apresentou uma descida para menos de 3% nos casais tratados com ICSI. Consequentemente, a ICSI tornou-se um método utilizado em casos de infertilidade masculina severa, sendo uma mais-valia para homens com parâmetros de sémen subótimos. Além disso, também tem sido utilizada em casais que em ciclos anteriores obtiveram ou baixa taxa de fertilização ou nenhuma após a utilização da técnica de fertilização *in vitro* convencional (Zheng *et al.*, 2019) (Vanden Meerschaut *et al.*, 2014).

No entanto, para uma fecundação bem-sucedida é necessário que aconteça um processo de ativação ovocitária, este inclui um vasto número de eventos morfológicos e bioquímicos, que podem se suceder em segundos, minutos e até mesmo horas após o contato entre o espermatozoide e o ovócito (Tejera *et al.*, 2021).

Este processo ocorre naturalmente após o encontro destes gametas e é desencadeado através de um conjunto de oscilações intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), geradas e libertadas pelo retículo endoplasmático após a entrada do espermatozoide no

citoplasma do ovócito e permanecendo até o aparecimento dos pronúcleos (Tejera *et al.*, 2021).

O aumento de Ca^{+2} é responsável por desencadear o início da anafase e completar a meiose e a síntese de DNA respectivamente, também é responsável por desempenhar o papel de mensageiro secundário regulando a secreção de enzimas metabólicas, expressão de genes e várias outras funções moleculares e celulares essenciais (Anifandis *et al.*, 2019, p 4).

Estas oscilações podem afetar as fases iniciais de desenvolvimento embrionário através da ativação de uma proteína quinase dependente de cálcio (CaMK II), provocando o início e progressão do ciclo e consequentemente divisão celular. Por esta razão, acredita-se que a capacidade de desenvolvimento embrionário no período pré-implantacional depende dos sinais de cálcio (Anifandis *et al.*, 2019, p 4).

Alguns estudos reportaram que a deficiência e/ou insuficiência de Ca^{2+} durante a ativação ovocitária está associada ao bloqueio de desenvolvimento embrionário, anomalias de clivagem, mau desenvolvimento pré-implantacional, e qualidade de blastocisto precária (Chen *et al.*, 2022, p 2).

Acredita-se que estas oscilações de cálcio sejam desencadeadas pela ativação da via do inositol 1,2,5 trifosfato (InsP3) por hidrólises da membrana e ligação do substrato fosfolípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) conforme representado na figura 1 (Saleh *et al.*, 2020, p 2) (Tejera *et al.*, 2021).

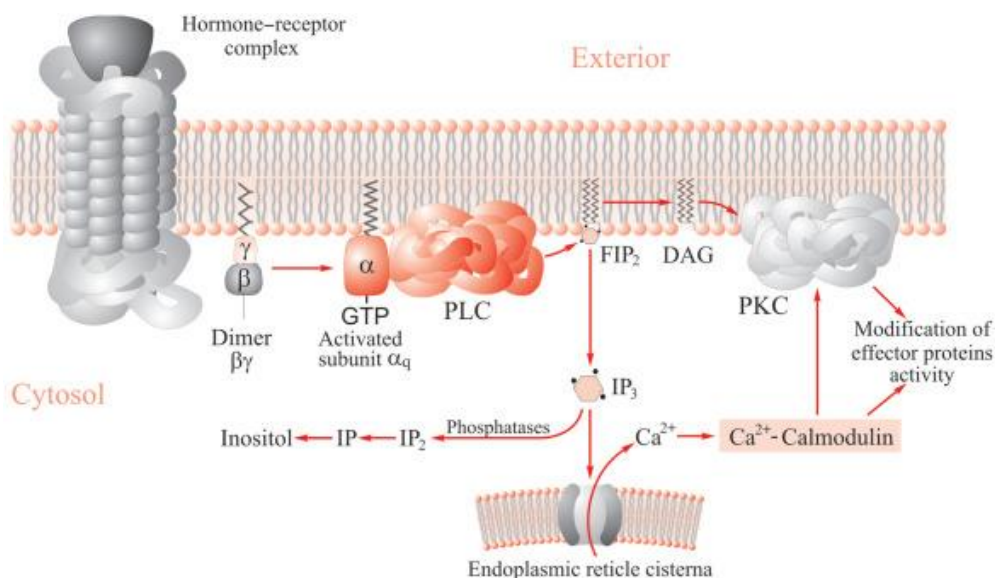


Figura 1. Representação da via do inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), demonstrando o processo de sinalização responsável pela liberação de cálcio do retículo endoplasmático, essencial para a ativação celular e outros processos biológicos (Blanco, 2017, p 553)

Para que seja desencadeada a ativação desta via, e consequentemente, para que as oscilações de cálcio aconteçam, é crucial que haja nos espermatozoides a proteína fosfolipase C zeta (PLC ζ) e esta encontra-se localizada na área da teca perinuclear dos espermatozoides dos mamíferos. Vários estudos clínicos relataram a relevância desta proteína associando a sua deficiência diretamente a causas de infertilidade masculina (Saleh *et al.*, 2020)

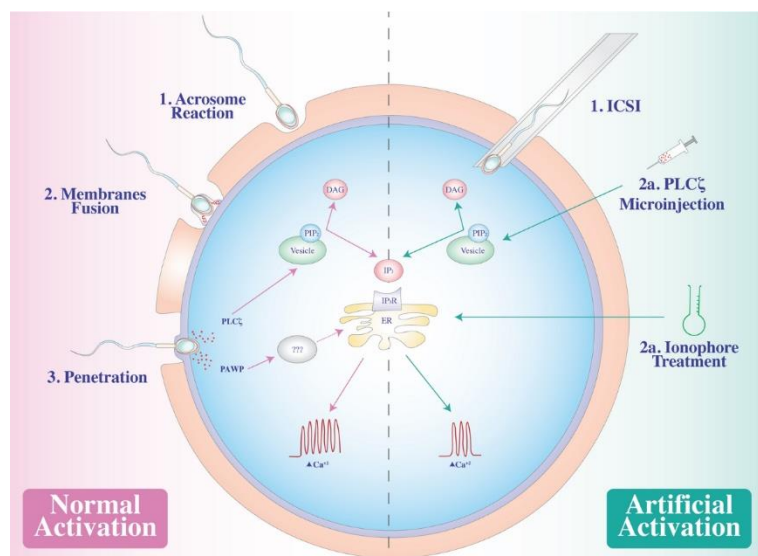


Figura 2. Representação de um ovócito destacando os processos de ativação ovocitária de forma natural e artificial (Zafar *et al.*, 2021, p 3)

Existem vários métodos que visam melhorar a ativação ovocitária, sejam eles elétricos, mecânicos ou químicos (Figura 2) (Nasr-Esfahani *et al.*, 2010).

Ao longo deste trabalho, será abordado um método químico, com a utilização de ionóforos de cálcio para ativação ovocitária artificial.

1.2 Ionóforos de Cálcio

Os ionóforos pertencem a uma classe de compostos que formam complexos com iões específicos e auxiliam no transporte destes ao longo da membrana citoplasmática das células. Um ionóforo possui um *hydrophilic pocket* (bolso hidrofílico), que forma um sítio de ligação para um ião específico (Freedman, 2011, p 61).

Os ionóforos de cálcio, têm sido muito utilizados para permitir a entrada de Ca^{2+} no interior das células que normalmente apresentam uma permeabilidade baixa para

este ião, e então permitir a ativação de vários processos celulares regulados por ele (Freedman, 2011, p 61).

Em reprodução medicamente assistida, este composto é utilizado com o objetivo de ativar os ovócitos pós fecundação de maneira artificial, principalmente em pacientes que tenham histórico de taxas de fertilização baixas ou falhas de fecundação e desenvolvimento embrionário após tentativas consecutivas (Tejera *et al.*, 2021).

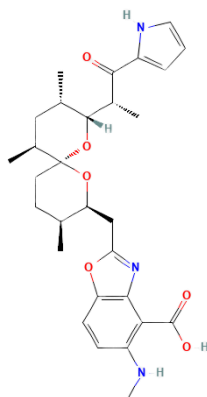


Figura 3. Representação da estrutura química do ionóforo de cálcio calcimycin (A23187) (Calcium ionophore A23187, s.d.)

Relativamente ao seu mecanismo de ação, os ionóforos de cálcio possuem uma certa lipofilicidade (afinidade aos lípidos) que lhes permite interagir com membranas celulares neutralizando cargas positivas de Ca^{2+} . São responsáveis por bombear Ca^{2+} extracelular contra o gradiente de concentração, para o interior do ovócito aumentando na membrana citoplasmática do mesmo, a sua concentração, e desencadeando assim a sua ativação (Xu *et al.*, 2021, p 2).

Atualmente, são comercializadas duas marcas de ionóforos de cálcio, a calcimycin (A23187) e a ionomycin.

Para que produtos sejam comercializados na União Europeia, é necessário que possuam o selo CE. Esse selo indica que o produto passou por um processo de avaliação pelo fabricante e atende aos requisitos de segurança, saúde e proteção ambiental da UE. A certificação é exigida para produtos fabricados em qualquer lugar do mundo e posteriormente comercializados na UE (CE marking – obtaining the certificate, EU requirements - Your Europe, s.d.). Por essa razão, é importante ressaltar que a ionomycin não possui o selo CE.

1.3 Como são utilizados os ionóforos de cálcio em reprodução medicamente assistida?

1.3.1 Calcimycin (A23187)

O modo de aplicação dos ionóforos varia significativamente de acordo com o objetivo do estudo ou o protocolo específico adotado pelo laboratório.

Num estudo conduzido pelo Instituto Valenciano de Fertilidade (IVI), a aplicação dos ionóforos foi feita diretamente após a ICSI. Este processo consistia em imediatamente após microinjeção dos ovócitos colocá-los a incubar durante 15 minutos em placas de petrit previamente preparadas contendo gotas de ionóforos de cálcio com condições de temperatura, CO₂ e O₂ controladas (Figura 4). Após os 15 minutos os ovócitos foram colocados a incubar em uma nova placa contendo um meio de cultura diferente (Tejera *et al.*, 2021, p 288).

Nos dias que se seguiram, foram feitas avaliações referentes à presença/ausência de fecundação (dia 1) e desenvolvimento embrionário (dias 3 e 5). A seleção embrionária para transferência ou para criopreservação ocorreram em dias 3 e 5 dependendo das qualidades e características embrionárias apresentadas. Posteriormente, foram realizadas transferências únicas e/ou duplas de embriões dependendo do histórico do paciente (Tejera *et al.*, 2021, p 288).

