



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

Centro Universitário de Lisboa

Escola de Psicologia e Ciências da Vida

Mestrado em Embriologia e Reprodução Humana

**TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS OÓCITOS DE
DADORA À DESVITRIFICAÇÃO E OS SEUS DESFECHOS
LABORATORIAIS E CLÍNICOS**

**Dissertação defendida em prova pública para obtenção do grau de Mestre em Embriologia e
Reprodução Humana, orientada por Miguel Gallardo Molina PhD**

INÊS DE MOURA GONÇALVES

2025

www.ulusofona.pt

Centro Universitário de Lisboa

Escola de Psicologia e Ciências da Vida

Mestrado em Embriologia e Reprodução Humana

**TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS OÓCITOS DE
DADORA À DESVITRIFICAÇÃO E OS SEUS DESFECHOS
LABORATORIAIS E CLÍNICOS**

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 1028/2024, com a seguinte composição:

Presidente: Professora Doutora Patrícia Carla Coelho Rodrigues;

Arguente: Professora Doutora Miriam Iglesias;

Orientador: Professor Doutor Miguel Gallardo Molina.

INÊS DE MOURA GONÇALVES

2025

“O conhecimento é uma arca com um tesouro; a prática, a sua chave.”

Thomas Fuller

Agradecimentos

Gostaria primeiramente de agradecer ao Miguel, o meu orientador de tese e de estágio, por ter sido um ótimo orientador, por me ter apoiado sempre ao longo destes meses e por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades, mais até do que eu.

Queria agradecer a toda a equipa da clínica Ginemed Lisboa, à Miriam, ao Jorge, à Ana, à Joana, à Carina e à Micaela, por me terem acompanhado ao longo do estágio e por serem todos muito acolhedores, fazendo com que me sentisse em casa e não quisesse de lá sair nunca mais, ou que o estágio durasse para sempre. Gostaria ainda de estender este agradecimento a todo o pessoal da clínica, desde os auxiliares aos enfermeiros e médicos, pois todos tiveram um papel importante neste meu percurso.

Agradeço à minha família que esteve sempre do meu lado e que me apoiou em todas as decisões que tive que tomar ao longo deste percurso.

Aos meus amigos e colegas por me terem dado motivação, por me acompanharem neste percurso e por me fazerem companhia enquanto escrevia esta dissertação.

Ao Nuno, que esteve sempre ao meu lado para me apoiar, que me deu motivação, que me encorajou e que me ajudou em tudo aquilo que precisei.

Um grande obrigada a todos.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da sobrevivência dos oócitos de dadora à desvitrificação nos seus desfechos laboratoriais e clínicos. Para isso realizou-se um estudo retrospectivo onde se analisaram 12690 ciclos entre 2018-2022. Os ciclos foram agrupados pelas taxas de sobrevivência. As diferenças nas proporções foram analisadas utilizando o qui-quadrado e o *odds ratio* ajustado (aOR) foi calculado utilizando a regressão logística multivariável. A taxa de blastocistos utilizáveis foi menor nos grupos de sobrevivência mais baixa, assim como as taxas de fertilização. O aOR da taxa de recém-nascidos vivos após a primeira transferência de um único blastocisto foi igual ao grupo de sobrevivência de referência em todos os grupos de sobrevivência inferiores. A taxa cumulativa de recém-nascido vivo (CLBR) foi menor nos grupos de sobrevivência mais baixa. Esta tendência para uma menor taxa CLBR manteve-se numa subanálise com igual MII disponível para ICSI. Taxas mais baixas de sobrevivência de oócitos de dadoras têm um impacto negativo moderado nas hipóteses cumulativas de sucesso dos ciclos das recetoras, mesmo após o ajuste para os oócitos MII disponíveis para ICSI. No entanto, os oócitos sobreviventes de uma coorte parecem manter um elevado nível de competência e um potencial de implantação semelhante.

Palavras-chave: Oócitos; Doação; Vitrificação; Criopreservação; Sobrevivência

Abstract

The aim of this study was to assess the impact of donor oocyte survival to devitrification on their laboratory and clinical outcomes. To this end, a retrospective study was carried out in which 12690 cycles were analyzed between 2018-2022. The cycles were grouped by survival rates. Differences in proportions were analyzed using chi-square and the adjusted odds ratio (aOR) was calculated using multivariable logistic regression. The rate of usable blastocysts was smaller in the lower survival groups, as were the fertilization rates. The aOR of the single embryo transfer for live birth rate was equal to the reference survival group in all lower survival groups. The cumulative live birth rate (CLBR) was smaller in the lower survival groups. This trend towards a lower CLBR was maintained in a sub-analysis with equal MII available for ICSI. Lower donor oocyte survival rates have a moderate negative impact on the recipient's cumulative chances of cycle success, even after adjusting for MII oocytes available for ICSI. However, surviving oocytes from a cohort appear to maintain a high level of competence and a similar implantation potential.

Keywords: Oocyte; Donation; Vitrification; Cryopreservation; Survival

Abreviaturas e Siglas

2PN – Dois **P**ronúcleos

AMH – Hormona Anti-Muleriana (**A**nti-**M**ullerian **H**ormone)

ANOVA – Análise de Variâncias (**A**nalysis **O**f **V**ariance)

aOR – Razão de Probabilidades (**A**adjusted **O**dds **R**atio)

ART – Tecnologias de Reprodução Assistida (**A**ssisted **R**eproductive **T**echnologies)

ASEBIR – **A**ssociación para el **E**studio de la **B**iología de la **R**eproducción

BS – Solução Básica (**B**asic **S**olution)

CLBR – Taxa Cumulativa de Recém-Nascido Vivo (**C**umulative **L**ive **B**irth **R**ate)

CNPMA – **C**onselho **N**acional de **P**rocriação **M**edicamente **A**ssistida

COC – **C**omplexo **O**ócito-**C**úmulos

DS – Solução de Diluição (**D**iluent **S**olution)

EE – **E**stado **E**specífico

ES – Solução de Equilíbrio (**E**quilibration **S**olution)

ESHRE – Sociedade Europeia de Reprodução e Embriologia (**E**uropean **S**ociety of **H**uman **R**eproduction and **E**mbryology)

ET - Transferência Embrionária (**E**mbryo **T**ransfer)

FIV - **F**ertilização *in vitro*

FIV-C - **F**ertilização *in vitro* Convencional

FSH – Hormona Foliculo-Estimulante (**F**ollicle-**S**timulating **H**ormone)

GnRH – Hormona Libertadora de Gonadotropinas (**G**onadotropin **R**eleasing **H**ormone)

GQ – Boa Qualidade (**G**ood **Q**uality)

hMG – Hormona Menopausica Humana (**H**uman **M**enopausal **G**onadotropin)

IC – Intervalo de Confiança

ICM – Massa Celular Interna (**I**nner **C**ell **M**ass)

ICSI - Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide (**I**ntracitoplasmic **S**perm **I**njection)

IMC – Índice de **M**assa **C**orporal

KPI – Indicadores-Chave de Performance (**K**ey **P**erformance **I**ndicators)

LBR – Taxa de Recém-Nascido Vivo (**L**ive **B**irth **R**ate)

LH – Hormona Luteinizante (**L**uteinizing **H**ormone)

MI – **M**etafase **I**

MII – **M**etafase **II**

MIV – **M**aturação *in vitro*

mtDNA – Ácido Desoxirribonucleico Mitocondrial (**M**itochondrial **D**eoxyribonucleic **A**cid)

PGT – Teste Genético Pré-Implantatório (**P**reimplantation **G**enetic **T**esting)

PMA - **P**rocriação **M**edicamente **A**ssistida

PVP – **P**olivinilpirrolidona

RNV – **R**ecém-**N**ascido **V**ivo

ROS – Espécies Reativas de Oxigénio (**R**eactive **O**xygen **S**pecies)

RPM – **R**otações **P**or **M**inuto

SD – Desvio Padrão (**S**tandard **D**eviaition)

SET-LBR – Taxa de Recém-Nascido Vivo na Primeira Transferência de um Único Embrião (**S**ingle **E**mbryo **T**ranfer – **L**ive **B**irth **R**ate)

SOP – Síndrome do **O**vário **P**oliquístico

SPMR – **S**ociedade **P**ortuguesa de **M**edicina da **R**eprodução

TEC – Transferência de **E**mbrião/ões **C**ongelado/s

TS – Solução de Desvitrificação (**T**hawing **S**olution)

UI – **U**nidades **I**nternacionais

VG – **V**esícula **G**erminal

VS – Solução de Vitrificação (**V**itrification **S**olution)

WHO – Organização Mundial de Saúde (**W**orld **H**ealth **O**rganization)

WS – Solução de Lavagem (**W**ashing **S**olution)

β -hCG – Gonadotropina Coriônica Humana (**H**uman **C**horionic **G**onadotropin)

Índice

Capa	1
Agradecimentos	4
Resumo.....	5
Abstract	6
Abreviaturas e Siglas	7
Índice.....	10
Índice de tabelas e figuras	11
Introdução	13
Enquadramento histórico da PMA	13
Tratamentos de PMA na atualidade	15
Doação de oócitos	16
Ciclo de recetora de oócitos criopreservados	18
Criopreservação de oócitos	31
Objetivo do presente trabalho.....	31
Materiais e Métodos.....	32
Recolha de dados e local de estágio	33
Caracterização da população em estudo.....	32
Análise estatística	33
Resultados	35
Discussão	42
Conclusão.....	45
Referências.....	46

Índice de tabelas e figuras

Figura 1. Louise Brown, a primeira bebé nascida por tratamentos de FIV. Disponível em: <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/ivf-baby-louise-brown-story-test-tube-world-first-40th-anniversary-a8455956.html>. Acesso em julho 2024

Figura 2. Carlos Saleiro, o primeiro bebé português nascido de tratamentos de FIV. Disponível em: <https://tribuna.expresso.pt>. Acesso em julho 2024

Figura 3. Ciclo de Recetora de oócitos criopreservados. Produzido com recurso ao BioRender.com

Figura 4. Punção ovárica. Disponível em: <https://www.omeulaboratoriodesonhos.com/2014/06/a-obtencao-dos-ovocitos.html>. Acesso em julho 2024

Figura 5. Pesquisa de COCs. Disponível em: <https://www.institutobernabeu.com/es/foro/liquido-folicular/>. Acesso em julho 2024

Figura 6. Caixa de Ferti. Produzido com recurso ao BioRender.com

Figura 7. Caixa de decumulação. Produzido com recurso ao BioRender.com

Figura 8. Complexo oócito-cumulus. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Figura-17-Oocitos-graus-1-e-2_fig5_230794393. Acesso em julho 2024

Figura 9. Oócitos decumulados. Disponível em: <https://www.saudebemestar.pt/pt/clinica/ginecologia/doacao-de-ovocitos/>. Acesso em julho 2024

Figura 10. 1 - Caixa de Azoto. Disponível em: <https://kitazato-ivf.com/vitrification/vitrification-accessories/>. 2 – Repro plate. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=rIW911LapZE>. 3 - Contentor de azoto. Disponível em: <https://unsplash.com/es/s/fotos/Dewar>. Acesso em julho 2024.

Figura 11. Protocolo de vitrificação da Kitazato. Disponível em: <https://kitazato-ivf.com/wp-content/uploads/2023/08/Vitrification-Protocol.pdf>. Acesso em julho 2024

Figura 12. Processamento de Sémen para ICSI. Produzido com recurso ao BioRender.com

Figura 13. Caixa de ICSI. Produzido com recurso ao BioRender.com

Figura 14. 1 – Agulha de *Holding*. 2 – Agulha de ICSI. Disponível em: <https://kitazato-ivf.com/micro-tools/>

; <https://www.kitazato.co.jp/en/products/microtools/icsi-injection-pipette> ; 3 - Microscópio de ICSI. Disponível em: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/pt_AMS/solutions/life-sciences/microinjection ; <https://www.medicaexpo.com/pt/prod/evident-olympus-scientific-solutions/product-84543-725660.html> ; 4 - ICSI. Disponível em: <https://ginemed.pt/reproducao-assistida/icsi/>. Acesso em julho 2024

Figura 15. Caixa de Geri Produzido com recurso ao BioRender.com

Figura 16. Oócito fecundado com 2 pronúcleos e 2 corpos polares. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/abs/preimplantation-genetic-diagnosis/preimplantation-embryo-development/FA5DACEF19DC53E37D57FC14FFB6D512>. Acesso em julho 2024

Figura 17. Embrião em dia 3 de desenvolvimento. Disponível em: <https://www.institutobernabeu.com/en/blog/day-3-embryo-culture/>. Acesso em julho 2024

Figura 18. Blastocisto. Disponível em: <https://www.myfertilitycare.com.au/embryo-selection.html>. Acesso em julho 2024

Figura 19. Transferência Embrionária. Produzido com recurso ao BioRender.com

Tabela 1. Características base.

Tabela 2. Desfechos laboratoriais e clínicos.

Tabela 3. Subanálise.

Introdução

Enquadramento histórico da PMA

O que é infertilidade

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO), a infertilidade é uma doença do sistema reprodutor feminino ou masculino que se define pela falha no alcance de uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais desprotegidas. É ainda considerada infertilidade a incapacidade de reprodução de uma pessoa, seja como indivíduo ou com o seu parceiro (Zegers-Hochschild, 2017). Considera-se infertilidade primária, quando nunca se obteve uma gravidez e secundária quando já se obteve pelo menos uma gravidez (World Health Organization: WHO, 2024). Estima-se que a infertilidade afeta milhões de pessoas em todo o mundo e que 1 em cada 6 pessoas em idade reprodutiva sofram desta doença (World Health Organization: WHO, 2024). Cerca de 10% dos casais apresentam um diagnóstico de infertilidade e metade desses casais recorrem a tratamentos de procriação medicamente assistida (Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida: CNPMA, s.d.).

Definição de ART, PMA, FIV e inseminação

As tecnologias de reprodução assistida (ART do inglês, Assisted Reproductive Technologies) comportam todas as intervenções com manipulação *in vitro* de oócitos e espermatozoides ou de embriões para fins de reprodução. As ART incluem a Fertilização *in vitro* (FIV), a transferência de embriões (ET, do inglês Embryo Transfer), a biópsia de embriões, os testes genéticos pré-implantatários (PGT, do inglês Preimplantation Genetic Testing), a eclosão assistida ou *Hatching*, a criopreservação e a doação de gâmetas e embriões (Zegers-Hochschild, 2017).

A procriação medicamente assistida (PMA) inclui diversas intervenções, procedimentos, cirurgias e tecnologias para tratar diferentes formas de comprometimento da fertilidade e infertilidade. A PMA inclui todos os procedimentos de ART e ainda a estimulação ovárica, o transplante uterino e a inseminação intrauterina com sémen do parceiro ou de dador (Zegers-Hochschild, 2017).

A FIV define-se como a sequência de procedimentos que envolve a fertilização extracorporal de gâmetas e inclui a fertilização *in vitro* convencional (FIV-C) e a FIV-ICSI (do inglês, intracytoplasmic sperm injection) (Zegers-Hochschild, 2017). A inseminação intrauterina é um procedimento em que se coloca sémen previamente processado em laboratório no útero de uma paciente de modo a gerar uma gravidez (Zegers-Hochschild, 2017).