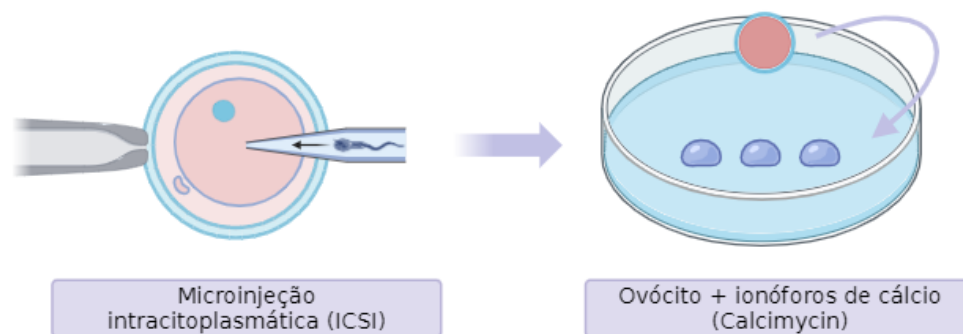


Figura 4. Procedimento de ativação ovocitária artificial utilizando ionóforos de cálcio (calcimycin) após injeção intracitoplasmática (ICSI) (Scientific Image and Illustration Software | BioRender, s.d.)

Noutro estudo foram feitas duas abordagens, uma parecida com a descrita anteriormente, consistindo em colocar os ovócitos a incubar em ionóforos diretamente após ICSI e outra que visava a reativação dos ovócitos após falha de fertilização neste mesmo ciclo utilizando os ionóforos de cálcio (Xu *et al.*, 2021).

1.3.2 Ionomycin

No que diz respeito à ionomycin, o estudo que será considerado como referência é o de Heindryckx *et al.* (2008), que teve como objetivo avaliar a eficiência da ativação ovocitária artificial (AOA) como solução após ciclos de ICSI malsucedidos devido a fatores espermáticos.

Assim como ocorre com a calcimycin, o tratamento com a ionomycin é realizado logo após a ICSI com algumas diferenças no protocolo.

A primeira diferença refere-se à injeção de CaCl_2 juntamente com o espermatozoide durante a ICSI (Figura 5) (Heindryckx *et al.*, 2008).

Após microinjeção os ovócitos passaram por um período de “descanso” correspondente a 30 minutos em meio de clivagem (*Cook Cleavage medium*). Em seguida, os ovócitos microjantados foram incubados durante 10 minutos em gotas de ionomicyn de 10 $\mu\text{mol/L}$ ionóforo de Ca^{2+} (Ionomycin, cat. no. 159611; MP Biomedicals) dissolvido em meio de clivagem e subsequentemente foram lavados intensivamente e colocados novamente a incubar durante 30 minutos (Heindryckx *et al.*, 2008, p 663).

Para finalizar, o procedimento com os ionóforos foi repetido durante 10 minutos e após sucessivas lavagens os ovócitos foram colocados a incubar em meio de clivagem (Heindryckx *et al.*, 2008, p 664).

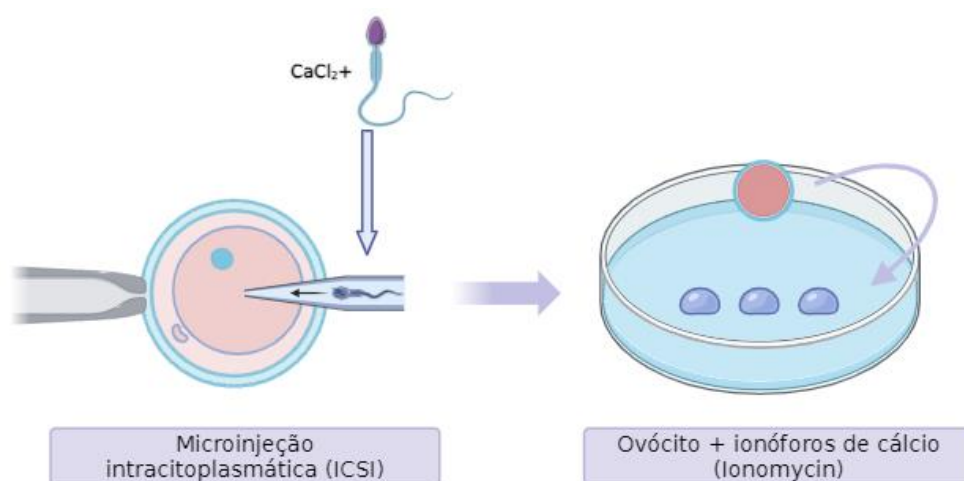


Figura 5. Procedimento de ativação ovocitária artificial utilizando ionóforos de cálcio (ionomycin) após injeção intracitoplasmática (ICSI) juntamente com cloreto de cálcio (CaCl_2) (Scientific Image and Illustration Software | BioRender, s.d.)

Os efeitos dos ionóforos de cálcio englobam várias etapas durante o processo de fertilização *in vitro* nomeadamente, a fertilização em si, clivagem, implantação, taxa de gestação e de nados-vivos (Murugesu *et al.*, 2017, p 480).

1.4 Objetivos

O presente estudo teve como objetivos avaliar as taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e sucesso gestacional, após a utilização de ionóforos de cálcio como técnica de ativação ovocitária artificial, considerando fatores como idade materna avançada e infertilidade masculina.

Capítulo II

Implicações na Fertilização, Desenvolvimento embrionário, Taxa de Implantação e Gestação

2.1 Implicações na Fertilização

Como mencionado anteriormente, a utilização de ionóforos de cálcio tem um impacto significativo nas taxas de fertilização. Para compreender como este composto pode influenciar as taxas de fertilização, serão analisados alguns estudos que abordam tanto fatores de infertilidade masculina quanto feminina.

Um estudo realizado entre 2006 e 2007 no Brasil, teve como objetivo avaliar os efeitos da ativação ovocitária artificial, utilizando ionóforos de cálcio calcimycin (A23187) após ICSI com espermatozoides de diferentes origens. Foram avaliados 314 ciclos, divididos posteriormente em três grupos de acordo com a origem da amostra seminal: o primeiro grupo com amostras de origem ejaculatória (n=92); o segundo, com amostras epididimais (n=82); e o terceiro, com amostras testiculares (n=140) (Borges *et al.*, 2009, p 45 e 46).

Cada um desses grupos foi subdividido com base na utilização ou não de AOA com ionóforos de cálcio. Adicionalmente, os ciclos que incluíam mulheres com idade <36 anos foram avaliados separadamente (Borges *et al.*, 2009, p 45).

Imediatamente após a ICSI, os ovócitos foram incubados num meio de cultura contendo 5Mmol/L de ionóforos de cálcio A23187 (4-bromo calcium ionophore A23187, Sigma B7272, EUA) a 37°C e 6% de CO₂ por 30 minutos. O sucesso da fertilização foi determinado 18 horas após a ICSI, quando a presença de dois pronúcleos distintos foi observada. (Borges *et al.*, 2009, p 47).

Não foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos com diferentes origens de espermatozoides no que diz respeito à taxa de fertilização, à percentagem de embriões de alta qualidade no terceiro dia de desenvolvimento, à taxa de implantação, à taxa de gestação e à taxa de aborto espontâneo (Figura 6) (Borges *et al.*, 2009, p 47).

<i>Sperm origin</i>	<i>Subgroup</i>	<i>n</i>	<i>Fertilization rate (%)</i>	<i>High-quality embryos (%)^a</i>	<i>Implantation rate (%)</i>	<i>Pregnancy rate (%)</i>	<i>Miscarriage rate (%)</i>
Ejaculate	AOA	46	(220/317) 69.4	(116/220) 52.7	15.3	(11/46) 23.9	(4/11) 36.3
	Control	46	(259/340) 76.2	(134/259) 51.7	12.0	(10/46) 21.7	(4/10) 40.0
Epididymis	AOA	41	(254/519) 48.9	(139/254) 54.7	16.7	(11/41) 26.8	(3/11) 27.3
	Control	41	(399/599) 66.6	(212/399) 53.1	19.7	(13/41) 31.7	(3/13) 23.1
Testicle	AOA	70	(473/935) 50.6	(189/473) 40.0	13.1	(17/70) 24.2	(8/17) 47.1
	Control	70	(534/952) 56.1	(236/534) 44.2	15.1	(16/70) 22.8	(4/16) 25.0

AOA = artificial oocyte activation.

There were no statistically significant differences between AOA and controls for any of the sperm categories.

^aGrade A embryos.

Figura 6. Efeito da ativação ovocitária com ionóforos de cálcio em pacientes com espermatozoides obtidos de origens distintas (Borges *et al.*, 2009, p 48).

Embora não se tenham verificado diferenças estatisticamente significativas no grupo de mulheres com idade < 36 anos em nenhuma das categorias avaliadas, foi possível observar um aumento na percentagem de qualidade embrionária (74,5% vs 53,0%, para AOA e grupo de controlo respetivamente) e taxa de implantação (19,3% vs 10,5%) (Borges *et al.*, 2009, p 48).

Quando foram utilizados espermatozoides de origem ejacutória, AOA também demonstrou um aumento na taxa de percentagem de qualidade embrionária (64,4% vs 50,4%, para AOA e grupo de controlo respetivamente), quando utilizado epididimal, porém não quando utilizado espermatozoide de origem testicular (Borges *et al.*, 2009, p 48).

Este estudo sugere que o tratamento com ionóforos de cálcio melhora os resultados obtidos pela ICSI apenas com ovócitos derivados de mulheres com idades < 36 anos, o que indica que para além dos espermatozoides, os ovócitos desempenham também um papel importante no que diz respeito a ativação ovocitária (Borges *et al.*, 2009, p 50). Além disso, mostrou-se eficaz em relação ao desenvolvimento embrionário, suportando a hipótese de que as oscilações de cálcio podem fornecer mais do que meros estímulos para *meiotic resumption* e que desempenham um papel a longo termo no que diz respeito eventos embrionários (Borges *et al.*, 2009, p 50).

Apesar da informação relevante obtida neste estudo, este apresenta limitações nomeadamente o reduzido número de pacientes nos subgrupos, sugerindo a necessidade de estudos randomizados com uma amostra maior para obter resultados mais robustos e conclusivos (Borges *et al.*, 2009, p 51).

Após analisar um fator tão importante quanto a origem seminal e as implicações da utilização de AOA nesses casos, surge a necessidade de compreender o impacto que essa técnica pode ter em pacientes com problemas de infertilidade severa.

Em 2012, foi realizado outro estudo com o objetivo de avaliar a eficácia dos ionóforos de cálcio nesse tipo de pacientes, utilizando dados de dois centros (Áustria e Alemanha).

Foram utilizados ovócitos de 66 pacientes (75 ciclos) e amostra seminal de 29 pacientes azoospermicos e 37 de pacientes criptozoospermicos (Ebner *et al.*, 2012, p 1432).

O ionóforo de cálcio utilizado neste estudo foi a calcimycin (GM508 Cult-Active), com aplicação imediatamente após a ICSI.

A Figura 7, apresenta uma tabela que demonstra que, de modo geral, uma taxa de fertilização de 57% pode ser atingida com a utilização de ionóforos de cálcio, o que comprova um aumento desta taxa face aos ciclos anteriores dos mesmos casais (Ebner *et al.*, 2012, p 1434).

Em termos individuais, 50 (75,8%) dos 66 pacientes beneficiaram da aplicação dos ionóforos de cálcio. Pacientes azoospermicos apresentaram taxas de fertilização significativamente maiores em comparação com os criptozoospermicos. Embora essa diferença também tenha sido observada em ciclos anteriores, ela foi ainda mais acentuada neste estudo (Ebner *et al.*, 2012, p 1434).

TABLE 1

Results of the prospective application of A23187 as compared with the previous cycles without the use of ionophore.

	A23187 cycle	Previous cycles	P value
No. of cycles	75	88	
COC collected (mean ± SD)	9.6 ± 5.8	11.2 ± 8.3	NS
Fertilization rate	379/666 (56.9)	244/704 (34.7)	< .001
Azoospermia	228/354 (64.4) ^b	91/220 (41.4) ^c	< .001
Cryptozoospermia	151/312 (48.4) ^b	153/484 (31.6) ^c	< .001
Blastocyst formation ^a	67/119 (56.3)	20/79 (25.3)	< .001
No. of ETs	73 (97.3)	79 (89.8)	NS
Implantation rate	42/126 (33.3)	6/150 (4.0)	< .001
Positive β-hCG	34 (46.6)	6 (7.6)	< .001
Clinical pregnancy rate	29 (29.7)	5 (6.3)	< .001
Live-birth rate	25 (34.2)	1 (1.3)	< .001
Children born	32	1	

Note: Values in parentheses are percentages. β-hCG = β human chorionic gonadotropin; COC = cumulus-oocyte complex; ET = embryo transfer; NS = not statistically significant; SD = standard deviation.

^a Exclusive data from Kinderwunsch Zentrum Linz.

^b P < .001.

^c P < .05.

Ebner. Ionophore and severe male infertility. *Fertil Steril* 2012.

Figura 7. Comparação dos resultados obtidos com a aplicação do ionóforo de cálcio A23187 em relação aos ciclos anteriores sem o uso de ionóforos (Ebner *et al.*, 2012, p 1434).

A análise destes estudos, considerando as origens espermáticas e os fatores de infertilidade permite concluir que, pacientes que tiveram taxas de fertilização baixas em ciclos anteriores poderão beneficiar desta técnica, contudo e como já mencionado anteriormente, é importante destacar que o fator ovocitário é tão relevante quanto o espermático (Borges *et al.*, 2009, p 51).

Salienta-se ainda que a resposta positiva dos ovócitos microinjetados com espermatozoides ejaculatórios e epididimais à AOA, em contraste com os espermatozoides testiculares, pode estar relacionada com a maturidade do espermatozoide e a função de ativação do ovócito (Borges *et al.*, 2009, p 50).

2.2 Desenvolvimento embrionário

Considerando que a utilização dos ionóforos de cálcio influencia as taxas de fertilização, é igualmente essencial explorar os seus impactos subsequentes no desenvolvimento embrionário, uma etapa crítica que determina o sucesso do ciclo reprodutivo. Avaliar como os ionóforos de cálcio afetam aspetos como a clivagem

embrionária, a formação de blastocistos e a viabilidade embrionária pode fornecer *insights* valiosos sobre a eficácia e a segurança dessa técnica em tratamentos de infertilidade.

No ano de 2014 realizou-se um estudo multicêntrico na Áustria, que teve como objetivo analisar pacientes, que em ciclos de fertilização *in vitro* anteriores, não obtiveram sucesso a nível de desenvolvimento embrionário. Neste novo ciclo implementou-se a utilização de ionóforos de cálcio a fim de determinar se haveria uma diferença significativa entre ciclos (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015).

Foram estudados um total de 57 pacientes, de idades que variavam entre 24 e 41 anos de idade. Entre os pacientes, 28% apresentavam problemas a nível tubárico, 47% problemas de infertilidade masculina, o restante dos pacientes apresentava condições como endometriose (15%), ou síndrome dos ovários poliquísticos (10%). De acordo com as condições anteriormente citadas, os pacientes foram igualmente distribuídos por grupos (n= 18,19 e 20 para os grupos A, B e C, respetivamente) (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 98).

Os critérios de inclusão deste estudo consistiam em: interrupção de desenvolvimento embrionário (sem transferência), desenvolvimento embrionário com atraso temporal completo (sem mórula/ sem blastocisto em dia 5 de desenvolvimento) ou, formação de blastocisto reduzida em dia 5 de desenvolvimento correspondendo a $\leq 15\%$, em ciclos anteriores (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, 98).

Pacientes com fator masculino de infertilidade severo e taxas de fertilização após ICSI correspondentes a 30% foram excluídos, pois não cumpriam os pré-requisitos para a utilização de ionóforos (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, 98).

Os ciclos de ICSI anteriores serviram como grupo de controlo, embora 23 pacientes tivessem mais de um ciclo anterior mostrando incompetência de desenvolvimento embrionário (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 98).

Todos os ovócitos maduros foram expostos ao ionóforo de cálcio calcimycin (GM508 Cult-Active;Gynemed, Lensahn,Germany) durante 15 minutos imediatamente após a ICSI (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 98).

O efeito do tratamento com ionóforos de cálcio foi medido pela taxa de chegada dos embriões a fase de blastocisto. Foi possível observar uma diferença significativa entre os grupos indicando que houve uma melhora na taxa de blastulação através do tratamento (Figura 8) (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 99).

Constatou-se que mais embriões foram vitrificados no grupo de tratamento com ionóforos quando comparado ao grupo de controlo (74 vs 6) (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 99).

Table 1 Comparison of preimplantation development between the study (calcium ionophore treatment) and control group (conventional ICSI), subdivided by indication.

	MII	2PN	Cleavage	Survival ^a	Blastulation ^b
Ionophore cycle					
Group A	138	105 (76.1)	103 (98.1)	49 (47.6)	35/73 (48.0)
Group B	187	137 (73.3)	135 (98.5)	83 (61.5)	62/123 (50.4)
Group C	187	144 (77.0)	142 (98.6)	81 (57.0)	62/138 (44.9)
Control cycle					
Group A	122	85 (69.7)	83 (97.7)	2 (2.4)	0/55 (0)
Group B	156	109 (69.9)	97 (89.0)	31 (32.0)	0/102 (0)
Group C	211	164 (77.7)	149 (90.9)	30 (20.1)	18/153 (11.8)

MI, metaphase II; PN, pronuclei.
McNemar test.
Values in parentheses are percentages. Blastulation is calculated as blastocyst per 2PN cultured on Day 5. Cleavage is assessed as cleavage to 2-cell stage. Survival refers to residual mitotic activity on day of transfer.
Group A, developmental arrest; Group B, developmental delay; Group C, reduced blastulation.
^{a,b}p < 0.01 (study group compared with the corresponding control group).

Figura 8. Comparação do desenvolvimento pré-implantacional entre estudos utilizando ionóforos de cálcio (calcimycin) e grupos de controlo (ICSI convencional) (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 3).

Através dos resultados deste estudo constata-se que a utilização dos ionóforos de cálcio pode ser útil quando em ciclos anteriores existiram problemas relativamente ao desenvolvimento embrionário (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 101).

É importante ressaltar que os resultados obtidos foram independentes do protocolo de estimulação escolhido demonstrando que apenas a alteração relativamente ao protocolo de estimulação pode não ser eficaz no que diz respeito a melhora de resultados em pacientes que apresentem mau prognóstico e problemas a nível de desenvolvimento embrionário (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 101).

Como evidenciado, os resultados apresentados são meramente indicações preliminares uma vez a amostra populacional no grupo de controlo é relativamente baixa (Ebner, Oppelt, *et al.*, 2015, p 101).

Noutro estudo realizado entre 2018 e 2020 em Taiwan, o objetivo foi investigar se a ativação ovocitária artificial poderia melhorar a qualidade embrionária em pacientes com idade materna avançada e com reserva ovocitária diminuída (Tsai *et al.*, 2022).

Neste estudo foi utilizada a calcimycin (GM508 CultActive, GYNEMED), em um processo que consistiu em incubar os ovócitos em gotas 50 µL durante 15 minutos, imediatamente após a ICSI (Tsai *et al.*, 2022, p 3).

Os embriões seguiram em cultura em micro-gotas, em condições correspondentes a 37°C a 6% ou 6,5% CO₂. Posteriormente, foram avaliados em dia 3 de desenvolvimento, de grau 1 à grau 3 de acordo com a percentagem de fragmentação, a uniformidade dos blastómeros e se havia presença de nucleação (Tsai *et al.*, 2022, p 4).

Tendo em conta que a qualidade embrionária estudada nesta população era precária a maioria dos embriões foi criopreservado na fase de clivagem e outros continuaram o processo de desenvolvimento até a fase de blastocisto (Tsai *et al.*, 2022, p 4).

A população estudada foi dividida em 2 subgrupos baseados na idade como é possível observar na figura que se segue (Tsai *et al.*, 2022, 6).