História das ART

A inseminação artificial teve origem no fim do século XVIII (Sharma et al. 2018, Brinsden 2021). A primeira FIV bem-sucedida data do ano de 1978 (Steptoe e Edwards, 1978). Já a criopreservação de sémen ocorreu no fim do século XX (Sherman, 1964). A primeira bebé proveniente da transferência de um embrião criopreservado nasceu no ano de 1983 (Trounson e Mohr 1983). E foi apenas em 1992 que ocorreu a primeira gravidez por via da técnica ICSI (Palermo et al. 1992).

A primeira FIV

Dia 25 de julho de 1978 foi o dia em que nasceu Louise Brown (Figura 1), em Inglaterra, a primeira bebé nascida por meio de tratamentos de FIV, como referido anteriormente (Steptoe e Edwards, 1978, citado em Eskew e Jungheim, 2017). Neste ciclo de tratamento, a mãe de Louise Brown teve um ciclo menstrual natural onde os médicos recuperaram, por laparoscopia, um único oócito pré-ovulatório do seu ovário, fertilizaram-no *in vitro* e depois transferiram o embrião em estado de oito células para o seu útero (Steptoe e Edwards, 1978, citado em Eskew & Jungheim 2017). Já em Portugal, foi no dia 25 de fevereiro de 1986 que nasceu Carlos Miguel Saleiro (Figura 2), no Hospital de Santa Maria, o primeiro bebé proveta português (Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida: CNPMA, s.d. e Rádio e Televisão de Portugal: RTP, 1986).



Figura 1. Louise Brown, a primeira bebé nascida por tratamentos de FIV. Disponível em: <https://www.independent.co.uk/life-style/health-and-families/ivf-baby-louise-brown-story-test-tube-world-first-40th-anniversary-a8455956.html>. Acesso em julho 2024



Figura 2. Carlos Saleiro, o primeiro bebé português nascido de tratamentos de FIV. Disponível em: <https://tribuna.expresso.pt>. Acesso em julho 2024

Tratamentos de PMA na atualidade

Números e volumes de tratamentos atuais

A utilização das ART tem vindo a aumentar em todo o mundo e estima-se que até 2023 nasceram mais de 12 milhões de bebés provenientes destas técnicas (eClinicalMedicine, 2023). Na Europa, desde 1997 até 2019 nasceram mais de 2 milhões de bebés por FIV e foram realizados mais de 12 milhões de ciclos de tratamento (Smeenk et al. 2023). Segundo o registo de 2023 da ESHRE, no ano de 2019 foram reportados mais de 1 milhão de ciclos de tratamento incluindo mais de 160 mil ciclos de FIV, mais de 420 mil ciclos de ICSI, mais de 335 mil ciclos com transferência de embriões congelados (TEC), mais de 60 mil ciclos com PGT, mais de 80 mil ciclos com doação de oócitos e mais de 500 ciclos com maturação *in vitro* de oócitos (MIV) (Smeenk et al. 2023). Certos países europeus chegam mesmo a ter 5% ou mais de bebés nascidos resultantes de ART (Smeenk et al. 2023).

Em Portugal, até 2016 o número de crianças originadas por tratamentos de PMA foi cerca de 3% (Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida: CNPMA, s.d). No ano de 2019 o número total de ciclos foi de 12198 e fizeram-se 2425 ciclos de FIV, 4028 ciclos de ICSI, 3125 ciclos com TEC, 644 ciclos com PGT, 21 ciclos com MIV e 1815 ciclos com recurso à doação de oócitos (Smeenk et al. 2023). Já no ano de 2021 foram realizados mais de 14 mil ciclos FIV/ICSI, sendo que 3523 desses ciclos foram com TEC, 592 ciclos com PGT, 685 ciclos com doação de oócitos a fresco, 646 ciclos com doação de oócitos criopreservados e foram iniciados 1037 ciclos de doação, sendo que nasceram mais de 3 mil bebés provenientes destes ciclos (Relatório de Atividades CNPMA 2021, 2024). É possível observar-se um aumento no número de ciclos e de algumas técnicas específicas, como por exemplo das TEC, comparando os dados dos anos de 2019 e 2021.

Reserva ovárica: o fator etário

A reserva ovárica é o termo utilizado para indicar o número ou a qualidade dos oócitos e reflete a capacidade reprodutora. Pode ser estimada por vários parâmetros como o número de folículos antrais, os níveis das hormonas anti-muleriana (AMH do inglês, Anti-Mullerien Hormone), FSH (Follicle-stimulating hormone) e estradiol, a resposta à estimulação com gonadotropinas e a idade da mulher (Zegers-Hochschild 2017).

Atualmente as mulheres procuram ter filhos em idades cada vez mais avançadas, tendo que recorrer a técnicas de PMA (Ribeiro e Sousa 2023). Sabe-se que a reserva ovárica diminui com a idade e que

a partir dos 35 anos decresce drasticamente (O'Brien et al. 2017), sendo a taxa de gravidez entre os 19 e os 26 anos o dobro da taxa de gravidez entre os 35 e os 39 anos (Dunson et al. 2002).

Doação de oócitos

Quem são as dadoras

Crítérios de elegibilidade

Em Portugal, a doação de gâmetas está prevista na lei desde 2006 e está devidamente regulamentada. As normas legais portuguesas definem que a doação de gâmetas é voluntária, de carácter benévolo e não remunerada, embora as dadoras recebam uma compensação destinada ao reembolso das despesas efetuadas ou dos prejuízos direta e imediatamente resultantes da dádiva (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.). Este valor está atualmente fixado no dobro do valor do Indexante dos Apoios Sociais, em vigor no momento da dádiva, para a doação de oócitos, sendo em 2024 de 1018.52€ (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.).

A doação de oócitos pode ser feita por qualquer pessoa saudável, sem história de doenças genéticas, doenças de transmissão sexual ou outras consideradas graves e que, para além disso, cumpra ainda os seguintes requisitos: ter entre 18 e 34 anos; ter doado oócitos menos de quatro vezes; não ter doado oócitos há menos de 3 meses (Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida: CNPMA, s.d.).

As potenciais dadoras participam num rigoroso processo de avaliação médica e psicológica, tendo que realizar consultas com um especialista em medicina da reprodução e com um psicólogo com experiência nessa área, de forma gratuita (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.). É muito importante que durante as consultas, todas as doenças conhecidas sejam referidas, uma vez que, por mais simples que possam parecer, podem ter implicações nas doações. Terão ainda que realizar análises e exames como ecografia ao útero e aos ovários para excluir doenças de transmissão sexual ou doenças genéticas e para avaliar a sua capacidade reprodutora (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.). Seguidamente, as dadoras iniciam uma fase que dura cerca de 10 dias, a estimulação ovárica, tendo que realizar 2 a 3 ecografias para avaliar o desenvolvimento dos folículos. No fim desta fase, procede-se à punção ovárica, de modo a obter os oócitos, e 30 dias depois realiza-se uma última consulta e ecografia, para confirmar que não resultaram complicações (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.). Todos os resultados dos exames são comunicados às dadoras e, caso haja possibilidade de não serem aceites por razões médicas, são informadas desses motivos.

Todo o processo decorre sob sigilo médico e as dadoras não podem saber para quem estão a doar os seus gametas, nem tão pouco os beneficiários dessa dádiva podem saber a identidade das dadoras. Por outro lado, a lei portuguesa estabelece que as dadoras nunca poderão ser consideradas progenitoras da criança nascida e, por esse facto, não têm qualquer direito ou dever sobre essas crianças. No entanto, em Portugal a doação de oócitos é atualmente realizada em regime de não anonimato, o que significa que as pessoas nascidas de doação, uma vez atingidos os 18 anos de idade, poderão ter acesso à identidade da dadora (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.).

Quem são as recetoras

Razões pelas quais se recorre à doação de oócitos

Apesar dos grandes avanços na medicina da reprodução e nos tratamentos de fertilidade, muitos casos só terão solução com recurso à doação de gametas. Um tratamento com doação de oócitos pode-se justificar em várias situações como: falência precoce dos ovários; insucesso repetido nos tratamentos de fertilidade usando os oócitos da própria mulher, geralmente devido à má qualidade oocitária e embrionária; portadoras de doenças genéticas graves; tratamentos de quimioterapia; nos casos de mulheres a tentar engravidar em idades mais avançadas, pois a partir dos 38 anos, para além da diminuição do número de oócitos, uma grande quantidade destes poderão ter alterações estruturais e/ou genéticas, que podem inviabilizar uma gravidez normal (Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução: SPMR, s.d.).

Doação a fresco vs. *Egg banking*

Vantagens e desvantagens de ser recetora de oócitos a fresco

Comparando os desfechos dos ciclos entre aqueles que utilizam oócitos a fresco e os que utilizam oócitos criopreservados, não existem diferenças significativas (Gursu et al. 2022, Doyle et al. 2016). Ainda assim, existem vantagens e desvantagens a ter em conta na escolha do tipo de ciclo de doação que se queira realizar. Uma vantagem de ser recetora de oócitos a fresco é o facto de haver menos manipulação dos oócitos, sendo que os sujeitamos a menos stresses que possam advir da criopreservação. Uma desvantagem é o facto de haver maiores dificuldades relacionadas com a sincronização entre o ciclo da dadora e o endométrio da recetora (Trokoudes et al., 2011). Já as vantagens do *egg banking* (banco de oócitos) são a possibilidade de proporcionar às recetoras mais opções na seleção da dadora e maior flexibilidade na programação do tratamento (Solé et al., 2013).

Egg banking: Duração do armazenamento

O banco de oócitos caracteriza-se por ser um armazenamento de oócitos criopreservados para uso futuro (Zegers-Hochschild 2017). Não há um limite temporal para a criopreservação de oócitos pois estes podem manter-se criopreservados por um tempo indefinido. Atualmente já existem tratamentos descritos com oócitos criopreservados há mais de 14 anos (Urquiza et al. 2014, citado em Cascante et al. 2023).

Ciclo de recetora de oócitos criopreservados

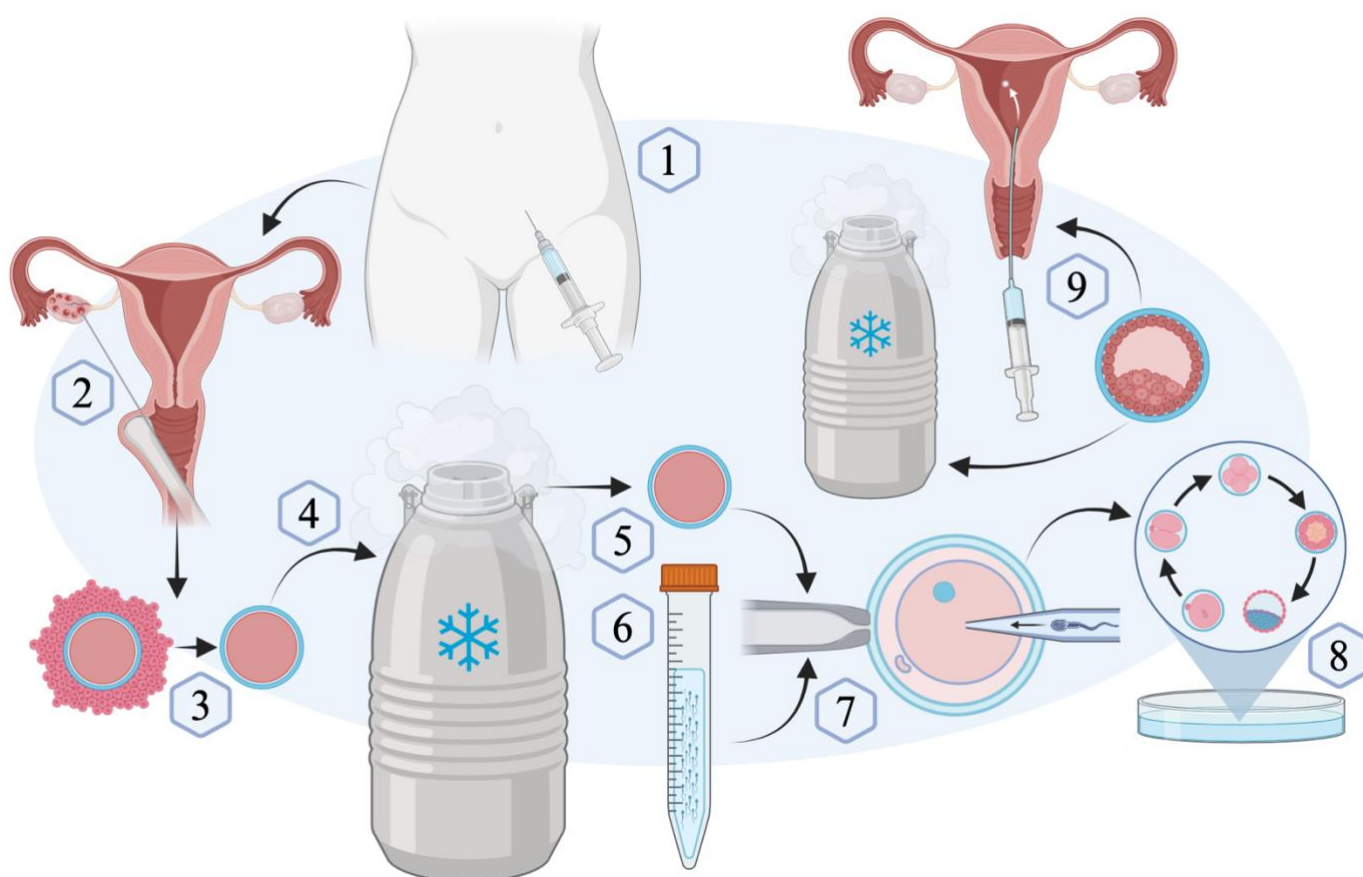


Figura 3. Ciclo de Recetora de oócitos criopreservados. 1 – Estimulação ovárica da dadora. 2 – Punção ovárica da dadora. 3 – Decumulação. 4 – Criopreservação de oócitos de dadora. 5 – Desvitrificação de oócitos. 6 – Preparação de amostra de sémen. 7 – ICSI. 8 – Cultura embrionária. 9 – Transferência embrionária para a recetora e vitrificação dos restantes blastocistos. Produzido com recurso ao BioRender.com

Estimulação ovárica das dadoras

O ciclo de recetora de oócitos de dadora vitrificados/desvitrificados (Figura 3) inicia-se com a estimulação ovárica das dadoras (Figura 3.1). As dadoras selecionadas para este estudo tinham idades compreendidas entre os 18 e os 30 anos, índice de massa corporal (IMC) entre 18 e 30 kg/m², cariótipo normal, boa saúde física e psicológica, sem história pessoal ou familiar de doenças hereditárias, testes

negativos para doenças sexualmente transmissíveis e sem doenças ginecológicas. Com base na idade, no IMC e na resposta a estimulações ováricas anteriores, se existentes, inicia-se o protocolo de estimulação personalizado a cada dadora. Este tratamento permite recrutar vários folículos de modo a obter mais do que um oócito pré-ovulatório. Desta forma há uma maior probabilidade de se obter uma gravidez (Jain e Singh 2023). Para isso é administrada FSH (do inglês, Follicle-Stimulating Hormone) recombinante, através dos fármacos Gonal-F (Merck) ou Bemfolá (Gedeon Richter), por exemplo, ou hMG (do inglês, Human Menopausal Gonadotropin) altamente purificada, através de fármaco Menopur (Ferring Pharmaceuticals Inc), que consiste numa mistura de FSH e LH (do inglês, Luteinizing Hormone). É também administrado um antagonista da GnRH (do inglês, Gonadotropin-Releasing Hormone), através do fármaco Cetrotide (Merck) ou Orgalutran (MSD), de forma a suprimir a glândula pituitária para prevenir a ovulação precoce. Entre o 7.º e o 9.º dia de estimulação é realizada uma primeira ecografia endovaginal para controlo de ciclo, e entre o 10.º e o 12.º dia é realizada uma nova ecografia. A punção ovárica é então agendada em função do tamanho dos folículos observado nas ecografias, e tem lugar entre o 13.º e o 15.º dia do ciclo. 36h antes da punção é administrado o *Trigger*, de forma a desencadear a luteinização e promover a maturação folicular, através do agonista da GnRH, com o fármaco Decapeptyl (Ferring).