Table 4 Subgroup analyses (categorized relative to the age of 40 years) of POSEIDIN Group 4 patients with AOA or non-AOA

Parameters	< 40 (35 ~ 39) y/o		P value	≥ 40 (40 ~ 45) y/o		P value
	AOA (n = 32)	Non-AOA (n = 68)		AOA (n = 59)	Non-AOA (n = 100)	
Age (years)	37.8 ± 1.5	37.5 ± 1.3	0.378	42.6 ± 1.6	42.3 ± 1.4	0.240
Body mass index (kg/m ²)	22.4 ± 3.0	23.1 ± 3.0	0.263	23.5 ± 4.2	23.5 ± 3.7	0.889
Antral follicle counts (n)	5.9 ± 2.6	7.8 ± 3.6	0.012	6.5 ± 3.2	6.3 ± 3.5	0.794
Anti-Müllerian hormone (ng/ml)	0.50 ± 0.30	0.72 ± 0.29	0.001	0.61 ± 0.33	0.63 ± 0.34	0.728
No. of oocytes retrieved (n)	3.3 ± 2.1	5.0 ± 3.1	0.008	4.5 ± 2.8	4.1 ± 2.9	0.394
No. of metaphase II oocytes (n)	2.6 ± 1.8	4.0 ± 2.5	0.007	3.5 ± 2.2	3.4 ± 2.4	0.833
Maturation rate (%)	81.3 ± 21.8	82.3 ± 17.6	0.808	80.4 ± 20.4	82.0 ± 20.5	0.626
No. of fertilized oocytes (n)	2.3 ± 1.7	3.4 ± 2.3	0.024	3.0 ± 1.9	2.8 ± 2.0	0.618
Fertilization rate (%)	86.9 ± 23.5	82.5 ± 24.8	0.403	85.8 ± 24.6	83.4 ± 26.8	0.575
No. of Day 3 embryos (n)	2.2 ± 1.5	3.0 ± 2.3	0.084	2.8 ± 1.6	2.6 ± 2.0	0.547
Cleavage rate (%)	92.2 ± 20.8	86.3 ± 20.6	0.200	96.3 ± 31.3	86.6 ± 24.3	0.035
No. of top-quality Day 3 embryos (n)	1.2 ± 1.4	1.3 ± 1.6	0.604	1.5 ± 1.2	1.2 ± 1.4	0.120
≥ 1 top-quality Day 3 embryos	64.5%	58.5%	0.571	78.9%	53.7%	0.002
Top-quality Day 3 embryos rate (%)	46.5 ± 41.5	37.1 ± 37.0	0.267	56.8 ± 37.7	34.6 ± 37.7	0.001
Top-quality Day 3 embryos rate ≥ 50	51.6%	44.6%	0.521	64.9%	41.1%	0.004

Data are presented as the mean ± standard deviation and % (n)

AOA Artificial oocyte activation

Figura 9. Análise de subgrupos (categorizados relativamente a idade correspondente a 40 anos) do grupo POSEIDIN com utilização de ionóforos de cálcio e sem utilização de ionóforos (Tsai *et al.*, 2022, p 6)

Relativamente ao subgrupo de idades ≥ 40 anos, notou-se uma diferença nos grupos que usufruíram da utilização dos ionóforos (AOA) e dos que não (Non-AOA)

Para o grupo AOA, obtiveram-se taxas de clivagem (96,3 ± 31,3% vs 86,6 ± 24,3%,) e TQE (*top quality embryos*) (56,8 ± 37,7% vs 34,6 ± 37,7%,) maiores, assim como também taxas de percentagem de mais de 1 TQE (78,9% vs 53,7%,) e TQE ≥ 50 (64,9% vs. 41,1%,).

Já em relação ao subgrupo de idade < 40 anos as taxas de clivagem, TQE, percentagem de mais de 1 TQE ≥ 50 foram similares entre os dois grupos (Tsai *et al.*, 2022, p 6).

Através deste estudo observou-se que as pacientes que utilizaram a técnica de ativação ovocitária através do uso de ionóforos de cálcio obtiveram resultados que estavam associadas a maiores taxas de clivagem e TQE (Tsai *et al.*, 2022, p 7).

No entanto, uma questão pertinente ressaltada neste estudo é a necessidade de realizar outros estudos em grande escala com populações maiores a fim de verificar os resultados obtidos (Tsai *et al.*, 2022, p 8).

Adicionalmente, convém mencionar que os protocolos de estimulação do estudo em questão e o do grupo de controlo divergiram incluindo, antagonistas, agonistas e PPOS (*Progestin-primed ovarian stimulation*) (Tsai *et al.*, 2022, p 9).

Um ponto a ser destacado é que todos os ciclos de fertilização *in vitro* foram realizados pelo mesmo médico e embriologista.

Estes dados sugerem que a AOA com ionóforos de cálcio pode melhorar a qualidade embrionária, especialmente em pacientes com mais de 40 anos de idade (Tsai *et al.*, 2022, p 9).

Um estudo realizado em 2021 teve como objetivo comparar a atividade morfocinética de embriões que utilizaram de técnicas de ativação com ionóforos de cálcios vs embriões com ciclos de ICSI normais. A utilização da técnica de ativação foi considerada baseada no critério de ter sido identificada pelo menos uma variante potencialmente patogênica no gene PLC ζ 1 no gDNA do espermatozoide após falha na fertilização em um ciclo ICSI anterior (Martínez *et al.*, 2021, p 532).

O grupo experimental consistiu em um total de 41 embriões obtidos através de 7 ciclos de ICSI já o grupo de controlo consistiu em 100 embriões obtidos através de 18 ciclos de ICSI com as mesmas condições de cultivo embrionário (Martínez *et al.*, 2021, p 532).

AOA foi preformada imediatamente após ICSI utilizando ionomycin de acordo com Heindryckx *et al.* (2008) com algumas alterações.

Os eventos embrionários avaliados foram parâmetros quantitativos morfocinéticos nomeadamente: extrusão do segundo corpo polar (tPB2), aparecimento do pronúcleo (tPN), desaparecimento do pronúcleo (tPNf), fase das divisões celulares de 2 a 8 células (t2 to t8), início da blastulação (tSB), blastulação completa (tB) (Martínez *et al.*, 2021, p 533).

Relativamente aos resultados obtidos neste estudo, constatou-se que não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos no que dizia respeito os parâmetros morfocinéticos analisados com base nos testes utilizados, exceto nos momentos tPB2, com uma mediana de 2,17 horas no grupo experimental (ICSI-AOA) vs 3,43 horas no grupo de controlo (ICSI), e no momento t3, com valores de 32,60 horas no grupo experimental vs 37,07 horas no grupo de controlo (Martínez *et al.*, 2021, p 533).

Também não foram observadas diferenças estatísticas significativas em relação as médias da morfologia dos embriões após transferência em dia 3 que foi correspondente a 6,4 (SD 1,3) no grupo ICSI-AOA e 6,9 (SD 1,5) no grupo de controlo ICSI (Martínez *et al.*, 2021, p 533).

De modo geral, constatou-se que os embriões derivados de ICSI-AOA com ionomycin apresentaram tempos de desenvolvimento semelhantes aos do grupo de controlo, com exceção dos parâmetros tPB2 e t3 (Martínez *et al.*, 2021, p 533).

Estes resultados sugerem que a AOA pode acelerar tPB2 principalmente devido a habilidade da ionomycin produzir um rápido aumento citoplasmático de cálcio que poderia levar a uma indução antecipada de MPF (maturation-promoting factor) com uma pequena *meiotic resumption* e uma extrusão antecipada do segundo corpo polar (Martínez *et al.*, 2021, p 534).

Estas alterações podem ser explicadas por um aumento transitório não fisiológico do Ca^{2+} intracitoplasmático após o uso de ionóforos de cálcio (Martínez *et al.*, 2021, p 536).

2.3 Taxa de implantação e gestação

Tendo em conta que o uso de ionóforos de cálcio demonstra uma melhoria nas taxas de fertilização e na qualidade embrionária, é plausível que esses efeitos também contribuam para aumentar as chances de uma implantação bem-sucedida. Por esta razão, é crucial explorar como esses efeitos refletem-se nas taxas de implantação e nos desfechos gestacionais.

O primeiro estudo analisado, é uma meta-análise que avaliou nove outros estudos a fim de identificar se a utilização dos ionóforos de cálcio apresentava diferenças significativas a nível de fertilização, clivagem, chegada a blastocisto, taxa de implantação e gestação (Murugesu *et al.*, 2017).

Após seleção e análise destes nove estudos, foi determinada uma taxa de implantação correspondente a 19,9% (191 de 958) no grupo ICSI AOA, enquanto no grupo ICSI 12,0% (106 de 885) (Murugesu *et al.*, 2017, p 479).

As taxas de gestação num geral e nado-vivos apresentaram um aumento significativo. Esses resultados são corroborados pela observação dos embriões nos primeiros dias de desenvolvimento, com melhorias nas taxas de clivagem, chegada a blastocisto, fertilização e implantação. Os únicos resultados que não demonstraram aumentos estatísticos significativos foram relativamente as taxas de gestação após um ciclo e a taxa de TQE. No entanto, mesmo nesses dois casos, foi observado um aumento. Após a aplicação de métodos estatísticos ajustados, essa diferença mostrou-se estatisticamente significativa (Murugesu *et al.*, 2017, p 480).

Neste estudo foi evidenciado que houve variação relativamente aos protocolos de ativação ovocitária, bem como diferenças nos critérios de seleção dos pacientes, indicando que esses fatores poderão ter contribuído para uma maior variabilidade nos resultados. Além disso, em alguns casos, o método de obtenção dos espermatozoides não estava claramente definido ou especificado. Outra adversidade observada foi a falta de rastreabilidade dos embriões, tendo em conta que alguns deles não foram transferidos, o que comprometeu o acompanhamento e a análise dos dados (Murugesu *et al.*, 2017, p 481).

Nesta meta-análise, todos os estudos utilizaram ICSI, com exceção de um que empregou IMSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides morfolologicamente selecionados). Embora a IMSI não tenha demonstrado alteração na taxa de fertilização em comparação com a ICSI, apresentou resultados com taxas significativamente mais altas em termos de taxas de implantação e gestação (Murugesu *et al.*, 2017, p 481).

A conclusão desta revisão sistemática, é promissora, particularmente para casais em que a utilização apenas da ICSI resulta em baixas taxas de fertilização. É evidenciado também uma importância particular com relação a casos de ICSI em que a causa seja uma deficiência nos fatores de ativação do ovócito transmitidos pelos espermatozoides ou uma resposta defeituosa do ovócito a esses fatores (Murugesu *et al.*, 2017, p 481).

Em outro estudo, foi feita uma análise de vários centros durante quase dois anos, um total de 6 clínicas na Alemanha (n=5) e Áustria (n=1). Todos os pacientes tinham idades correspondentes a: mulheres $33,9 \pm 4,1$ anos e homens $37,3 \pm 5,8$ anos (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 360).

Para a ativação ovocitária, as placas de cultura foram previamente preparadas 50 µL de ionóforos de cálcio A23187 (CultActive, Gynemed, Lensahn, Germany), várias gotas de meio de cultura *standard* para lavagem após ativação e cobertas com óleo mineral (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 361).

Os grupos que serviram de controlo diziam respeito aos ciclos anteriores destes mesmos casais (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 361).

No geral, 100 pacientes tiveram um embrião ou blastocisto transferido que resultou em 35% de taxa de gestação, 7 (20%) abortos espontâneos foram observados acontecendo na 5^a, 8^a, 9^a (3x), 11^a e 19^a semanas de gestação (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 362).

A taxa de nado-vivos, foi correspondente a 28% como se pode observar na Figura 10. A taxa de gestação múltipla correspondeu a quase 30% na Alemanha, mas sem gestação de trigêmeos. Todos os nado-vivos nasceram saudáveis com exceção de um resultado de uma gestação única. Este indivíduo foi diagnosticado com atresia anal (ânus imperfurado). A taxa de malformação não foi considerada aumentada quando comparada com os ciclos anteriores e este mau prognóstico manteve-se a uma taxa correspondente a 3% (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 362).

Table 2 Treatment outcome in the study group with a ready-to-use ionophore (rate in per cent).