Punção ovárica

A punção ovárica (Figura 3.2 e 4), realizada por um médico, é eco-guiada através da utilização de um transdutor de ultrassons colocado na vagina para visualizar o ovário e os folículos (Gallardo et al. 2016). Insere-se uma agulha de aspiração no transdutor, inicia-se a punção dos ovários e aspira-se o conteúdo dos folículos através de uma seringa até todos os folículos terem sido puncionados (Gallardo et al. 2016). Os tubos de punção vão-se enchendo de líquido folicular e, com a ajuda de uma enfermeira, são levados até à câmara de fluxo, onde está o embriologista, para iniciar a captura dos COCs.

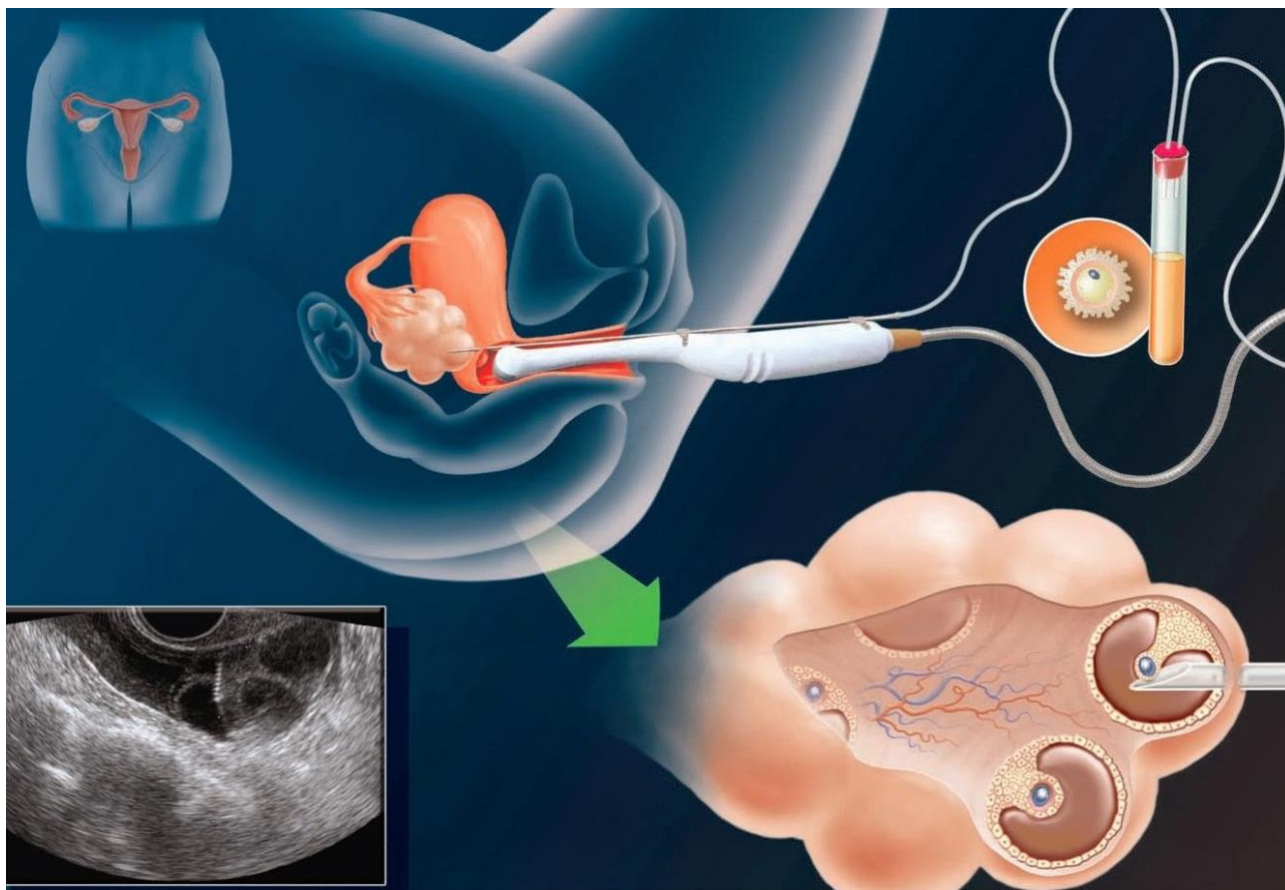


Figura 4. Punção ovárica. Disponível em: <https://www.omeulaboratoriodesonhos.com/2014/06/a-obtencao-dos-ovocitos.html>. Acesso em julho 2024

Captação de COCs

A captura dos COCs é realizada numa câmara de fluxo laminar previamente ligada e com uma temperatura de bancada de 37°C. O embriologista abre o tubo da punção, despeja parte do seu conteúdo numa placa de petri de 60 cm (Vitrolife), agita o tubo e despeja o restante conteúdo batendo no fundo da placa para que não fique nenhum resto de líquido no tubo (Figura 5.1 e 5.2). Seguidamente, inicia a procura de COCs utilizando uma lupa e uma pipeta de pasteur de vidro. Os COCs que encontrar são passados para uma caixa de captação contendo 2ml de meio Ferti (Fertilisation Medium, Genea Biomedx) e óleo mineral (Hypure® Oil Heavy, Kitazato), previamente preparada no dia anterior para estar gaseada. Quando todas as caixas tiverem vistas e revistas e já estiverem todos os COCs na caixa de captação, o embriologista passa-os para uma caixa com meio de fertilização (Figura 6), devidamente identificada com o nome e o número de história da dadora, contendo gotas de lavagem e gotas onde coloca os COCs até ao procedimento seguinte.

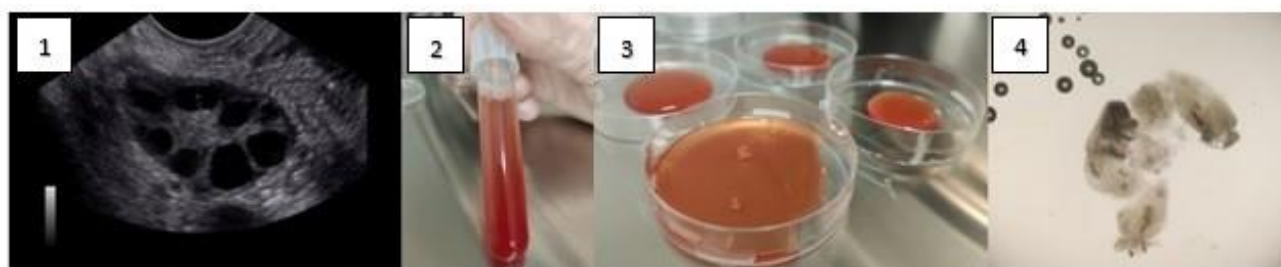


Figura 5. Pesquisa de COCs. 1 – Imagem ecográfica de um ovário e os seus folículos. 2 – Tubo com líquido folicular. 3 – Placas de petri com líquido folicular. 4 – COCs. Disponível em: <https://www.institutobernabeu.com/es/foro/liquido-folicular/>. Acesso em julho 2024

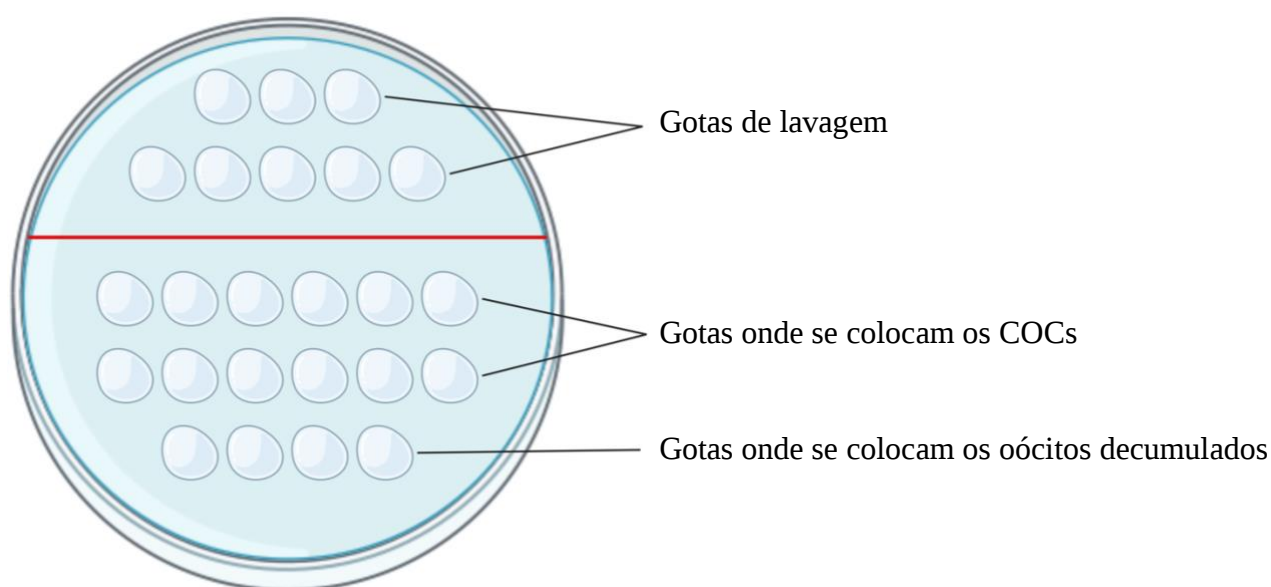


Figura 6. Caixa de Ferti. Produzido com recurso ao BioRender.com

Decumulação

Aproximadamente 1h depois da punção ovárica realiza-se a decumulação (Figura 3.3). Para isso é necessário primeiramente fazer uma caixa de HYASE (Figura 7). Esta caixa é composta por 3 gotas de 60 μ L de hialuronidase (Hyase-10XTM, vitrolife) e 3 gotas de 60 μ L + 6 + 4 gotas de 30 μ L de um meio com tampão MOPS (por exemplo, *sperm buffer*, Genea Biomedx). Para realizar a decumulação enzimática colocam-se os COCs (Figura 8) nas gotas de 60 μ L de meio tamponado e passam-se para as gotas de hialuronidase durante 30 segundo com uma pipeta de pasteur de vidro mantendo sempre um movimento de entrada e saída da pipeta. Quando o *timer* apitar, torna-se a colocar os COCs nas gotas de 60 μ L de meio tamponado. A partir deste momento inicia-se uma decumulação mecânica utilizando uma pipeta *stripper* com uma ponta de 170mm até remover a maioria das células do cúmulo e seguidamente utiliza-se uma ponta de 135mm para remover a totalidade das células do cúmulo que envolvem o oócito (Figura 9). Após terminada a decumulação procede-se à classificação

dos oócitos (se estão em metafase II - MII, em metafase I - MI, se são vesículas germinais - VG, atresícos, etc) e colocam-se os oócitos novamente na caixa de Ferti (Figura 6), mas desta vez nas 4 gotas finais, ordenados pela sua classificação (MII na gota 1, MI na gota 2, VG na gota 3 e atresícos entre outros na gota 4).

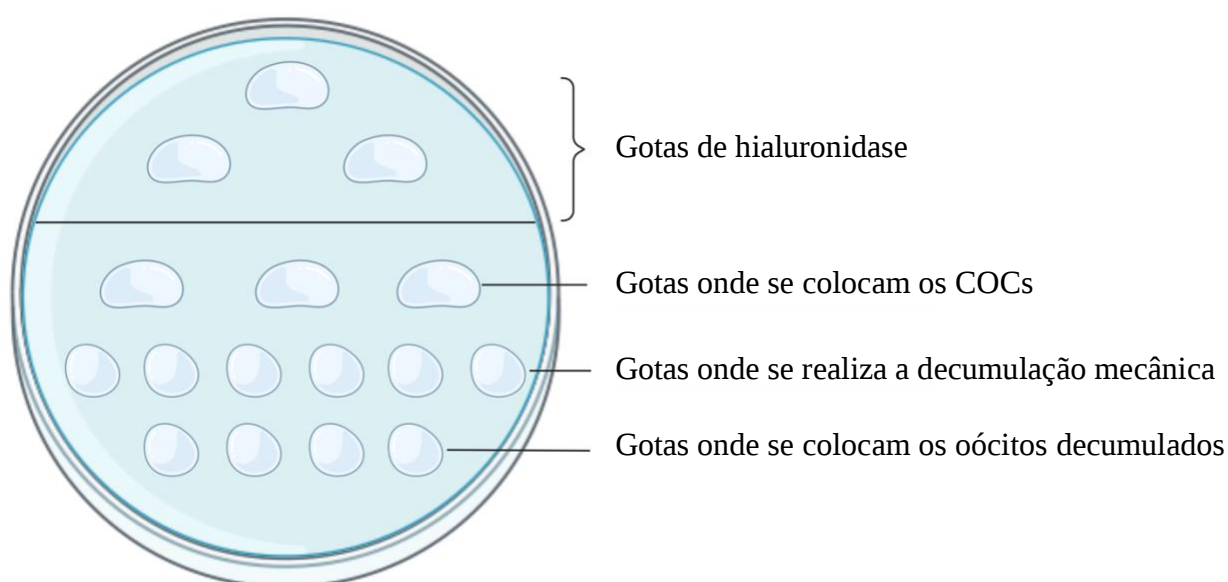


Figura 7. Caixa de decumulação. Produzido com recurso ao BioRender.com

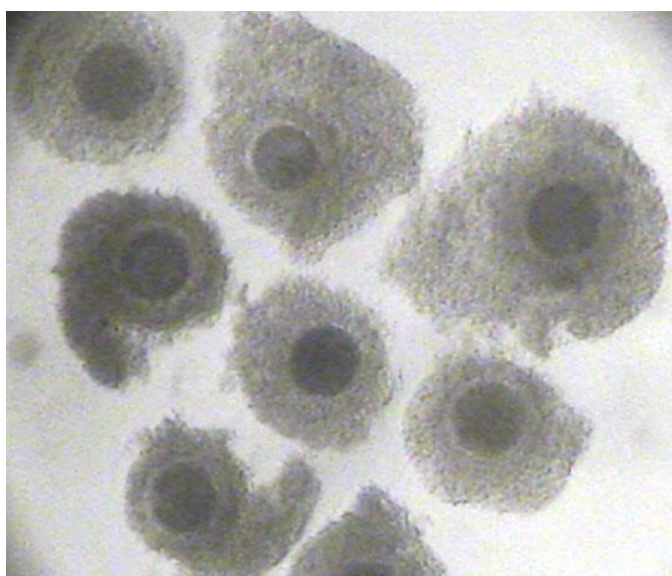


Figura 8. Complexo oócito-cumulus. Disponível em: https://www.researchgate.net/figure/Figura-17-Oocitos-graus-1-e-2_fig5_230794393. Acesso em julho 2024

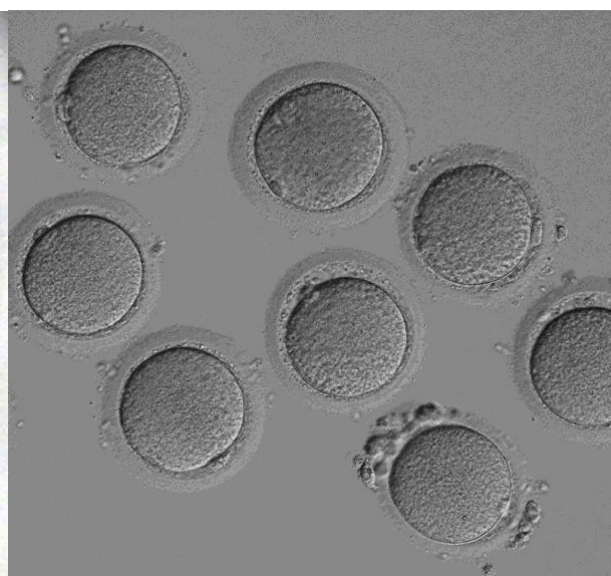


Figura 9. Oócitos decumulados. Disponível em: <https://www.saudebemestar.pt/pt/clinica/ginecologia/doacao-de-ovocitos/>. Acesso em julho 2024

Criopreservação de oócitos

Vitrificação de oócitos

Para proceder à vitrificação dos oócitos das dadoras (Figura 3.4) utilizou-se o protocolo da kitazato com o método cryotop (Figura 11). Este protocolo é realizado numa câmara de fluxo laminar com a temperatura desligada e com uma lupa. Primeiramente identifica-se a palheta cryotop com os dados da dadora e coloca-se a tampa num recipiente contendo azoto líquido (Figura 10.1) e a outra parte da palheta no suporte próprio da repro plate (Kitazato) (Figura 10.2). Em seguida, colocam-se os meios de congelação na placa, sendo no primeiro poço adicionado com micropipetas 20µL de BS (basic solution) e no segundo e terceiro poços 300µL de VS (vitrification solution). Utilizando uma *stripper* colocam-se os oócitos (máximo 3 por palheta) no primeiro poço contendo BS, adiciona-se 20µL de ES (equilibration solution) e deixam-se neste poço durante 3 min. Em seguida, adiciona-se ao primeiro poço mais 20µL de ES e deixam-se neste poço por mais 3 min. Adicionam-se os restantes 240µL de ES ao primeiro poço e deixam-se os oócitos neste poço durante 6-9 min. Passam-se os oócitos para o poço seguinte contendo VS levando o mínimo de meio possível do poço anterior e deixa-se estar durante 30 segundos. Ao fim desse tempo, passam-se os oócitos para o terceiro poço contendo VS e deixam-se estar por mais 30 segundos. De seguida, colocam-se os oócitos na ponta do cryotop com a marca preta virada para cima, aspira-se o máximo de meio possível em volta dos oócitos e coloca-se rapidamente a palheta em azoto líquido. Por fim, é só guardar num contendor de azoto (Figura 10.3) numa localização disponível e anotar essa localização, sem nunca expor a palheta ao ar.

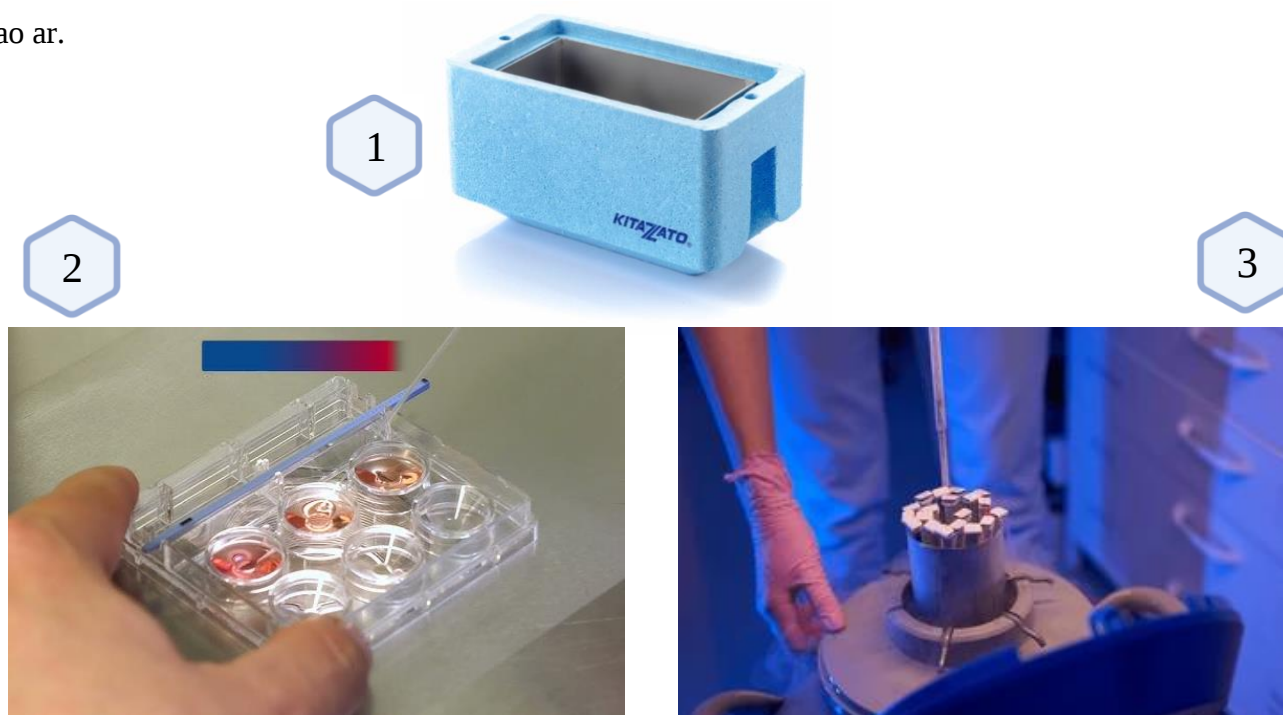


Figura 10. 1 - Caixa de Azoto. Disponível em: <https://kitazato-ivf.com/vitrification/vitrification-accessories/>. 2 – Repro plate. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=rIW911LapZE>. 3 - Contendor de azoto. Disponível em: <https://unsplash.com/es/s/fotos/Dewar>

Desvitrificação de oócitos

Para proceder à desvitrificação dos oócitos das dadoras (Figura 3.5) utilizou-se também o protocolo da kitazato (Figura 11). Este protocolo é realizado numa câmara de fluxo com a temperatura a 37°C e com uma lupa. Em primeiro lugar é necessário encontrar nos contentores de azoto líquido a palheta que se pretende descongelar, em seguida passa-se essa palheta para um recipiente contendo azoto líquido (Figura 10.1) e tira-se a tampa. De seguida, coloca-se numa repro plate 300µL de DS (diluent solution) no primeiro poço e 300µL de WS (washing solution) no segundo e terceiro poços. Numa caixa de poço central (Vitrolife) adiciona-se 1mL de TS previamente aquecido a 37°C. Para iniciar o protocolo, passa-se rapidamente a palheta para a caixa de poço central contendo TS (Thawing solution) e deixa-se durante 1 min. Em seguida, com uma *stripper*, passam-se os oócitos para o primeiro poço da repro plate contendo DS durante 3 min. Passado esse tempo passam-se os oócitos para o segundo poço contendo WS durante 5 min e para o seguinte poço contendo WS por mais 1 min. Por fim passam-se os oócitos para uma caixa de Ferti (Figura 6) e espera-se 2h até iniciar o procedimento seguinte nos oócitos viáveis.

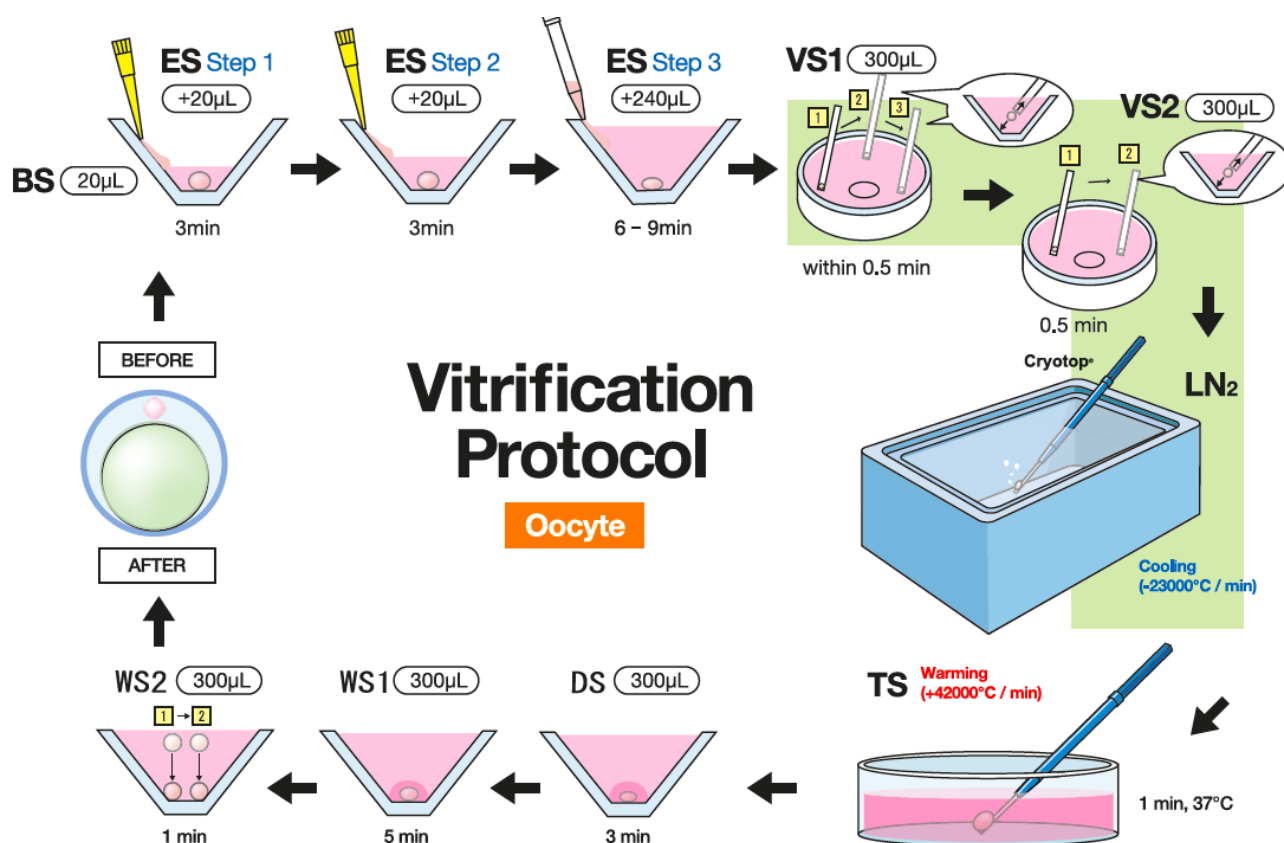


Figura 11. Protocolo de vitrificação da Kitazato. Disponível em: <https://kitazato-ivf.com/wp-content/uploads/2023/08/Vitrification-Protocol.pdf>. Acesso em julho 2024

Processamento da amostra de sémen para ICSI

Com uma micropipeta, retira-se uma gota de 5µL de amostra de esperma e coloca-se na Makler (Makler® Chamber, CooperSurgical) para avaliar a motilidade. Se for boa (concentração > 5 milhões e > 30% de progressivos móveis), fazem-se gradientes de 1mL, se for de qualidade inferior, fazem-se gradientes de 0,5mL (Figura 12.1). Primeiro, com uma seringa, coloca-se o gradiente de 80 no fundo de um tubo de centrifuga previamente identificado com o número e o nome da paciente. Por cima, com muito cuidado, coloca-se o gradiente de 40, o respetivo volume de amostra (1mL ou 0,5mL) e leva-se à centrifugadora durante 10 minutos a 1100 rotações por minuto (rpm) (Figura 12.2). Ao fim, desse tempo retira-se o sobrenadante até ao *pellet* com uma pipeta de Pasteur de plástico esterilizada, adiciona-se 0,5mL de *sperm buffer*, ressuspende-se a amostra e leva-se novamente à centrifugadora, desta vez durante 5 minutos a 1500 rpm (Figura 12.5). Por fim, retira-se novamente o sobrenadante até ao *pellet*, adiciona-se cuidadosamente entre 100 a 150µL de *sperm buffer* com uma micropipeta e deixa-se a migrar num ângulo de cerca de 45° (*swim-up*) até ao momento da ICSI.