Started cycle	101
Cycles with at least one fertilization	100
Pregnancy	37 (37)
Ectopic pregnancy	2
Clinical pregnancy	35 (35)
Multiple pregnancy	10/35 (28.6)
Vanishing twins	3
Spontaneous abortion	7 (20.0)
Implantation rate	47/185 (25.4)
Live birth per started cycle	28 (27.7)
Children born from singleton pregnancy	18
Children born from twin pregnancy	17
Malformation	1 (2.9)

Figura 10. Resultados do estudo do grupo que utilizou ativação ovocitária artificial com ionóforos de cálcio (calcimycin) apresentado em percentagens(Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 362).

Relativamente aos resultados neonatais, não foi possível realizar uma comparação e determinar o efeito da utilização dos ionóforos de cálcio entre os ciclos

anteriores e o atual devido à falta de dados disponíveis. No ciclo anterior foi apenas registado um parto.

No entanto, é possível observar através da figura que se segue os resultados neonatais obtidos neste ciclo com ativação ovocitária artificial com calcimycin (Ebner, Montag, *et al.*, 2015).

Table 3 Neonatal outcome of children born after artificial oocyte activation.

	<i>Singleton pregnancy</i>	<i>Twin pregnancy</i>
Children	18	17
Delivery		
Median (week)	39	37
Range (week)	32–42	30–41
Length (cm)		
Median (cm)	50	48
Range (cm)	45–54	39–54
Weight (g)		
Median (g)	3180	2440
Range (g)	2510–4040	1475–3890
Malformation ^a	1	0

^aAnal atresia.

Figura 11. Resultados neonatais de crianças nascidas após tratamento de ativação ovocitária artificial com ionóforos de cálcio (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 362).

Constatou-se através deste estudo que 99% dos pacientes usufruíram da técnica com aplicação dos ionóforos de cálcio comparativamente aos ciclos anteriores, resultando em 28% de taxa de nados-vivos (Ebner, Montag, *et al.*, 2015, p 360).

Noutro estudo realizado na Bélgica, foram incluídos todos os ciclos que utilizaram o tratamento com ionóforos de cálcio entre 2004 e 2015 (Mateizel *et al.*, 2018). A seguir, serão discutidos os principais achados e metodologias deste estudo.

Relativamente à metodologia, neste estudo estão incluídos embriões de transferências a fresco, congelados e biopsiados para teste de genético de pré-implantação (Mateizel *et al.*, 2018).

Em alguns ciclos o tratamento foi aplicado em todos os ovócitos enquanto noutros alguns dos ovócitos *sibling* foram tratados com ionóforos e outros não. No total 237 ciclos iniciados resultaram em 176 ciclos com transferência em fresco e 62 ciclos com vários embriões vitrificados (Mateizel *et al.*, 2018).

Durante este estudo foram utilizados dois protocolos para utilização de ionóforos de cálcio e consequentemente duas marcas, ionomycin e calcimycin (A23187) (Mateizel *et al.*, 2018).

Para o ionomycin o procedimento foi realizado como descrito por Heindryckx *et al.* (2008), porém com alterações relativamente aos tempos de exposição. Durante a ICSI foi microinjetada juntamente com o espermatozoide, uma pequena quantidade de CaCl_2 (cloreto de cálcio) correspondente a 0,1 mol/L, seguido de 30 minutos de incubação a 37 °C com 6% CO_2 , 5% O_2 , e 89% N_2 . Em seguida os ovócitos foram incubados durante 7 minutos em 10 $\mu\text{mol/L}$ de ionomycin (MP Biomedical, Brussels, Belgium) e posteriormente lavados com meio de cultura de clivagem, foi ainda realizada uma segunda incubação com ionomycin durante 7 minutos, aplicada 30 minutos depois, seguido de uma lavagem novamente com meio de cultura de clivagem com as mesmas condições anteriormente mencionadas (Mateizel *et al.*, 2018).

Já a calcimycin (A23187) foi apenas utilizada em alguns casos (n=17), em ciclos onde os ovócitos *siblings* foram tratados com ionomycin. Consistiu em imediatamente após ICSI, incubar os ovócitos durante 15 minutos na solução de ionóforos de cálcio (CultActive; Gynmed, Lensahn, Germany) de acordo com as instruções recomendadas. Após a lavagem dos ovócitos com meio de clivagem, estes foram incubados com as condições anteriormente mencionadas (Mateizel *et al.*, 2018).

Com relação aos resultados, obteve-se um total de 74 gestações com resultado positivo da hCG após transferência em fresco (n = 55) e embriões desvitrificados (n = 19) com origem de ciclos onde a ICSI foi realizada utilizando ionóforos de cálcio: dois com A23187 e 5 após ciclos mistos de ET onde os ovócitos *sibling* foram tratados ou com ionomycin ou com A23187, e 67 com tratamento com ionomycin. Destas 74 gestações, 9 (12,2%) foram bioquímicas, 12 (16,2%) resultaram em abortos espontâneos (< 12 semanas), e 14 (18,9%) não se obteve informação por perda de traçabilidade. Não foram registados abortos espontâneos tardios, nem clínicos e nem gestações extrauterinas. Destas 39 gestações (34 a fresco e 5 TEC's) foram obtidos de 35 pacientes e resultaram em 47 nados-vivos: 31 gestações únicas e 16 duplas. Relativamente as 31 gestações únicas, 29 nasceram após o tratamento com ionomycin e dois do tratamento com A23187. Em relação as gestações de gémeos, 12 resultaram de transferências a fresco após tratamento com ionomycin e 4 transferências a fresco resultantes do tratamento utilizando ambos protocolos (Mateizel *et al.*, 2018).

Todas as crianças nasceram vivas, no entanto, um dos gémeos morreu depois do parto devido a malformações congénitas (Mateizel *et al.*, 2018).

Quando comparado o histórico de dados de controlo (Belva *et al.*, 2011), aos resultados obtidos pelo centro, no que diz respeito aos nados-vivos não foram observadas diferenças estatísticas significantes relativamente a peso e comprimento dos nados-vivos de gestações únicas ($3224 \text{ g} \pm 582$ e $49,6 \text{ cm} \pm 3,1$; $P = 0,4$ e $P = 0,1$ respetivamente), e gestações duplas ($2394 \text{ g} \pm 522$ e $46,2 \text{ cm} \pm 3,3$; $P = 0,2$ e $P = 0,5$ respetivamente) (Mateizel *et al.*, 2018).

Não foram detetadas grandes malformações em gestações únicas. No entanto, relativamente as gestações duplas, três foram diagnosticadas com malformações significativas: um com deslocação unilateral da anca e do joelho posteriormente tratado com intervenção cirúrgica, um com atresia anal, e um que como mencionado anteriormente faleceu não muito tempo após o seu nascimento devido a grave displasia renal cística congênita e hipoplasia pulmonar (cariotipo normal). Pequenas malformações foram encontradas em 7 nado-vivos de gestações únicas e um de gestação dupla. Neste estudo, um total de *major* malformações obtiveram uma taxa correspondente a 6,3% (3/47) que foi comparado com 4,1% ($P = 0,4$) como descrito previamente em um estudo neste mesmo centro (Mateizel *et al.*, 2018).

Ainda que muitas das famílias que não residissem no país onde o estudo foi realizado, a informação relacionada a criança gerada foi disponibilizada pelas mesmas o que resultou em um completo relatório de cinco crianças (Mateizel *et al.*, 2018).

Uma vez que a AOA representa uma técnica invasiva não fisiológica, é importante que não se perca a traçabilidade das crianças geradas a partir dela (Mateizel *et al.*, 2018).

Adicionalmente, é crucial ressaltar que foi constatado que a taxa de malformação congénita esteve associada a crianças que resultaram de tratamento com ionomycin (Mateizel *et al.*, 2018).

Capítulo III

Comparação de Duas Marcas de Ionóforos

3.1 Calcimycin vs Ionomycin

Um estudo publicado em 2023 realizado em Espanha, teve o intuito de comparar a eficiência das duas marcas de ionóforos nomeadamente ionomycin e calcimycin. Utilizou um modelo humano partenogénico com maturação ovocitária *in vitro* para avaliar as taxas de ativação, desenvolvimento partenogénico e dinâmica morfocinética dos ovócitos ativados utilizando um sistema *time-lapse* de incubação.

Para a ICSI foram microinjetadas esferas de látex (LM; accu-beads+™, Hamilton Thorne INC. USA) com dimensões semelhantes às cabeças dos espermatozoides com o objetivo de simular a microinjeção e gerar os partenotes (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1663).

O material genético foi obtido de dadoras entre 18 e 35 anos (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1663).

3.1.1 Protocolo Calcimycin

O protocolo utilizando a calcimycin, A23187 (GM508 CultActive, Gynemed, Germany), foi bastante parecido aos já descritos anteriormente. Consistiu em incubar os ovócitos durante 15 minutos em gotas de 30 µL de ionóforos imediatamente após a ICSI. Em seguida os ovócitos foram lavados duas vezes em meios MOPS e HEPES (GM501 Cult, Gynemed, Germany), e incubados a 37°C, 6% CO₂, e humidade relativa de 95% (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, 1663).

3.1.2 Protocolo Ionomycin

Quanto a ionomycin (*Streptomyces conglobatus*, Ionomycin, I9657, Sigma Aldrich) esta foi inicialmente diluída em DMSO (Sigma-Aldrich) para uma concentração correspondente a 0,7 mg/mL. Posteriormente essa solução foi diluída em meio de cultura G1™ (Vitrolife, Sweden) ficando com uma concentração final de 10 µM e incubada a 37°C, 6% CO₂, e 95% de humidade relativa *overnight*. A ativação ovocitária artificial foi realizada de acordo com Heindryckx *et al.* (2008) com algumas modificações. Os ovócitos tiveram um tempo de “repouso” correspondente a 30 minutos após a ICSI em G1™ PLUS (Vitrolife, Göteborg, Sweden) e em seguida incubados na solução de

ionomycin previamente preparada durante 7 minutos. Posteriormente foram lavados 10 vezes em G1™ PLUS e incubados durante 30 minutos em G1™ PLUS. Subsequentemente os ovócitos foram expostos a solução de ionomycin durante duas rondas adicionais e incubados com as mesmas condições já descritas (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1663).

3.2 Resultados

Através deste estudo foi possível constatar que o tratamento com ionomycin resultou em taxas de ativação maiores comparativamente a A23187 (38,5% vs 23,8%, $p=0,15$). É importante ressaltar que nenhum dos partenogénicos ativados com A23187-deram origem a blastocistos (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1664).

Em relação aos SD, a avaliação morfocinética, no grupo tratado com a A23187, o tPNa e o tPNf notaram-se mais lentos (11,84 vs 5,31, $p=0,002$ e 50,15 vs 29,69, $p=0,005$, respetivamente) (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1661).