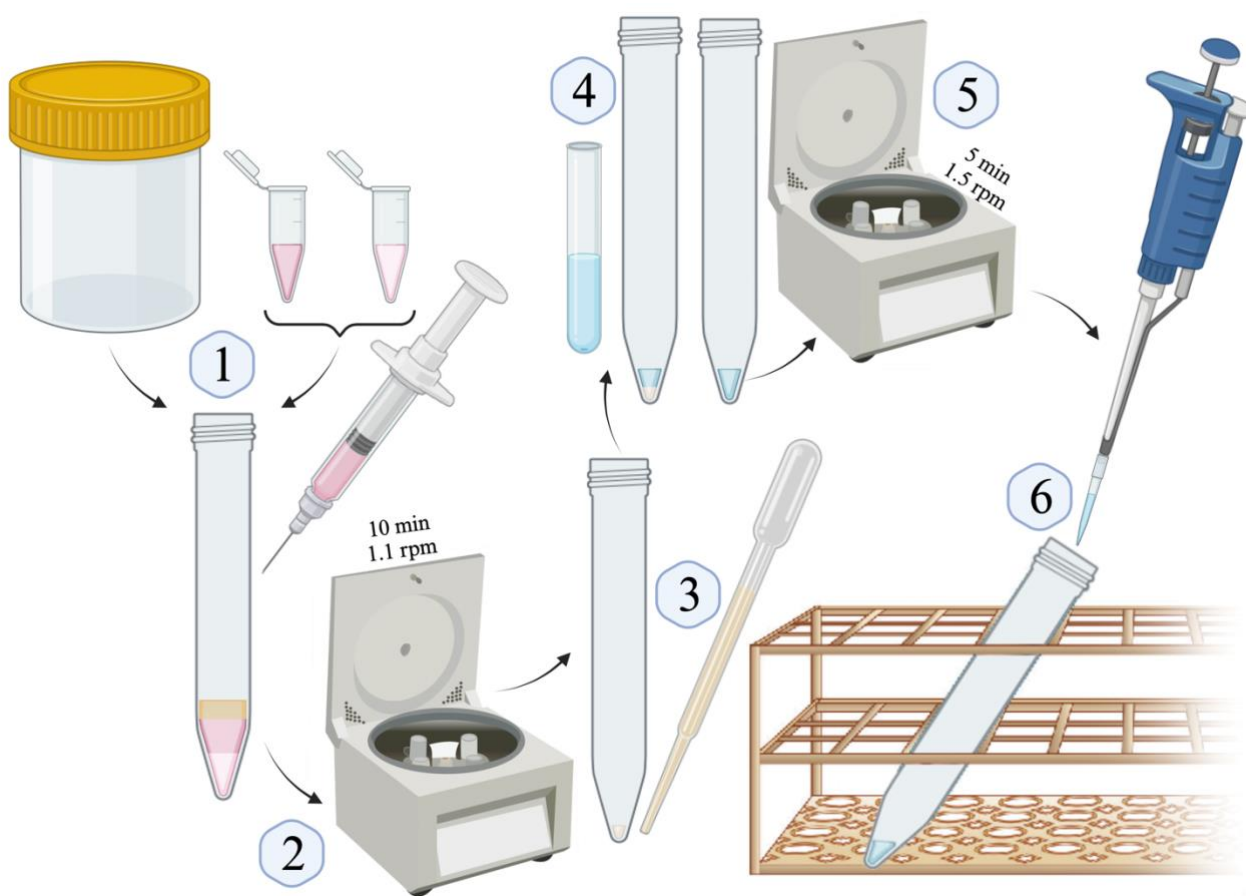


Figura 12. Processamento de Sémen para ICSI. 1 – Gradientes. 2 – 1ª centrifugação. 3 – Retirar sobrenadante. 4 – Adicionar *sperm buffer*. 5 – 2ª centrifugação. 6 – *Swim-up*. Produzido com recurso ao BioRender.com

ICSI

Para se realizar o procedimento de ICSI, uma das técnicas mais complexas de PMA, colocam-se os oócitos decumulados numa caixa de ICSI (Figura 13) contendo 8 microgotas de 10 μ L de meio com tampão MOPS/HEPES que permite manter o pH estável fora da incubadora, mais 4 microgotas de 5 μ L e uma linha de 10 μ L de PVP (Polyvinylpyrrolidone, CooperSurgical).

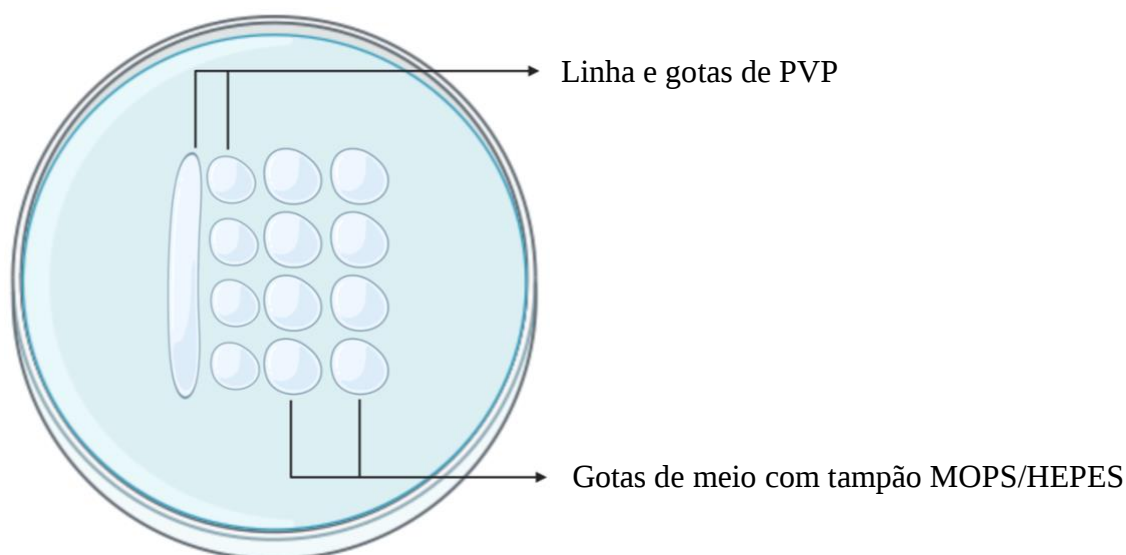


Figura 13. Caixa de ICSI. Produzido com recurso ao BioRender.com

Em seguida, removem-se as bolhas de ar do sistema, colocam-se as agulhas de ICSI (Figura 14.2) e de *Holding* (Figura 14.1) no microscópio de microinjeção (Figura 14.3) e alinham-se as agulhas, começando da menor ampliação para a maior ampliação. Em seguida, passam-se os oócitos para as gotas de meio tamponado e adiciona-se 5 μ L da amostra de sémen previamente processada de modo a atrasar o movimento progressivo dos espermatozoides. Neste momento coloca-se a caixa na platina do microscópio de microinjeção, aquecida a 37°C, e realiza-se o procedimento. Começa-se por encher as agulhas com PVP para melhor controlo do movimento de aspiração e passa-se para a linha de PVP contendo milhões de espermatozoides. Imobiliza-se um espermatozoide de cada vez, aspira-se pela agulha de ICSI e passa-se para uma gota de PVP limpa onde se faz o movimento de quebrar a cauda até estarem completamente imobilizados. Aspiram-se pelas caudas e passa-se para as gotas que contêm os oócitos. Imobiliza-se o oócito com a pipeta de *holding*, roda-se o oócito até o corpo polar estar às 12h e introduz-se a agulha de ICSI contendo 1 espermatozoide na ponta (Figura 14.4). Após a introdução da agulha, aspira-se um pouco do conteúdo intracelular até de observar um ressalto e depois expira-se todo o conteúdo, deixando o espermatozoide no interior do citoplasma do oócito.



Figura 14. 1 - Agulha de *Holding*; 2 - Agulha de ICSI. Disponível em: <https://kitazato-ivf.com/micro-tools/> ; <https://www.kitazato.co.jp/en/products/microtools/icsi-injection-pipette> ; 3 - Microscópio de ICSI. Disponível em: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/pt_AMS/solutions/life-sciences/microinjection ; <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/evident-olympus-scientific-solutions/product-84543-725660.html> ; 4 - ICSI. Disponível em: <https://ginemed.pt/reproducao-assistida/icsi/>. Acesso em julho 2024

Após todos os oócitos serem microinjetados, passam-se para uma caixa de Geri (Figura 15) contendo 3 + 5 + 4 + 4 gotas de 30µL de meio de cultura (Geri, Genea Biomedx), um meio próprio para o desenvolvimento embrionário, deixando um oócito em cada gota (Figura x).

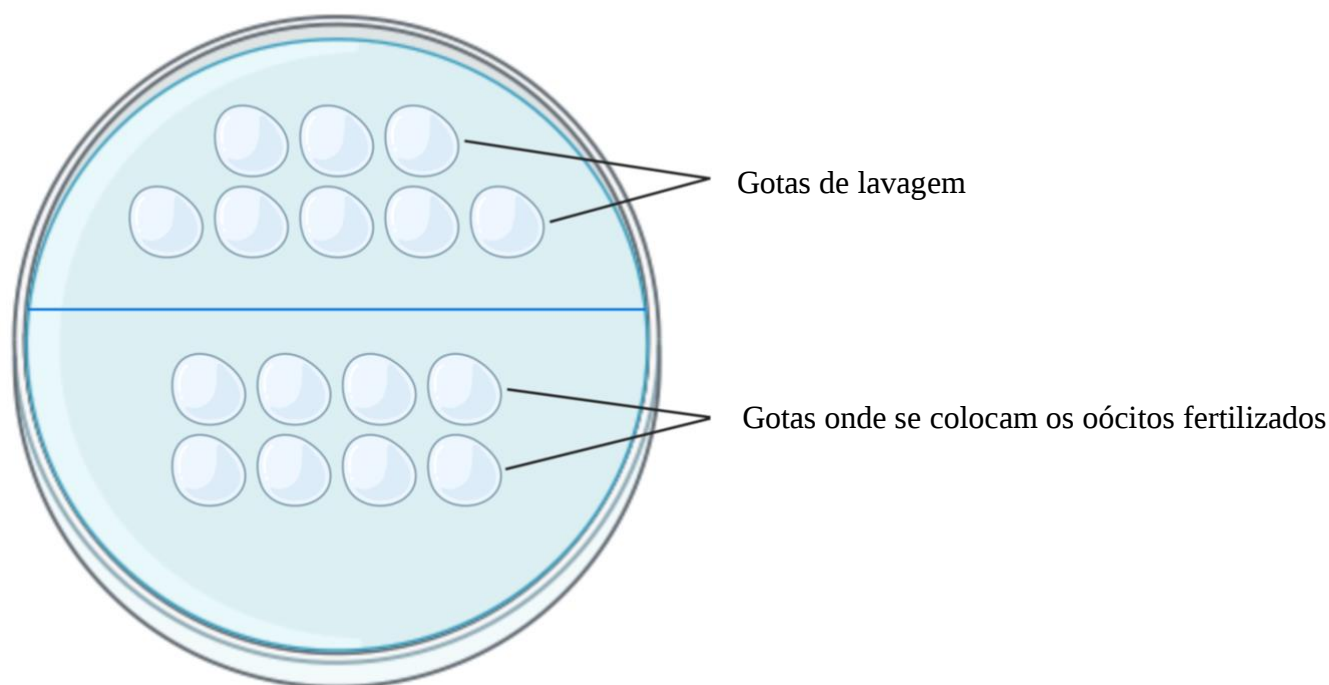


Figura 15. Caixa de Geri. Produzido com recurso ao BioRender.com

Fecundação/PN *check*

A observação da fecundação é feita 16 a 18 horas após a microinjeção dos oócitos das dadoras com sémen do cônjuge ou de dador e para tal é necessário levar a caixa de cultura até um microscópio invertido para analisar se são observáveis os 2 pronúcleos (Figura 16) (Elder e Dale 2011). Pode ainda ser observável a presença de dois corpos polares no espaço perivitelino (Figura 16) (ESHRE, 2017).



Figura 16. Oócito fecundado com 2 pronúcleos e 2 corpos polares. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/books/abs/preimplantation-genetic-diagnosis/preimplantation-embryo-development/FA5DACEF19DC53E37D57FC14FFB6D512>. Acesso em julho 2024

Cultura embrionária

Na clínica Ginemed Lisboa observa-se a fecundação em dia 1 e realiza-se a avaliação embrionária em dia 3 de desenvolvimento e em dia 5, e também em dia 6 e 7, se necessário. Em dia 1 observam-se os dois pronúcleos e o aparecimento do segundo corpo polar. Em dia 3 observa-se o número de blastómeros, a simetria e o grau de fragmentação, sendo o ideal um embrião com 8 células, com fragmentação I, e simetria EE (estado específico) com qualidade A segundo a classificação ASEBIR (do espanhol, Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) (Figura 17). Em dia 5 espera-se que os embriões tenham atingido o estado de blastocisto (Figura 18) e observa-se a qualidade da massa celular interna (ICM, do inglês, Inner Cell Mass) e do trofoblasto, sendo o ideal um embrião de qualidade AA, segundo a classificação ASEBIR. Se necessário, deixam-se os embriões em cultura até dia 6 ou 7, observando todos os dias o seu desenvolvimento até que se obtenha uma classificação aceitável ou até serem descartados.



Figura 17. Embrião em dia 3 de desenvolvimento. Disponível em: <https://www.institutobernabeu.com/en/blog/day-3-embryo-culture/>. Acesso em julho 2024



Figura 18. Blastocisto. Disponível em: <https://www.myfertilitycare.com.au/embryo-selection.html>. Acesso em julho 2024

Preparação endometrial das recetoras

A preparação endometrial das recetoras pode ser realizada num ciclo natural ou num ciclo substituído. Para se realizar o ciclo substituído administra-se um agonista da GnRH e estrogénios a partir do primeiro dia da menstruação. 11 a 12 dias após o início da estimulação acrescenta-se a administração de progesterona. Este protocolo de estimulação mantém-se até à data da realização da análise da β -hCG (Gonadotropina Coriónica Humana, do inglês Human Chorionic Gonadotropin). Se o resultado da análise for positivo, mantém-se a estimulação até à 12ª semana de gestação e se o resultado for negativo, termina-se o tratamento.

Transferência embrionária

Os embriões que chegam a blastocisto com uma boa qualidade podem ser transferidos a fresco, caso o endométrio da recetora esteja preparado para os receber, ou criopreservados, para serem transferidos em diferido, sendo necessário desvitrificar o embrião no dia da transferência em sincronia com o tratamento de preparação endometrial da recetora. Para se proceder à transferência embrionária é necessário pré-aquecer um cateter de transferência numa câmara de fluxo com a superfície aquecida a 37°C (Figura 19.1). Coloca-se meio tamponado e aquecido numa caixa de poço central, também esta previamente aquecida (Figura 19.2). De seguida, passa-se o embrião de melhor qualidade, com uma *stripper*, da caixa de cultura para a caixa de poço central (Figura 19.3). Carrega-se o cateter com o auxílio de uma seringa aspirando meio limpo, ar, meio com o embrião, ar e novamente meio limpo (Figura 19.4). Leva-se o cateter carregado até ao bloco, onde o médico o insere no interior do útero da recetora e o descarrega (Figura 19.5). Após estar descarregado, o médico devolve o cateter ao embriologista que irá novamente para a câmara de fluxo procurar se algum embrião ficou retido. Para isso, aspira apenas com a seringa meio limpo e em seguida faz passar esse meio por dentro do cateter e pela parte externa do cateter, observa o meio e, se estiver limpo, informa o médico de que a transferência foi bem-sucedida. 14 dias após a transferência faz-se a análise à β -hCG e, aproximadamente 1 mês após a transferência, faz-se uma ecografia de modo a confirmar a presença de sacos gestacionais.