De modo geral o grupo da ionomycin obteve taxas desenvolvimento embrionário maiores comparativamente ao grupo da calcimycin (Figura 12) (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1664).

Table 2 Assisted oocyte activation and embryo developmental rates

	Overall parthenotes ($n=81$)	A23187 ($n=42$)	Ionomycin ($n=39$)	Control ($n=39$)	p -value*
Treatment yield					
Activated zygotes, n (%)	25 (30.87)	10 (23.81)	15 (38.46)	NA	0.153
1PN zygotes, n (%)	21 (84.0)	9 (90.0)	12 (80.0)	NA	0.504
2-cell stage parthenotes, n (%)	18 (72.0)	5 (50.0)	13 (86.66)	39 (100)	0.046
3-cell stage parthenotes, n (%)	16 (64.0)	4 (40.0)	12 (80.0)	38 (97.4)	0.041
4-cell stage parthenotes, n (%)	12 (48.0)	3 (30)	9 (60)	36 (92.3)	0.141
5-cell stage parthenotes, n (%)	9 (36)	2 (20)	7 (46.66)	34 (87.2)	0.216
8-cell stage parthenotes, n (%)	3 (12)	0	3 (20)	31 (79.5)	0.132
Blastocyst parthenotes, n (%)	2 (8)	0	2 (13.33)	28 (71.8)	0.223

*Chi's squared test (A23187 vs ionomycin)

NA, not applicable

Figura 12. Comparação de duas marcas de ionóforos comercializadas e o desenvolvimento embrionário (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1664).

Como esperado o potencial de desenvolvimento dos ovócitos partenogénicos foi significativamente menor no grupo de controlo onde a taxa de blastocisto foi correspondente a 71,8% (Quintana-Vehí *et al.*, 2023).

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a A23187 desencadeia um poder de ativação ovocitária menor comparativamente a ionomycin, indicando que esta última oferece uma capacidade de iniciar as oscilações de Ca^{2+} maior (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, 1666).

É importante ter em consideração que houve variação na duração da exposição aos ionóforos. Isso sublinha a necessidade de cautela ao comparar os tempos de desenvolvimento embrionário entre os grupos tratados com ionóforos e os grupos de controlo (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1666).

Este estudo sugere que a escolha dos ionóforos a serem utilizados podem apresentar um grande impacto em relação ao desenvolvimento embrionário, no entanto é necessário haver validação através de outros estudos (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1666).

Foi recomendado ainda que houvessem alterações no protocolo e condições de cultura relativamente ao A23187 para que o desempenho do desenvolvimento embrionário gerasse desfechos melhores, indicando que existe uma importância no que diz respeito a padronização dos protocolos a fim de otimizar os resultados obtidos através de AOA (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1666).

Capítulo IV

Complicações após a Utilização dos Ionóforos de Cálcio

Os tratamentos de AOA são considerados invasivos pois envolvem manipulação adicional dos ovócitos no processo de microinjeção e respectivas incubações com agentes químicos que podem interferir com o metabolismo celular e desenvolvimento embrionário. Como registado em estudos anteriores, a manipulação dos gâmetas envolvidos tanto em procedimentos de AOA quanto em ICSI convencional foram considerados fatores de risco relativamente a defeitos congénitos. (Long *et al.*, 2020, p 2)

Por esta razão, existe uma preocupação em relação às crianças concebidas através de técnicas adicionais como a AOA e a possibilidade de resultados neonatais desfavoráveis. Portanto, é crucial que haja um acompanhamento contínuo destas crianças, principalmente nos primeiros anos de vida. (Long *et al.*, 2020) (Mateizel *et al.*, 2018)

Vários estudos comprovaram que essa técnica não apresenta riscos gestacionais, não interferindo em fatores como peso ao nascimento, taxas de gestações pré-termo ou no gênero dos recém-nascidos, quando comparada à ICSI convencional e à ICSI-AOA (Long *et al.*, 2020, p 2).

Em 2016, foi realizado um estudo com objetivo de avaliar a segurança da ativação ovocitária com ionóforos de cálcio relativamente a defeitos congénitos (Miller *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que foram encontradas diferenças relativamente a idade materna entre os ciclos de ICSI e ICSI-AOA em gestações únicas (32,9 vs 29,7). Embora haja um risco maior de defeitos congénitos em mulheres com idade materna avançada, não foram encontradas taxas mais elevadas desses defeitos no grupo de ICSI. Adicionalmente, os resultados das pacientes mais jovens no grupo ICSI-AOA reforçam a hipótese de que o fator masculino, além da idade materna, pode ser uma das causas da infertilidade (Miller *et al.*, 2016, p 595).

Ademais, a sub-análise das malformações mais comuns como os defeitos congénitos do coração, esqueléticos, e geniturinários, não revelaram significância estatística (Miller *et al.*, 2016, p 595).

No grupo da ICSI convencional a taxa de malformações estruturais foi correspondente a 4,5% e para anomalias cromossômicas a taxa foi de 1,6%; já para o grupo de ICSI-AOA a taxas foram de 8% e 1,6%, respetivamente. Não foram consideradas diferenças significativas em relação a estes resultados (Miller *et al.*, 2016, p 593).

Foram encontradas anomalias fetais no grupo de ICSI-AOA. No grupo de gestações únicas, um caso, p595 de defeito a nível do coração, uma malformação esquelética, uma malformação a nível do sistema geniturinário, um caso onde o RN apresentava malformação esquelética e malformação geniturinária, e também um caso de síndrome de Beckwith-Weidemann (Miller *et al.*, 2016, 593).

No grupo de gestações duplas foi registado um caso severo de defeitos a nível estrutural (rim displásico multicístico, refluxo, defeitos do septo ventricular) (Miller *et al.*, 2016), p 593.

No grupo de ICSI, dois casos de surdez que foram excluídos pois ambos originados do mesmo casal, portanto, uma suspeita de condição genética hereditária (Miller *et al.*, 2016, p 593).

Não obstante, a conclusão deste estudo sobre a segurança do uso de ionóforos de cálcio deve ser considerada com cautela. Recomenda-se a realização de estudos em larga escala para proporcionar uma maior certeza sobre a segurança dessa técnica (Miller *et al.*, 2016, p 595).

Já em 2018, foram analisados 5 estudos comparando resultados de ICSI convencional e ICSI-AOA, total de 5506 de ICSI convencional e 316 de ICSI-AOA. Durante esta comparação constatou-se que as taxas de doenças congénitas não se encontraram aumentadas (RR = 1,27, 95% CI 0,70–2,28). Adicionalmente, um dos subgrupos consistiu na análise de defeitos congénitos classificada de duas maneiras: anomalias cromossómicas e nenhuma anomalia cromossómica, em quatro estudos e não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. (Long *et al.*, 2020, p 5)

Com base nestes estudos são fornecidas informações que evidenciam que com correto aconselhamento e instruções a aplicação de técnicas de AOA podem ser aplicadas de forma segura. (Long *et al.*, 2020)

Capítulo V

Impacto na Idade Materna e Fatores Masculinos nos Resultados dos Tratamentos

5.1 Idade materna

A idade é um fator diretamente associado à diminuição da reserva ovárica, refletindo tanto na qualidade quanto na quantidade dos ovócitos. Observa-se um declínio significativo na fertilidade feminina a partir dos 35 anos. Portanto, mulheres com idade materna avançada tendem a produzir menos ovócitos durante os ciclos de fertilização *in vitro*, resultando em menor quantidade de embriões e, conseqüentemente, em taxas de implantação acumuladas mais baixas (George & Kamath, 2010, p 122) (Borges *et al.*, 2009).

Como foi possível analisar ao longo deste trabalho, um dos principais critérios para a inclusão de tratamentos com ionóforos de cálcio esteve relacionado com a idade materna. Deste modo, levanta-se a questão sobre o sucesso desta técnica em mulheres com idade materna avançada. Em vários dos estudos analisados, foi consistentemente considerado um subgrupo de mulheres nessa faixa etária, o que conduz à reflexão sobre a real vantagem da utilização dos ionóforos nestes casos. Será que, de facto, essa técnica traz benefícios significativos para essa população específica?

Conforme analisado, relativamente às taxas de fertilização, a qualidade ovocitária provou ser um fator tão importante quanto o fator espermático, notando uma diferença no tratamento quando foram utilizados ovócitos de mulheres com idade materna menores.

Já em relação ao desenvolvimento embrionário, observou-se que o grupo que recebe tratamento com ionóforos de cálcio, pode apresentar maiores benefícios em mulheres com idade avançadas e que tenham problemas relacionados a armazenamento de cálcio intracelular e oscilações anormais de cálcio (Tsai *et al.*, 2022).

Tal foi observado durante a análise do estudo de Tsai *et al.*, (2022), onde os resultados obtidos foram observados taxas de clivagem e TQE maiores, apenas nos subgrupos ≥ 40 anos AOA comparativamente ao subgrupo < 40 anos AOA.

Estes dados sugerem que esta técnica fornece uma vantagem maior a mulheres com idade materna avançada e baixa reserva ovárica melhorando não só as taxas de

fertilização como também a qualidade embrionária após estas mesmas pacientes terem sido submetidas a ciclos de ICSI convencional mal conseguidos. (Tsai *et al.*, 2022, p 9).

Uma vez que os resultados após a utilização desta técnica mostraram-se positivos pode-se considerar que o insucesso em ciclos anteriores poderá ter estado relacionado com fatores como o bloqueio do desenvolvimento embrionário, diretamente ligados a problemas a nível de cálcio intracelular (Ebner, Oppelt, *et al.*, 201, p 101).

5.2 Fator masculino

Como mencionado anteriormente, estima-se que cerca de 15% da população mundial seja afetada por problemas de infertilidade (Chen *et al.*, 2022b). A infertilidade masculina contribui para aproximadamente 50% dos casos, sendo causada por uma variedade de fatores, incluindo mutações genéticas, estilo de vida, condições médicas e até o uso de determinados medicamentos (Fainberg & Kashanian, 2019).

Apesar dos avanços na compreensão da infertilidade masculina, as anomalias espermáticas idiopáticas ainda representam cerca de 30% dos casos de infertilidade masculina (Fainberg & Kashanian, 2019).

Conforme observado em alguns dos casos analisados anteriormente, as anomalias idiopáticas relacionadas à infertilidade masculina foram consideradas critérios de inclusão para a utilização de ionóforos de cálcio.

De modo geral foi possível observar uma melhora em ciclos onde a técnica de AOA com ionóforos de cálcio foi utilizada, indicando que pode ser benéfica para casais que enfrentam problemas de infertilidade masculina. No entanto, é importante considerar fatores como a origem e o tipo de anomalia espermática.

Constatou-se que em fatores como azoospermia e criptozoospermia a utilização da técnica era benéfica, alcançando taxas de fertilização de 64,4% e 48,4% respetivamente com significância estatística (Ebner *et al.*, 2012)

Já para amostras espermáticas de origens diferentes, observou-se que o estado de maturação espermática representa um papel crucial que determina o sucesso da técnica, por esse motivo a taxa de sucesso foi maior em pacientes com origem ejacutória e epididimal comparativamente aos pacientes com origem espermática testicular (Borges *et al.*, 2009).

Vários estudos demonstraram que fatores espermáticos afetam a ativação do ovócito, especificamente a ausência de fosfolipase C zeta (PLC ζ) ou mutações no PLC ζ no espermatozoide. A ausência da proteína PLC ζ na cabeça do espermatozoide está diretamente associada à falha na produção de oscilações de Ca⁺² (Zafar *et al.*, 2021).

Uma hipótese levantada é que a concentração ou PLC ζ varia entre espermatozoides maduros e imaturos. Assim, pode-se postular que espermatozoides testiculares não conseguem manter as oscilações de cálcio no ooplasma após a estimulação artificial da ativação do ovócito (Borges *et al.*, 2009).

Em suma, a idade materna avançada e os fatores masculinos de infertilidade, desempenham um papel crucial nos resultados da fertilização e do desenvolvimento embrionário. A utilização de ionóforos de cálcio pode mitigar alguns dos efeitos adversos associados a esses fatores, embora a eficácia varie dependendo das características específicas de cada caso.

Capítulo VI

Limitações e Desafios Futuros

6.1 Tamanho amostral

Após analisar cada um destes estudos, é crucial abordar as limitações que apresentam e discutir como poderiam ser aprimoradas.

Um dos problemas identificados nos estudos analisados foi relativamente ao tamanho das amostras, frequentemente considerado pequeno. Este fator, resultou em conclusões imprecisas e pouco confiáveis, evidenciando a necessidade de estudos com amostras maiores para alcançar resultados mais robustos.

As investigações na área da saúde são orientadas por problemas ou questões de pesquisa, que devem estar claramente definidos no projeto do estudo. O cálculo de seleção amostral é um passo essencial a ser incluído no projeto com a finalidade de reduzir probabilidades de erros, respeitar princípios éticos, definir a logística dos estudos e melhorar as taxas de sucesso (Martínez-Mesa *et al.*, 2014, p 1).

Este cálculo de seleção amostral pode ser realizado manualmente, utilizando softwares estatísticos ou calculadoras online que fornecem serviços gratuitos (Andrade, 2020, p 103).

Amostras que apresentam tamanhos menores possuem um poder estatístico insuficiente para responder à questão principal da pesquisa, e um resultado estatisticamente não significativo poderia ser meramente devido ao tamanho inadequado da amostra (Tipo 2 ou erro falso negativo). Assim, uma amostra pequena poderia resultar em transtornos para os pacientes do estudo, sem nenhum benefício para futuros pacientes ou para a ciência (Andrade, 2020, p 102).

Em contraste, uma com tamanho superior ao necessário será melhor no que diz respeito a representatividade de uma população e consequentemente irá fornecer resultados mais assertivos. Contudo, após um determinado ponto o aumento da precisão será inferior e, portanto, não compensará as despesas criadas no que diz respeito ao recrutamento de pacientes adicionais (Andrade, 2020, p 102).

Não obstante, é criada uma inconveniência para os pacientes que referente ao tempo dedicado às avaliações clínicas e ao desconforto psicológico e físico vivenciado em avaliações referentes a entrevistas, coletas entre outros procedimentos (Andrade, 2020, p 102)

Um exemplo de um estudo bem-conduzido, com uma seleção amostral adequada e resultados positivos, é um ensaio clínico randomizado que utilizou um tamanho amostral de 240 pacientes por grupo para alcançar uma probabilidade de 80% com um nível de significância de 5%. Considerando uma taxa de desistência estimada em 10%, o tamanho total da amostra foi de 530 participantes, com 265 em cada grupo (Fancsovits *et al.*, 2022, p 231)

Uma das sugestões para superar este problema seria a realização de estudos multicêntricos, como alguns dos estudos analisados anteriormente.

Estudos realizados em um único centro são conduzidos em um único local enquanto os estudos multicêntricos englobam mais de um local para coleta de dados (Das, 2022, p. 571).

Algumas das vantagens que estes tipos de estudo fornecem são maior número de indivíduos com diversidade populacional maior, probabilidade estatística maior, comparação entre diferentes locais/grupos e a detecção de variações e melhora na generalidade dos resultados alcançando maior relevância (Das, 2022, p. 573).

6.2 Variabilidade nos protocolos

Ao longo deste trabalho, outra questão que surge é a forma como os protocolos são definidos. Em um dos estudos mencionados anteriormente, é sugerido que deveriam ser formados grupos de estudo de maneiras distintas a fim de se obter resultados mais assertivos (Fancsovits *et al.*, 2022).

Um dos estudos sugere que idealmente o melhor grupo de estudo seria aquele composto por embriões gerados em ciclos diferentes que beneficiaram ou não do tratamento com ionóforos de cálcio o que revelaria efeitos adversos ligados à técnica invasiva de ativação ovocitária (Mateizel *et al.*, 2018 p. 5).

Uma alternativa também seria, dentro de um mesmo ciclo a partir de ovócitos *sibling* gerar embriões tratados ou não com ionóforos de cálcio e posteriormente transferi-los em momentos distintos resultando em gestações de ciclos diferentes (Mateizel *et al.*, 2018, p 5).

Um estudo realizado entre 2017 e 2019 utilizou esta abordagem verificando que os ovócitos tratados com ionóforos demonstraram resultados positivos. Verificou-se que estes ovócitos apresentaram um aparecimento dos pronúcleos significativamente mais

cedo (t2PNa) e uma sincronização melhorada do terceiro ciclo celular (s3) ($P < 0,05$). Relativamente a taxa de clivagem irregular, esta não foi afetada ($P > 0,05$) e foi possível também observar uma melhora significativa nas taxas de fertilização e utilização de blastocistos, provando deste modo que se trata de uma abordagem eficaz (Shebl *et al.*, 2021).

Embora os estudos atuais demonstrem o potencial dos ionóforos de cálcio na melhoria das taxas de fertilização, as limitações identificadas, como o tamanho reduzido das amostras e a variabilidade dos protocolos, ressaltam a necessidade de pesquisas adicionais. Investigações futuras que abordem esses desafios poderão não apenas confirmar os benefícios observados, mas também, assegurar uma aplicação mais segura e eficaz da técnica.

6.3 Riscos e efeitos adversos

Uma das questões de importante avaliação quando realizados estudos desta natureza é a dificuldade que gera a posterior comparação de resultados obtidos entre centros é a variação relativamente ao protocolo AOA (Mateizel *et al.*, 2018).

A maioria dos artigos utilizou como ionóforo a calcimicyn A23187, utilizando apenas um passo muito direto de incubação, no entanto, a quantidades e tempos de incubação diferentes (Mateizel *et al.*, 2018)

Foi analisado um estudo que utilizou para além da calcimicyn, a ionomycin. O tratamento com este ionóforo é relativamente mais invasivo para o ovócito uma vez que durante a ICSI, juntamente com o espermatozoide em pelo menos um dos estudos, foi injetado CaCl_2 e posteriormente foi submetido a incubações sucessivas (Mateizel *et al.*, 2018).

Neste mesmo estudo observou-se maior taxa de malformação congénita em crianças geradas após o uso da ionomycin, correspondente a 6,3% (3/47) (Mateizel *et al.*, 2018).

Noutro estudo realizado em 2014, foi apenas utilizado a ionomycin e não foram detetadas malformações congénitas, todavia, após avaliação destas mesmas crianças durante as idades compreendidas entre 3-10 anos foram relatadas malformações correspondentes a 14,3% (Vanden Meerschaut *et al.*, 2014, p 59).

Estas duas alternativas levantam dúvidas quanto a eficácia da ionomycin uma vez que por possuir uma abordagem invasiva poderá haver uma suscetibilidade maior para problemas futuros (Mateizel *et al.*, 2018).

No entanto, noutro estudo é constatado que se obtém melhores resultados relativamente a taxa de ativação ovocitária e desenvolvimento embrionário quando utilizada a ionomyin (Quintana-Vehí *et al.*, 2023).

Neste mesmo estudo também é evidenciado durante a comparação das duas marcas de ionóforos a importância da standardização dos protocolos em relação aos *timings* de incubação e quantidades de ionóforos utilizadas, a fim de se obter resultados mais concludentes (Quintana-Vehí *et al.*, 2023, p 1666).

Cabe ressaltar também que ainda existem vários desafios no que tange o acompanhamento da saúde das crianças nascidas de tratamentos com ionóforos de cálcio. Uma das principais limitações é que, devido à especificidade desta técnica, o número de pacientes que se beneficiam dela é pequeno, resultando em um número limitado de crianças nascidas por meio desse procedimento (Mateizel *et al.*, 2018).

Tal pode ser observado nos vários estudos analisados. Em alguns casos, as informações sobre o acompanhamento dessas crianças são completamente perdidas, o que dificulta uma compreensão mais aprofundada dos desfechos da aplicação dessa técnica (Mateizel *et al.*, 2018).

Conclusão

O uso de ionóforos de cálcio é recomendado em situações específicas, particularmente, em casos de pacientes com histórico de taxas de fertilização baixas ou falhas de fecundação e desenvolvimento embrionário insatisfatório vários tratamentos.

Ao longo deste trabalho, foi feita uma revisão da literatura e observou-se a eficácia desse composto em casais com problemas como os mencionados anteriormente, notando-se diferenças estatisticamente significativas nas taxas de fertilização, e em alguns estudos em relação ao desenvolvimento embrionário. No entanto, um estudo relatou não ter observado diferenças estatísticas relevantes no desenvolvimento embrionário. Em relação as taxas de sucesso gestacional, apesar de se ter notado diferenças significativas relativamente as comparações entre ciclos, estes estudos devem ter os seus resultados analisados com cautela uma vez que há perda de traçabilidade em relação a informação das crianças nascidas.

Não foram observadas grandes alterações em relação às malformações congénitas. No entanto, é importante destacar que, em muitos estudos, as informações sobre os nados-vivos e o acompanhamento destas crianças nos primeiros anos de vida foram perdidas ao longo do tempo.

Um fator que se revelou crucial para o sucesso da técnica foi a idade materna, mostrando-se particularmente influente nos resultados, sendo as mulheres com idade materna avançada as que mais se beneficiaram da aplicação dos ionóforos. Em relação aos fatores de infertilidade masculina, a técnica revelou ser eficaz em casos de azoospermia e criptozoospermia. Além disso, a origem espermática desempenhou um papel importante que contribuiu para o sucesso desta técnica provando ser mais eficaz quando a origem era seminal ejaculada e epididimal comparativamente à origem testicular.