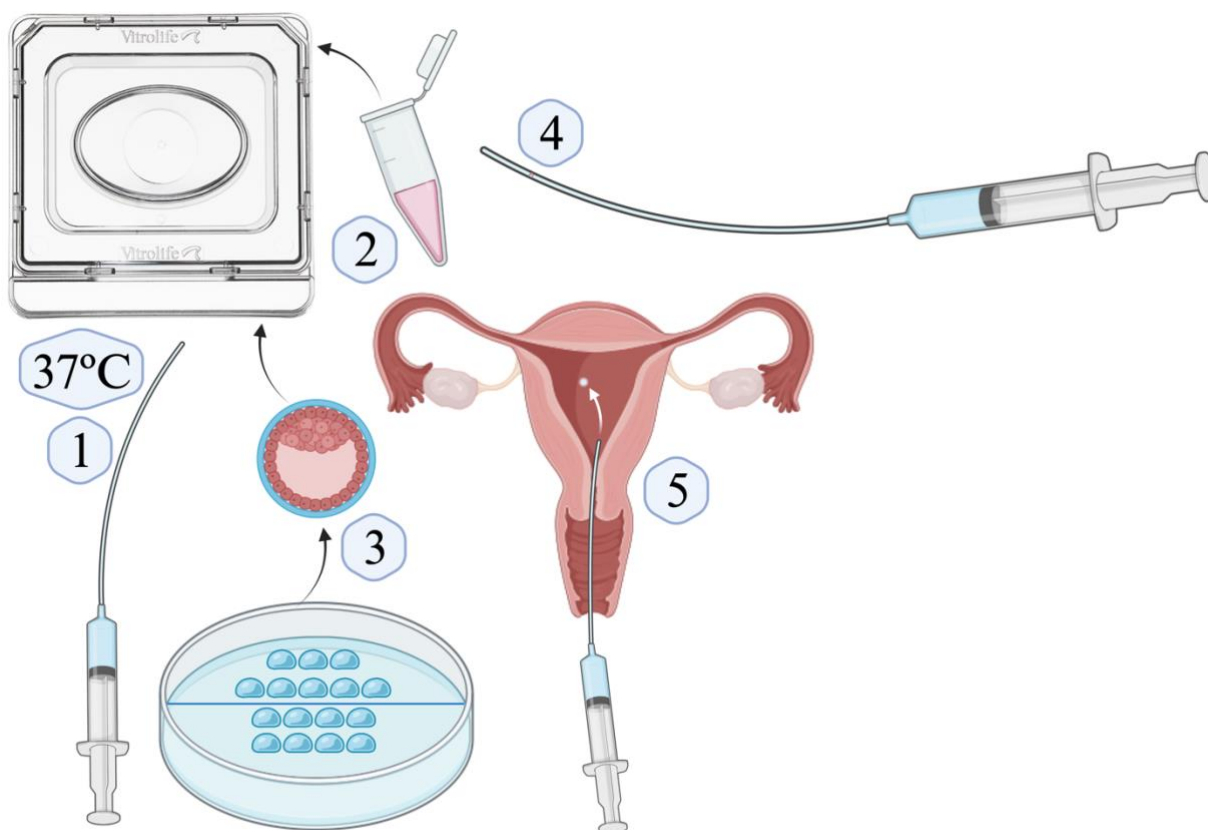


Figura 19. Transferência Embrionária. 1 – Aquecer cateter e caixa de poço central. 2 – Colocar meio tamponado na caixa de poço central. 3 – Colocar embrião na caixa de poço central. 4 – Aspirar embrião para o cateter. 5 – Transferir o embrião. Produzido com recurso ao BioRender.com

Criopreservação de oócitos

Eficácia e eficiência da criopreservação de oócitos de dadora

A FIV com oócitos vitrificados de dadoras é menos eficiente do que a utilização de oócitos a fresco, mas a sua eficácia continua a ser comparável à dos ciclos com oócitos a fresco. A vitrificação de oócitos é utilizada para preservar o potencial reprodutor dos oócitos. Um pequeno número de testes controlados e aleatórios realizados por grupos experientes demonstrou que esta técnica proporciona taxas de fertilização, implantação e gravidez comparáveis às dos oócitos a fresco (Cornet-Bartolomé et al. 2020). No entanto, grandes análises baseadas em registos têm relatado consistentemente taxas de recém-nascidos vivos (LBR, do inglês, Live Birth Ratio) mais baixas em ciclos que utilizam oócitos vitrificados. Não é claro se esta diminuição pode ser devida ao efeito da vitrificação nos oócitos ou à menor eficiência da técnica, uma vez que alguns dos oócitos não sobrevivem após a desvitrificação (Cornet-Bartolomé et al. 2020). As possíveis explicações para estes resultados incluem o impacto fisiológico que a vitrificação causa aos oócitos, que advém da eficácia da técnica, e a perda de oócitos após a desvitrificação, que é aproximadamente 1 em cada 10, mesmo nos melhores laboratórios, consiste na eficiência da técnica (Cornet-Bartolomé et al. 2020).

Fatores que determinam a taxa de sobrevivência oocitária à criopreservação

A vitrificação de oócitos pode resultar na sua alteração da expressão genética, no padrão diferente de oscilação do cálcio após a ICSI, na alteração da estrutura e das propriedades dos lípidos, na redução do número de cópias do mtDNA e no aumento dos níveis de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, Reactive Oxygen Species) (Shirazi et al., 2016; Amoushahi et al., 2017; Azari et al., 2017, citado em Cornet-Bartolomé et al. 2020), sendo a perda de oócitos durante a desvitrificação provavelmente a principal razão para os resultados clínicos inferiores registados (Cornet-Bartolomé et al. 2020).

Objetivo do presente trabalho

A utilização de oócitos vitrificados de dadoras permite superar muitos desafios logísticos, mas tem como adversidade a perda de alguns oócitos que degeneram após a desvitrificação. No Consenso de Viena de 2012 foi estabelecido que a taxa de sobrevivência dos oócitos à desvitrificação entre 95-100% seria o valor de referência, que entre 85-95% seria o nível de competência, que entre 70-85% seriam valores considerados abaixo da competência, que entre 50-70% seria uma sobrevivência baixa e que <50% seria muito baixa (Balaban, 2012).

O interesse científico da realização deste trabalho baseia-se no facto de não se saber se quando se obtêm taxas de sobrevivência abaixo do valor de referência, se na prática clínica isso pode limitar não só o número de oócitos, como também se pode traduzir em desfechos inferiores nas fases subsequentes do tratamento, como a taxa de fecundação dos oócitos sobreviventes, ao desenvolvimento embrionário, e a capacidade desses embriões resultarem numa gravidez.

O objetivo deste trabalho foi analisar a influência das taxas de sobrevivência dos oócitos de dadora à desvitrificação nos desfechos laboratoriais e clínicos dos tratamentos de PMA.

Materiais e Métodos

Recolha de dados e local de estágio

Os dados dos casos clínicos utilizados para a realização deste trabalho foram recolhidos da rede IVIRMA Global Research Alliance e da rede da Ginemed, que abrange informação de todas as clínicas. O meu estágio curricular teve lugar na clínica Ginemed Lisboa, onde pude contactar com a realidade que é o dia a dia de um embriologista, aprender na prática muitas das técnicas exercidas nos laboratórios de PMA e, mais especificamente, seguir todo o processo, do início ao fim, de casos de recetoras de oócitos de dadora criopreservados.

Caracterização da população em estudo

Recolha de dados

Este estudo retrospectivo de coorte utilizou informações de 12690 ciclos de recetoras de oócitos de dadoras vitrificados e desvitrificados, realizados entre 2018 e 2022, incluindo um total de 144793 oócitos. Um ciclo de recetora de oócitos vitrificados/desvitrificados foi definido como um tratamento em que apenas oócitos de uma única dadora foram utilizados para uma recetora. Foram excluídos deste estudo os ciclos em que nenhum oócito de dadora sobreviveu ao processo de desvitrificação, em que foram utilizados embriões em dia 3 de desenvolvimento, em que foi realizado PGT ou em que foram utilizados espermatozoides de biópsia testicular.

Análise estatística

Seleção das covariáveis

Certas variáveis da população em estudo foram selecionadas e avaliadas de forma a comparar a homogeneidade das mesmas nos grupos de estudo, e ajustar para as diferenças nas mesmas na análise estatística, quando necessário.

As variáveis contínuas avaliadas foram a idade da dadora no dia da punção, o índice de massa corporal da dadora no dia da punção, o número de dias de estimulação ovárica da dadora até à punção, a dose de gonadotropinas, o número total de COCs recuperados na punção, a idade da recetora no dia da primeira transferência, o número de ciclos FIV/ICSI prévios da recetora, o número de oócitos desvitrificados, o número de oócitos viáveis, o número de oócitos que fertilizaram, o número de blastocistos utilizáveis e o número de sacos gestacionais.

As variáveis categóricas foram a origem da amostra de esperma (se era do cônjuge a fresco, do cônjuge congelada ou de dador) e o fator masculino (se não havia nenhuma alteração; se era leve sendo causada devido à motilidade - astenozoospermia, ou à concentração espermática inferior aos valores de referência no dia da ICSI - oligozoospermia; ou se era severo sendo causado devido à motilidade e à concentração espermática inferior aos valores de referência no dia da ICSI - oligoastenozoospermia).

As variáveis dicotômicas foram o dia de desenvolvimento embrionário na transferência (se estaria em dia 5 ou 6 de desenvolvimento embrionário), o número de embriões transferidos (1 ou 2), o resultado do teste da β -hCG (do inglês, Human Chorionic Gonadotropin) positivo (sim ou não), se a recetora teve uma gravidez clínica (sim ou não) e a taxa cumulativa de gravidez (sim, se a paciente teve pelo menos um parto de um recém-nascido vivo; não, se a paciente não teve parto e não possui mais embriões criopreservados com origem no ciclo de estudo; ou não avaliável, se a paciente tem uma gravidez em decurso, se ainda tem embriões criopreservados do ciclo de estudo ou se houve perda de seguimento do estado da paciente).

Variável independente

A variável independente do estudo é a taxa de sobrevivência à vitrificação/desvitrificação dos oócitos de dadora. Esta variável numérica discreta (0-100%) foi categorizada da seguinte forma: os ciclos das recetoras foram divididos em 5 grupos de acordo com a taxa de sobrevivência dos oócitos de dadora

[Valor de referência (≥ 95 -100%); Competência (≥ 85 -95%); Abaixo da competência (≥ 70 -85%); Baixa (≥ 50 -70%); Muito baixa ($< 50\%$)]. Estes grupos foram criados com base nos valores da reunião de consenso sobre KPI (do inglês, Key Performance Indicators) da criopreservação (Balaban et al. 2012). As variáveis foram comparadas entre os 5 grupos das taxas de sobrevivência dos oócitos das dadoras utilizando o teste do qui-quadrado para variáveis categóricas e dicotômicas, e as variáveis contínuas foram comparadas utilizando ANOVA.

Variáveis dependentes

Desfecho primário

O objetivo primário do estudo foi a taxa de blastocistos utilizáveis por zigoto, analisada em todos os 12690 ciclos.

Desfechos secundários

Os desfechos secundários do estudo foram a taxa de fertilização, a taxa de recém-nascido vivo na primeira transferência de um único blastocisto (SET-LBR, do inglês Single Embryo Transfer – Live Birth Rate) e a taxa cumulativa de recém-nascidos vivos (CLBR, do inglês Cumulative Live Birth Rate).

A taxa de fertilização por oócito MII é a proporção entre o número de oócitos maduros disponíveis para ICSI e a quantidade desses oócitos que apresentaram dois pronúcleos e dois corpos polares.

A SET-LBR, analisada em 10119 ciclos, é a proporção de quantos bebés nasceram provenientes da primeira transferência de um único blastocisto, sendo este o de melhor qualidade.

Na CLBR o numerador é o número de ciclos em que a recetora teve um recém-nascido vivo no momento da análise e o denominador é constituído por todos os ciclos de vitrificação/desvitrificação em que não foram obtidos embriões, em que todos os embriões foram utilizados sem que se tenha obtido uma gravidez, e ainda nos ciclos em que se registou uma gravidez em decurso. Os ciclos em que não se obteve um nado-vivo, mas em que ainda haviam embriões disponíveis, foram considerados não finalizados e foram excluídos da avaliação da CLBR. Para esta avaliação foram incluídos 8348 ciclos.

Hipótese nula

A hipótese nula do trabalho é que os resultados para o desfecho primário e os secundários seriam semelhantes em todos os grupos de sobrevivência à desvitrificação. Testámos se podemos rejeitar essa hipótese nula mediante uma análise univariada para avaliar se as proporções das variáveis dependentes eram diferentes entre grupos, com o teste qui-quadrado.

Adicionalmente, foi utilizado um modelo de regressão logística multivariado, incluindo as variáveis independentes e as covariáveis relevantes, obtendo-se o aOR (do inglês, Adjusted Odds-Ratio)

Foi ainda realizada uma subanálise em que o número de oócitos disponíveis para ICSI era entre 6 e 8 e foi emparelhado entre os diferentes grupos de sobrevivência para isolar o efeito de taxas de sobrevivência mais baixas na CLBR.

Todas as análises foram efetuadas na linguagem de programação R.

Resultados

Os oócitos vitrificados/desvitrificados utilizados nos 12690 ciclos analisados provêm de 10763 ciclos de doação, e foram efetuados em 11446 pacientes individuais (Tabela 1). A idade média das dadoras à data da punção ovárica foi de 23.8 (± 3.5) anos. As dadoras foram submetidas a uma média de 10.8 (± 1.5) dias de estimulação ovárica com 1897 (± 481) UI de FSH/Gonadotropinas. Foram recolhidos em média 25.7 (± 11.3) COCs nas punções das dadoras. Na maioria dos ciclos o sémen era do parceiro a fresco (66%) e havia fator masculino (Oligo ou Astenozoospermia) em 79.3% dos casos. A idade média das recetoras à data da ICSI foi de 41.6 (± 3.8). De 10119 ciclos com SET-LBR nasceram 4157 bebés, e de 8348 ciclos finalizados, 6348 casos tiveram um RNV (recém-nascido vivo).

Resultados laboratoriais

Uma média de 11.4 (± 3.2) oócitos foram desvitrificados para cada ciclo de recetora. Este número aumentou à medida que as taxas de sobrevivência diminuíram, com o mínimo pertencendo ao grupo de referência (10.5) e o máximo ao grupo de sobrevivência muito baixa (16.4). A taxa de sobrevivência total dos oócitos de dadoras vitrificados/desvitrificados foi de 89.1% ($n = 129093$) no momento da ICSI, dos quais 76.4% ($n = 98682$) fertilizaram com 2PN, e 47.5% ($n = 46906$) desenvolveram-se em blastocistos que foram transferidos ou criopreservados. As taxas de ciclos em

que não foi obtido nenhum blastocisto utilizável, com uma média de 8% na população total do estudo, foram maiores nos grupos com taxas de sobrevivência mais baixas.

Objetivo primário

Taxa de blastocistos utilizáveis

Houve diferenças significativas entre os grupos de sobrevivência em relação à taxa de chegada a blastocisto utilizável onde o grupo com sobrevivência de referência apresentou uma maior percentagem e as percentagens dos restantes grupos de sobrevivência foram cada vez menores: referência 48.9%; competência 47.0%; abaixo da competência 46.0%; baixa 43.6%; muito baixa 43.6%; $p < 0.001$).