Portanto, o sucesso dessa técnica depende de uma análise cuidadosa dos fatores de infertilidade, tanto masculinos quanto femininos, sendo ambos determinantes para o desfecho positivo.

Apesar dos resultados promissores, algumas limitações devem ser consideradas. Os estudos analisados frequentemente basearam-se em amostras pequenas e apresentavam variações nos protocolos utilizados entre os diferentes centros. Assim, a padronização dos protocolos e a realização de estudos a longo prazo são essenciais para garantir a segurança e a eficácia contínua dos ionóforos de cálcio.

Por fim, embora ambas as marcas de ionóforos tenham demonstrado resultados positivos, a escolha entre elas deve ser feita com critério, tendo em consideração características individuais de cada paciente, como a idade materna e o tipo de infertilidade.

Com o avanço das pesquisas e a otimização dos protocolos, espera-se que a utilização de ionóforos de cálcio continue a contribuir para a melhoria das taxas de sucesso em fertilização assistida, oferecendo esperança para muitos casais que enfrentam problemas de infertilidade.

Referências Bibliográficas

- Andrade, C. (2020). Sample size and its importance in research. *Indian Journal of Psychological Medicine*, 42(1), 102–103.
https://doi.org/10.4103/IJPSYM.IJPSYM_504_19
- Anifandis, G., Michopoulos, A., Daponte, A., Chatzimeletiou, K., Simopoulou, M., Messini, C. I., Polyzos, N. P., Vassiou, K., Dafopoulos, K., & Goulis, D. G. (2019). Artificial oocyte activation: physiological, pathophysiological and ethical aspects. In *Systems Biology in Reproductive Medicine* (Vol. 65, Issue 1, pp. 3–11). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1516000>
- Belva, F., De Schrijver, F., Tournaye, H., Liebaers, I., Devroey, P., Haentjens, P., & Bonduelle, M. (2011). Neonatal outcome of 724 children born after ICSI using non-ejaculated sperm. *Human Reproduction*, 26(7), 1752–1758.
<https://doi.org/10.1093/humrep/der121>
- Blanco. (2017). *Chapter 25 - Biochemical Basis of Endocrinology (I) Receptors and Signal Transduction*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4/00025-2>
- Borges, E., Ferreira Braga, D. P. de A., de Sousa Bonetti, T. C., Iaconelli, A., & Franco, J. G. (2009). Artificial oocyte activation using calcium ionophore in ICSI cycles with spermatozoa from different sources. *Reproductive BioMedicine Online*, 18(1), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60423-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60423-3)
- Calcium ionophore A23187. (s.d.). PubChem.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-ionophore-A23187>
- Chen, X., Zhao, H., Lv, J., Dong, Y., Zhao, M., Sui, X., Cui, R., Liu, B., & Wu, K. (2022a). Calcium ionophore improves embryonic development and pregnancy outcomes in patients with previous developmental problems in ICSI cycles. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s12884-022-05228-3>
- Chen, X., Zhao, H., Lv, J., Dong, Y., Zhao, M., Sui, X., Cui, R., Liu, B., & Wu, K. (2022b). *Calcium ionophore improves embryonic development and pregnancy outcomes in patients with previous developmental problems in ICSI cycles*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1933666/v1>
- Das, M. K. (2022). Multicenter Studies: Relevance, Design and Implementation. *Indian Pediatrics*, 59(7), 571–579. <https://doi.org/10.1007/s13312-022-2561-y>
- Ebner, T., Köster, M., Shebl, O., Moser, M., Van Der Ven, H., Tews, G., & Montag, M. (2012). Application of a ready-to-use calcium ionophore increases rates of fertilization and pregnancy in severe male factor infertility. *Fertility and Sterility*, 98(6), 1432–1437. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1134>
- Ebner, T., Montag, M., Montag, M., Van Der Ven, K., Van Der Ven, H., Ebner, T., Shebl, O., Oppelt, P., Hirchenhain, J., Krüssel, J., Maxrath, B., Gnoth, C., Friol, K., Tigges, J., Wunsch, E., Luckhaus, J., Beerlotte, A., Weiss, D., Grunwald, K.,

- ... Etien, C. (2015). Live birth after artificial oocyte activation using a ready-to-use ionophore: A prospective multicentre study. *Reproductive BioMedicine Online*, 30(4), 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.11.012>
- Ebner, T., Oppelt, P., Wober, M., Staples, P., Mayer, R. B., Sonnleitner, U., Bulfon-Vogl, S., Gruber, I., Haid, A. E., & Shebl, O. (2015). Treatment with Ca²⁺ ionophore improves embryo development and outcome in cases with previous developmental problems: A prospective multicenter study. *Human Reproduction*, 30(1), 97–102. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu285>
- Fainberg, J., & Kashanian, J. A. (2019). Recent advances in understanding and managing male infertility. *F1000Research*, 8. <https://doi.org/10.12688/f1000research.17076.1>
- Fancsovits, P., Pribenszky, C., Lehner, A., Murber, A., Kaszas, Z., Nemes, A., & Urbansek, J. (2022). Prospective-randomized study comparing clinical outcomes of IVF treatments where embryos were cultured individually or in a microwell group culture dish. *Biologia Futura*, 73(2), 229–236. <https://doi.org/10.1007/s42977-022-00113-8>
- Freedman, J. C. (2011). Ionophores in Planar Lipid Bilayers. In *Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics* (pp. 61–66). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387738-3.00004-4>
- George, K., & Kamath, M. (2010). Fertility and age. In *Journal of Human Reproductive Sciences* (Vol. 3, Issue 3, pp. 121–123). <https://doi.org/10.4103/0974-1208.74152>
- Heindryckx, B., De Gheselle, S., Gerris, J., Dhont, M., & De Sutter, P. (2008). Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(5), 662–668. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60313-6](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60313-6)
- Long, R., Wang, M., Yang, Q. Y., Hu, S. Q., Zhu, L. X., & Jin, L. (2020a). Risk of birth defects in children conceived by artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00680-2>
- Long, R., Wang, M., Yang, Q. Y., Hu, S. Q., Zhu, L. X., & Jin, L. (2020b). Risk of birth defects in children conceived by artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00680-2>
- Martínez, M., Durban, & M., Santaló, & J., Rodríguez, & A., & Vassena, & R. (n.d.). *Assisted oocyte activation effects on the morphokinetic pattern of derived embryos*. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-02025-9/Published>
- Martínez-Mesa, J., González-Chica, D. A., Bastos, J. L., Bonamigo, R. R., & Duquia, R. P. (2014). Sample size: How many participants do i need in my research? *Anais*

- Brasileiros de Dermatologia*, 89(4), 609–615. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20143705>
- Mateizel, I., Verheyen, G., Van de Velde, H., Tournaye, H., & Belva, F. (2018). Obstetric and neonatal outcome following ICSI with assisted oocyte activation by calcium ionophore treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(6), 1005–1010. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1124-6>
- Miller, N., Biron-Shental, T., Sukenik-Halevy, R., Klement, A. H., Sharony, R., & Berkovitz, A. (2016). Oocyte activation by calcium ionophore and congenital birth defects: a retrospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 106(3), 590-596.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.04.025>
- Murugesu, S., Saso, S., Jones, B. P., Bracewell-Milnes, T., Athanasiou, T., Mania, A., Serhal, P., & Ben-Nagi, J. (2017). Does the use of calcium ionophore during artificial oocyte activation demonstrate an effect on pregnancy rate? A meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 108(3), 468-482.e3. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.029>
- Nasr-Esfahani, M. H., Deemeh, M. R., & Tavalae, M. (2010). Artificial oocyte activation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 94(2), 520–526. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.061>
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet (London, England)*, 340(8810), 17–18. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-f](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-f)
- Quintana-Vehí, A., Martínez, M., Zamora, M. J., Rodríguez, A., Vassena, R., Miguel-Escalada, I., & Popovic, M. (2023). Significant differences in efficiency between two commonly used ionophore solutions for assisted oocyte activation (AOA): a prospective comparison of ionomycin and A23187. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 40(7), 1661–1668. <https://doi.org/10.1007/s10815-023-02833-9>
- Saleh, A., Kashir, J., Thanassoulas, A., Safieh-Garabedian, B., Lai, F. A., & Nomikos, M. (2020). Essential Role of Sperm-Specific PLC-Zeta in Egg Activation and Male Factor Infertility: An Update. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00028>
- Scientific Image and Illustration Software | BioRender*. (s.d.). Scientific Image and Illustration Software | BioRender. <https://www.biorender.com/>
- Shebl, O., Trautner, P. S., Enengl, S., Reiter, E., Allerstorfer, C., Rechberger, T., Oppelt, P., & Ebner, T. (2021). Ionophore application for artificial oocyte activation and its potential effect on morphokinetics: a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 38(12), 3125–3133. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02338-3>
- Tejera, A., Ferri, L. A., Izquierdo, P. G., Torregrosa, D. B., Remohí, J. A. D., & Escrivá, M. M. (2021). Treatment with Calcium Ionophore Improves The Results in Patients with Previous Unsuccessful Attempts at The Fertilization: A Cohort

- Study. *International Journal of Fertility and Sterility*, 15(4), 286–293.
<https://doi.org/10.22074/ijfs.2021.136168.1013>
- Tsai, T. E., Lin, P. H., Lian, P. F., Li, C. J., Vitale, S. G., Mikuš, M., Su, W. P., Tsai, H. W., Tsui, K. H., & Lin, L. Te. (2022). Artificial oocyte activation may improve embryo quality in older patients with diminished ovarian reserve undergoing IVF-ICSI cycles. *Journal of Ovarian Research*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01036-7>
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., Heindryckx, B., & De Sutter, P. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 28, Issue 5, pp. 560–571). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.008>
- Xu, Z., Yao, G., Niu, W., Fan, H., Ma, X., Shi, S., Jin, H., Song, W., & Sun, Y. (2021). Calcium Ionophore (A23187) Rescues the Activation of Unfertilized Oocytes After Intracytoplasmic Sperm Injection and Chromosome Analysis of Blastocyst After Activation. *Frontiers in Endocrinology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.692082>
- Zafar, M. I., Lu, S., & Li, H. (2021). Sperm-oocyte interplay: an overview of spermatozoon's role in oocyte activation and current perspectives in diagnosis and fertility treatment. In *Cell and Bioscience* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s13578-020-00520-1>
- Zheng, D., Zeng, L., Yang, R., Lian, Y., Zhu, Y. M., Liang, X., Tang, L., Wang, H., Cao, Y., Hao, G., Liu, J., Zhao, J., Wang, R., Mol, B. W., Li, R., Huang, H. F., & Qiao, J. (2019). Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional in vitro fertilisation (IVF) in couples with non-severe male infertility (NSMI-ICSI): Protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open*, 9(9).
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2019-030366>