Objetivos secundários

Taxa de fertilização

As taxas de fertilização por oócitos MII disponíveis para ICSI também apresentaram diferenças significativas entre os grupos de sobrevivência (Tabela 2), porém o grupo de competência apresentou uma média de oócitos fecundados superior à do grupo de referência (referência 8.0; competência 8.3, abaixo da competência 7.1; baixa 6.1; muito baixa 5.5; $p < 0.001$). Em termos de percentagens, foram superiores no grupo de referência e sempre cada vez menores, porém o grupo de muito baixa sobrevivência apresentou uma percentagem superior ao grupo de baixa sobrevivência (referência 76.8%; competência 76.6%, abaixo da competência 75.6%; baixo 74.7%; muito baixo 75.5%; $p < 0.001$).

Taxa de transferência de um único embrião por recém-nascido vivo (SET-LBR)

As taxas de recém-nascidos vivos após a primeira transferência de um único blastocisto (SET-LBR) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos de sobrevivência (Tabela 2). Já nos resultados da β -hCG, as diferenças entre os grupos foram significativamente diferentes, sendo menor no grupo de referência e maior no grupo de sobrevivência muito baixa (referência 57.2%; competência 63.2%; abaixo da competência 63.2%; baixa 63.1%; muito baixa 65.8%; $p < 0.001$). Também os casos com gravidez em decurso apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos,

sendo menor no grupo de referência e maior no grupo de sobrevivência muito baixa (referência 50.8%; competência 55.1%; abaixo da competência 55.5%; baixa 56.9%; muito baixa 59.2%; $p<0.001$). O aOR da SET-LBR não foi inferior ao grupo de referência nos grupos de sobrevivência mais baixa.

Taxa cumulativa de recém-nascidos vivos por ciclo de desvitrificação (CLBR)

Até à data da análise, 8348 ciclos já tinham sido finalizados (Tabela 2), o que corresponde a 65.8% da totalidade dos ciclos analisados. Caracteriza-se um ciclo como finalizado quando: i) não se obtiveram blastocistos utilizáveis, ii) quando a paciente utilizou todos os embriões e não obteve um RNV ou iii) quando obteve pelo menos um RNV. As percentagens de ciclos finalizados entre os grupos de sobrevivência foram aumentando, sendo menor no grupo de referência e maior no grupo de sobrevivência muito baixa (referência 64.0%; competência 65.0%; abaixo da competência 67.9%; baixa 72.7%; muito baixa 73.4%). Nasceram 6348 bebés de um total de 8348 ciclos finalizados, ou seja, em 76% dos ciclos obteve-se um RNV. As percentagens de RNV variaram entre os grupos de forma estatisticamente significativa, diminuindo ao longo dos grupos, sendo maior no grupo de referência e menor no grupo de sobrevivência muito baixa (referência 79.2%; competência 78.2%; abaixo da competência 72.1%; baixa 63.5%; muito baixa 63.0%; $p<0.001$).

Resultados clínicos

Realizaram-se 10119 primeiras transferências de um único blastocisto durante o período de estudo (Tabela 2) e dessas transferências, 60.4% das recetoras obtiveram uma β -hCG positiva, 54.0% obtiveram uma gravidez em decurso e 41.1% obtiveram um recém-nascido vivo.

As taxas de aborto espontâneo, que se calculam subtraindo os valores da gravidez em decurso pelo número de partos, não foram diferentes entre os grupos de sobrevivência, com uma média de 23.9% na população estudada.

Subanálise com igual número de MII disponíveis para ICSI

Foi efetuada uma subanálise a 2227 ciclos em que o número de oócitos MII disponíveis para ICSI após a desvitrificação era entre 6 e 8 (Tabela 3), para isolar o efeito da taxa de sobrevivência no resultado cumulativo. Destes, 1462 ciclos tinham sido finalizados e eram apropriados para a análise da CLBR.

Apesar de se ter normalizado o número de oócitos MII disponíveis para ICSI, observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os grupos de sobrevivência (referência 7.1 ± 1.0 ; competência 7.6 ± 0.8 ; abaixo da competência 7.6 ± 0.8 ; baixa 7.2 ± 1.0 ; muito baixa 7.0 ± 1.0 ; $p < 0.001$). Obteve-se um recém-nascido vivo em 966 dos casos, sendo as diferenças entre os grupos de sobrevivência estatisticamente significativas, com o grupo de sobrevivência de referência tendo a maior percentagem e o grupo de sobrevivência baixa com menor percentagem (referência 69.5%; competência 64.7%; abaixo da competência 67.5%; baixa 58.3%; muito baixa 60.0%; $p < 0.001$).

Como mostrado na Tabela 3, houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, com CLBR variando de 58.3% a 69.5%. O OR ajustado para CLBR foi inferior em praticamente todos os grupos de sobrevivência em comparação com a referência.

Tabela 1. Características base. SD (desvio padrão, do inglês, standard deviation).

		Categorias das Taxas de Sobrevivência					p-value	
		Referência (≥95-100%)	Competência (≥85-95%)	Abaixo da competência (≥70-85%)	Baixa (≥50-70%)	Muito baixa (<50%)		
Ciclos de Recetora	N casos (%)	5857 (46.2)	3365 (26.5)	2340 (18.4)	955 (7.5)	173 (1.4)	-	12690
Ciclos de Doação	N casos (%)	4813 (44.7)	2883 (26.8)	2027 (18.8)	856 (8.0)	184 (1.7)	-	10763
Idade da Dadora (anos)	Média (SD)	23.7 (3.5)	23.7 (3.5)	24 (3.51)	23.8 (3.4)	24.2 (3.5)	<0.001	23.8 (3.5)
Duração da Estimulação (dias)	Média (SD)	10.9 (1.5)	10.7 (1.5)	10.8 (1.5)	10.9 (1.5)	10.8 (1.7)	<0.001	10.8 (1.5)
Dose Total de FSH (IU)	Média (SD)	1897.4 (474.6)	1883.7 (480.9)	1911.1 (497.1)	1902.1 (468.0)	1921.7 (538.6)	<0.001	1896.9 (480.9)
Número de COCs	Média (SD)	25.4 (11.6)	26.0 (11.5)	25.7 (10.6)	25.6 (10.8)	27.0 (12.0)	<0.001	25.7 (11.3)
Sem Fator Masculino	N cases (%)	575 (10.2)	88 (2.7)	49 (2.2)	36 (3.9)	0 (0.0)	<0.001	748 (6.1)
Oligo ou Astenozoospermia	N cases (%)	4307 (76.2)	2650 (81.1)	1905 (83.6)	748 (80.1)	145 (86.8)		9755 (79.3)
Oligoastenozoospermia	N cases (%)	771 (13.6)	528 (16.2)	326 (14.3)	150 (16.1)	22 (13.2)		1797 (14.6)
Sémen do Conjuge a Fresco	N cases (%)	3834 (65.6)	2269 (67.6)	1482 (63.4)	657 (68.9)	112 (64.7)	<0.001	8354 (66.0)
Sémen do Conjuge Congelado	N cases (%)	1002 (17.2)	576 (17.2)	462 (19.8)	180 (18.9)	30 (17.3)		2250 (17.8)
Sémen de Dador	N cases (%)	1007 (17.2)	514 (15.3)	394 (16.9)	117 (12.3)	31 (17.9)		2063 (16.3)
Idade da Recetora (anos)	Média (SD)	41.7 (3.7)	41.5 (3.8)	41.7 (3.7)	41.5 (3.9)	42.0 (3.9)	<0.001	41.6 (3.8)
Oócitos Desvitrificados	Total	61405	40307	27908	12370	2842	<0.001	144832
	Média (SD)	10.5 (2.9)	12.0 (2.7)	11.9 (3.0)	13.0 (4.1)	16.4 (6.3)		11.4 (3.2)
Oócitos viáveis para ICSI	Total	61398 (47.6)	36561 (28.3)	22058 (17.1)	7812 (6.0)	1264 (1.0)	<0.001	129093 (89.1)
	Média (SD)	10.5 (2.9)	10.9 (2.5)	9.4 (2.4)	8.2 (2.5)	7.3 (2.6)		10.17 (2.81)

Tabela 2. Desfechos laboratoriais e clínicos. aOR (Razão de Probabilidades, do inglês, Adjusted Odds Ratio). IC (Intervalo de Confiança).

		Categorias das Taxas de Sobrevivência					p-value	
		Referência (≥95-100%)	Competência (≥85-95%)	Abaixo da Competência (≥70-85%)	Baixa (≥50-70%)	Muito baixa (<50%)		
Zigotos 2PN	Total (%)	47190 (76.8)	28010 (76.6)	16689 (75.6)	5839 (74.7)	954 (75.5)	<0.001	98682 (76.4)
	Média (SD)	8.0 (2.8)	8.3 (2.7)	7.1 (2.4)	6.1 (2.4)	5.5 (2.2)	<0.001	-
Blastocistos Utilizáveis	Total (%)	23068 (48.9)	13176 (47.0)	7701 (46.0)	2545 (43.6)	416 (43.6)	<0.001	46906 (47.5)
	Média (SD)	3.9 (2.4)	3.9 (2.4)	3.3 (2.1)	2.6 (1.9)	2.4 (1.7)	<0.001	3.7 (2.3)
Ciclos sem Blastocistos Utilizáveis	N casos (%)	348 (5.9)	252 (7.5)	243 (10.4)	145 (15.2)	30 (17.3)	<0.001	1018 (8.0)
Primeira Transferência de um Único Blastocisto (SET-LBR)	Total	4762	2702	1841	694	120	-	10119
	β-hCG Positiva (%)	2722 (57.2)	1707 (63.2)	1163 (63.2)	438 (63.1)	79 (65.8)	<0.001	6109 (60.4)
	Gravidez em Decurso (%)	2421 (50.8)	1490 (55.1)	1022 (55.5)	395 (56.9)	71 (59.2)	<0.001	5469 (54.0)
	Recém-nascidos vivos (%)	1946 (40.9)	1093 (40.5)	747 (40.6)	314 (45.2)	57 (47.5)	0.1015	4157 (41.1)
	OR Ajustado (IC:95%)	Referência	0.995 (0.971-1.018)	0.996 (0.970-1.023)	1.044 (1.003-1.086)	1.069 (0.976-1.170)	-	-
Taxa Cumulativa de Nado-Vivo	Total de ciclos finalizados (%)	3749 (64.0)	2188 (65.0)	1590 (67.9)	694 (72.7)	127 (73.4)	-	8348 (65.8)
	Total de casos com nado-vivo (%)	2968 (79.2)	1712 (78.2)	1147 (72.1)	441 (63.5)	80 (63.0)	<0.001	6348 (76.0)
	OR Ajustado (IC:95%)	Referência	0.981 (0.960-1.004)	0.959 (0.935-0.983)	0.908 (0.876-0.940)	0.913 (0.846-0.984)	-	-

Tabela 3. Subanálise.

		Categorias das Taxas de Sobrevivência					p-value		Total
		Referência (≥95-100%)	Competência (≥85-95%)	Abaixo da Competência (≥70-85%)	Baixa (≥50-70%)	Muito baixa (<50%)			
Número Total de Ciclos Analisados		925	542	359	324	77	-		2227
Total de Ciclos Finalizados (%)		632 (68.3)	329 (60.7)	228 (63.5)	223 (68.8)	50 (64.9)	0.026		1462 (65.2)
Oócitos MII disponíveis para ICSI (Média±SD)		7.1±1.0	7.6±0.8	7.6±0.8	7.2±1.0	7.0±1.0	<0.001		7.3
Ciclos com Recém- Nascido Vivo	N (%)	439 (69.5)	213 (64.7)	154 (67.5)	130 (58.3)	30 (60.0)	<0.001		966 (64.0)
	OR Ajustado (95%IC)	Referência	0.935 (0.875-0.998)	0.953 (0.820-0.949)	0.882 (0.820-0.949)	0.894 (0.778-1.027)	-		-

Discussão

O presente estudo é o primeiro a avaliar o impacto das taxas de sobrevivência de uma coorte de oócitos de dadoras à vitrificação/desvitrificação nos desfechos laboratoriais e clínicos, numa grande e recente base de dados. Tendo como base a pergunta, será que os oócitos do grupo de sobrevivência de referência são iguais aos dos grupos com sobrevivências inferiores, estudaram-se vários parâmetros, como a taxa de fecundação, a taxa de chegada a blastocisto, a taxa de recém-nascido vivo na primeira transferência de um único embrião e a taxa cumulativa de recém-nascido vivo.

Taxa de blastocistos utilizáveis

A taxa de blastocistos utilizáveis foi escolhida como objetivo primário porque é um indicador do desempenho do laboratório, uma vez que considera apenas os embriões que contribuem para as taxas cumulativas de recém-nascido vivo, isto é, os que são congelados ou transferidos (Hammond e Morbeck, 2019). Registaram-se diferenças estatisticamente significativas nas taxas de blastocistos utilizáveis, mas dentro de um intervalo muito restrito: de 43.6% no grupo de sobrevivência muito baixa para 48,9% no grupo de referência. Esta diferença entre o maior e o menor valor não é muito significativa laboratorialmente. Na nossa análise, não detetámos um comprometimento grave da competência dos oócitos em termos da sua capacidade de se tornarem blastocistos utilizáveis, com base nas taxas de sobrevivência da coorte, com resultados no intervalo de 40-50%, que é considerado de competência pelo consenso de Viena, que dita que há cerca de 30-40% de blastocistos GQ (do inglês, Good Quality) no dia 5 e mais 5 a 15% adicionais no dia 6 (ESHRE, 2017 e Zacà et al., 2022).

Taxa de fertilização

A taxa de fertilização por MII disponível para ICSI é um indicador da qualidade oocitária. Observaram-se maiores taxas de fertilização nos grupos de sobrevivência mais elevada, o que pode sugerir que oócitos onde havia maior sobrevivência teriam maior probabilidade de fecundar e, por outro lado, oócitos provenientes dos grupos com sobrevivência muito baixa teriam menor desempenho na fecundação.

Taxa de recém-nascido vivo da primeira transferência de um único embrião (SET-LBR)

Escolheu-se avaliar a taxa de recém-nascido vivo da primeira transferência de um único embrião, pois, como referido anteriormente, na Ginemed Lisboa os embriões são classificados por ordem de qualidade e o primeiro a ser transferido é o de melhor qualidade. Esperávamos observar menores taxas de RNV nos grupos com sobrevivências inferiores, o que não se verificou, pois não havia diferenças significativas entre os grupos. Assim sendo, à primeira transferência, os resultados são bastante positivos tendo em conta que, mesmo com taxas de sobrevivência menores, obtêm-se os mesmos desfechos clínicos. Ou seja, o melhor embrião da coorte pode ser igualmente competente, independentemente da sobrevivência da coorte oocitária da dadora de onde é proveniente.

Taxa cumulativa de recém-nascido vivo (CLBR)

A comparação da CLBR entre grupos de sobrevivência permitiu-nos avaliar o impacto das taxas de sobrevivência em toda a coorte de embriões gerados a partir de oócitos de dadoras vitrificados/desvitrificados (Zegers-Hochschild et al. 2017). Apesar de trabalharmos com um conjunto de dados muito recente, 65.8% dos ciclos analisados já estavam finalizados. A atualidade dos dados permite reduzir o número de potenciais fatores de confusão relacionados com a evolução das condições de cultura laboratorial e dos protocolos de preparação endometrial (Pataia et al. 2021, Santos-Ribeiro et al. 2023).

Observou-se que o grupo de referência apresentou uma maior percentagem de RNV, de 79.2% comparativamente aos restantes grupos, com o de sobrevivência muito baixa tendo 63.0%, pelo que não podemos aceitar a hipótese nula, uma vez que esta variável depende das taxas de sobrevivência. Ainda assim, estes resultados dos grupos com menor sobrevivência são muito satisfatórios, pois clinicamente poder assegurar aos pacientes que em cerca de 60% dos casos terá um filho é um ótimo resultado. Estes valores da taxa de RNV por ciclo finalizado podem advir também do facto de que quantos mais oócitos existem, melhor é a taxa cumulativa (Sunkara e Rittenberg, 2011).

Subanálise

Para isolar o impacto das diferentes taxas de sobrevivência do efeito da menor disponibilidade de oócitos, realizou-se uma subanálise normalizando para 6-8 oócitos MII disponíveis para ICSI, uma vez que a média dos oócitos disponíveis para ICSI do grupo de sobrevivência muito baixa foi de 7.31.

Utilizaram-se os ciclos entre os que tinham 6 e 8 oócitos viáveis para abranger um maior número de ciclos. Contrariamente ao esperado, o número de oócitos disponíveis para ICSI entre os grupos apresentou diferenças estatisticamente significativas, sendo o valor maior de 7.6 e o menor de 7.0. Ainda assim, esta diferença, na prática laboratorial, não é significativa.

Verificou-se que a diminuição das taxas de sobrevivência se correlacionou com a diminuição da CLBR, apontando para o facto da menor sobrevivência da coorte poder afetar os oócitos sobreviventes até certo ponto, quer esteja relacionada com uma menor qualidade dos oócitos ou com uma criopreservação subótima. Por outro lado, a gama de sucesso cumulativo foi elevada e satisfatória em todos os grupos de sobrevivência e a gama de valores observados pode ser considerada limitada do ponto de vista clínico, com percentagens entre os 58.3% e os 69.5%. Esta diferença de cerca de 10% entre os grupos de sobrevivência para a taxa de RNV, mesmo sendo estatisticamente significativa, na prática clínica não é assim tão relevante, o que significa que os resultados esperados de oócitos de dadora com menores taxas de sobrevivência também são promissores.

Limitações

Em termos de limitações, seria desejável um maior aprofundamento das características dos protocolos de estimulação das dadoras e de preparação endometrial das recetoras para controlar estes potenciais fatores de confusão. As características primárias das pacientes foram comparadas entre os grupos e ajustadas nos modelos de regressão logística para os diferentes resultados. A idade das recetoras influenciou negativamente o SET-LBR, bem como a CLBR, ao passo que a idade das dadoras não influenciou, tal como referido anteriormente noutros artigos (Rienzi et al. 2020 e Pataia et al. 2021). A utilização de sémen de dador também não mostrou influência nos resultados, o que já foi demonstrado ser relevante, mas apenas após um ciclo falhado anteriormente (Cozzolino et al. 2021). A duração da criopreservação não foi considerada uma fonte de potencial enviesamento, como foi recentemente demonstrado em oócitos e embriões (Torra-Massana et al. 2023, Canosa et al. 2022 e (Cimadomo et al. 2022). No nosso estudo, a indicação para tratamento da paciente não foi avaliada, mas, de forma tranquilizadora, não parece ser uma fonte importante de enviesamento nos tratamentos de doação de oócitos (Gupta et al. 2012). As evidências atuais apontam para a não inferioridade dos resultados laboratoriais e clínicos dos oócitos vitrificados/desvitrificados em comparação com os oócitos a fresco (Cornet-Bartolomé et al. 2020).

Conclusão

Segundo os nossos resultados, em ciclos de doação com taxas de sobrevivência mais baixas após a desvitrificação, os oócitos sobreviventes da coorte podem fertilizar, desenvolver-se até blastocisto e implantar-se com resultados semelhantes ou só ligeiramente inferiores quando comparados com os grupos de sobrevivência de referência, pelo que podemos dizer que os oócitos que sobrevivem são altamente competentes, ainda que outros da mesma coorte não tenham sobrevivido à vitrificação.

Em termos do sucesso cumulativo do tratamento, observamos um efeito negativo de menores taxas de sobrevivência: Em primeiro lugar, o total de oócitos disponíveis para ICSI é mais baixo, obtendo-se menos blastocistos, o que impacta as taxas cumulativas. Ainda na subanálise, em que normalizamos pelo número de oócitos disponível para ICSI, o resultado cumulativo é inferior, revelando um efeito negativo, ainda que limitado, das baixas taxas de sobrevivência na competência dos oócitos disponíveis.

Uma das soluções para as menores taxas de sucesso dos grupos com sobrevivências mais baixas, que passa pela diminuição da disponibilidade e competência de oócitos, pode ser atenuada através da desvitrificação de oócitos adicionais, caso estejam disponíveis. Em qualquer caso, estes resultados são muito tranquilizadores relativamente à eficácia da vitrificação de oócitos de dadoras, mesmo para os grupos de sobrevivência mais baixa.

Referências

- Amoushahi, M., Salehnia, M., & Mowla, S. J. (2017). Vitrification of Mouse MII Oocyte Decreases the Mitochondrial DNA Copy Number, TFAM Gene Expression and Mitochondrial Enzyme Activity. *Journal of Reproduction & Infertility*, 18(4), 343–351.
- Azari, M., Kafi, M., Ebrahimi, B., Fatehi, R., & Jamalzadeh, M. (2017). Oocyte maturation, embryo development and gene expression following two different methods of bovine cumulus-oocyte complexes vitrification. *Veterinary Research Communications*, 41(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s11259-016-9671-8>
- Balaban. (2012). The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: Proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*, 25(2), 146–167. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.05.006>
- Brinsden, P. R. (2021). The Evolution of the Assisted Reproduction Technologies. Em J. Donnez & S. S. Kim (Eds.), *Fertility Preservation: Principles and Practice* (2.^a ed., pp. 1–10). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/9781108784368.002>
- Canosa, S., Cimadomo, D., Conforti, A., Maggiulli, R., Giancani, A., Tallarita, A., Golia, F., Fabozzi, G., Vaiarelli, A., Gennarelli, G., Revelli, A., Bongioanni, F., Alviggi, C., Ubaldi, F. M., Rienzi, L., & SIERR. (2022). The effect of extended cryo-storage following vitrification on embryo competence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(4), 873–882. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02405-3>
- Cascante, S. D., Berkeley, A. S., Licciardi, F., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2023). Planned oocyte cryopreservation: The state of the ART. *Reproductive BioMedicine Online*, 47(6), 103367. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103367>
- Cimadomo, D., Fabozzi, G., Dovere, L., Maggiulli, R., Albricci, L., Innocenti, F., Soscia, D., Giancani, A., Vaiarelli, A., Guido, M., Ubaldi, F. M., & Rienzi, L. (2022). Clinical, obstetric and perinatal outcomes after vitrified-warmed euploid blastocyst transfer are independent of cryo-storage duration. *Reproductive Biomedicine Online*, 44(2), 221–227. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.09.027>
- Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida. (n.d.). *PMA em Portugal*. cidadãos. <https://www.cnpma.org.pt/cidadaos/Paginas/pma-em-portugal.aspx>

- Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida. (n.d.). *Técnicas de PMA*. cidadãos. <https://www.cnpma.org.pt/cidadaos/Paginas/tecnicas-de-pma.aspx>
- Cornet-Bartolomé, D., Rodriguez, A., García, D., Barragán, M., & Vassena, R. (2020). Efficiency and efficacy of vitrification in 35 654 sibling oocytes from donation cycles. *Human Reproduction*, 35(10), 2262–2271. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa178>
- Cozzolino, M., Hervás, I., Rivera-Egea, R., Pellicer, A., & Garrido, N. (2021). Do donor spermatozoa improve reproductive outcomes after oocyte donation failure? A retrospective analysis of cumulative live birth rates per donor oocyte consumed. *Reproductive Biomedicine Online*, 42(4), 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.01.004>
- Doação de ovócitos e espermatozoides. Sociedade Portuguesa de Medicina da Reprodução. (n.d.). <https://www.spmr.pt/perguntas>
- Doyle, J. O., Richter, K. S., Lim, J., Stillman, R. J., Graham, J. R., & Tucker, M. J. (2016). 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*, 105(2), 459-466.e2. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.026>
- Dunson, D. B., Colombo, B., & Baird, D. D. (2002). Changes with age in the level and duration of fertility in the menstrual cycle. *Human Reproduction*, 17(5), 1399–1403. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.5.1399>
- ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. Electronic address: coticchio.biogenesi@grupposandonato.it (2017). The Vienna consensus: report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reproductive biomedicine online*, 35(5), 494–510. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.015>
- Eskew, A. M., & Jungheim, E. S. (2017). A History of Developments to Improve in vitro Fertilization. *Missouri Medicine*, 114(3), 156–159.
- From vitro to vivo and back: Forty five years of IVF*. eClinicalMedicine. (2018, September). [https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370\(18\)30034-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/eclinm/article/PIIS2589-5370(18)30034-8/fulltext)

- Gallardo, M., Hebles, M., Migueles, B., Dorado, M., Aguilera, L., González, M., Piqueras, P., Montero, L., Sánchez-Martín, P., Sánchez-Martín, F., & Risco, R. (2016). Thermal and clinical performance of a closed device designed for human oocyte vitrification based on the optimization of the warming rate. *Cryobiology*, 73(1), 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.06.001>
- Gupta, P., Banker, M., Patel, P., & Joshi, B. (2012). A study of recipient related predictors of success in oocyte donation program. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 5(3), 252–257. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.106336>
- Gursu, T., Goksever Celik, H., Eraslan, A., Angun, B., Ozaltin, S., Yeh, J., & Bastu, E. (2022). Comparison of pregnancy outcomes of 7515 same donor oocyte cycle fresh and cryopreserved-thawed oocytes in 609 donor oocyte recipient cycles: A single institution analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 277, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2022.08.015>
- Hammond, & Morbeck. (2019). *Tracking quality: Can embryology key performance indicators be used to identify clinically relevant shifts in pregnancy rate?* | *Human Reproduction* | Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey349>
- O'Brien, Y. M., Ryan, M., Martyn, F., & Wingfield, M. B. (2017). A retrospective study of the effect of increasing age on success rates of assisted reproductive technology. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 138(1), 42–46. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12156>
- 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)
- Pataia, V., Nair, S., Wolska, M., Linara-Demakakou, E., Shah, T., Lamanna, G., Macklon, N., & Ahuja, K. K. (2021). Factors predicting clinical outcomes from 494 vitrified oocyte donation cycles at a UK-regulated egg bank. *Reproductive Biomedicine Online*, 43(3), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.05.015>
- Rádio e Televisão de Portugal (1986). *1º Bebé proveta nascido em Portugal*. RTP. <https://www.rtp.pt/programa/tv/p32763/e6>

- Relatório de Atividades CNPMA 2021. (2024, April). <https://www.cnpma.org.pt/cnpma/Documents/PlanosERelatoriosAnuaisDeAtividade/RELATÓRIO DE ATIVIDADES CNPMA 2021.pdf>
- Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Vaiarelli, A., Dusi, L., Buffo, L., Amendola, M. G., Colamaria, S., Giuliani, M., Bruno, G., Stoppa, M., & Ubaldi, F. M. (2020). Definition of a clinical strategy to enhance the efficacy, efficiency and safety of egg donation cycles with imported vitrified oocytes. *Human Reproduction*, 35(4), 785–795. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa009>
- Santos-Ribeiro, S., Godinho, C. M., & Reis-Soares, S. (2023). Nature (almost) always prevails—Challenging the status quo of artificial cycle frozen embryo transfers. *Reproductive Biomedicine Online*, 47(6), 103352. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103352>
- Sharma, R. S., Saxena, R., & Singh, R. (2018). Infertility & assisted reproduction: A historical & modern scientific perspective. *The Indian Journal of Medical Research*, 148(Suppl 1), S10–S14. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_636_18
- Sherman, J. K. (1964). Low temperature research on spermatozoa and eggs. *Cryobiology*, 1(2), 103–129. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(64\)90002-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(64)90002-1)
- Shirazi, A., Naderi, M. M., Hassanpour, H., Heidari, M., Borjian, S., Sarvari, A., & Akhondi, M. M. (2016). The effect of ovine oocyte vitrification on expression of subset of genes involved in epigenetic modifications during oocyte maturation and early embryo development. *Theriogenology*, 86(9), 2136–2146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.005>
- Smeenk, J., Wyns, C., De Geyter, C., Kupka, M., Bergh, C., Cuevas Saiz, I., De Neubourg, D., Rezabek, K., Tandler-Schneider, A., Rugescu, I., & Goossens, V. (2023). Art in Europe, 2019: Results generated from European registries by eshre. *Human Reproduction*, 38(12), 2321–2338. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead197>
- Solé, M., Santaló, J., Boada, M., Clua, E., Rodríguez, I., Martínez, F., Coroleu, B., Barri, P. N., & Veiga, A. (2013). How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(8), 2087–2092. <https://doi.org/10.1093/humrep/det242>

- Step toe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)*, 2(8085), 366. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)92957-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)92957-4)
- Sunkara, & Rittenberg. (2011). *Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles | Human Reproduction | Oxford Academic*. <https://academic.oup.com/humrep/article/26/7/1768/2913935>
- Torra-Massana, M., Miguel-Escalada, I., Vassena, R., & Rodríguez, A. (2023). Long-term storage of vitrified oocytes does not affect pregnancy and live birth rates: Analysis of 5362 oocyte donation cycles. *Reproductive BioMedicine Online*, 47(3). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.04.019>
- Trokoudes, K., Pavlides, C., & Zhang, X. (2011). *Comparison outcome of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program—PubMed*. Comparison outcomes of fresh and vitrified donor oocytes in an egg-sharing donation program. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21406304/>
- Trounson, A., & Mohr, L. (1983). Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305(5936), 707–709. <https://doi.org/10.1038/305707a0>
- Urquiza, M. F., Carretero, I., Cano Carabajal, P. R., Pasqualini, R. A., Felici, M. M., Pasqualini, R. S., & Quintans, C. J. (2014). Successful live birth from oocytes after more than 14 years of cryopreservation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(11), 1553–1555. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0318-9>
- World Health Organization. (2024, May 22). *Infertility*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>
- Zacà, C., Coticchio, G., Vigiliano, V., Lagalla, C., Nadalini, M., Tarozzi, N., & Borini, A. (2022). Fine-tuning IVF laboratory key performance indicators of the Vienna consensus according to female age. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(4), 945–952. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02468-2>
- Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., Mouzon, J. de, Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & Poel, S. van der. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>