

Influência de alguns fatores de prognóstico nos resultados obtidos após 567 ciclos de Fecundação In Vitro consecutivos

Influence of some prognostic factors on the obtained results after 567 consecutive In Vitro Fertilization cycles

Vicente López-Villaverde, Graça Pinto, Sonia Correia, Soraia Pinto, Teresinha Simões, Sandra Alves, Luciana Puzziello, Catarina Moreira, Gervasio Silva, Alberto Romeu

Centro de Procriação Medicamente Assistida. Maternidade Alfredo da Costa. Lisboa. Portugal

Resumen

Objectivos: *Avaliar os resultados obtidos em 567 ciclos de FIV consecutivos e o valor prognóstico de determinadas variáveis.*

Desenho. *Estudo retrospectivo*

Âmbito: *Maternidade Dr. Alfredo da Costa. Hospital público universitário*

População: *Amostra não seleccionada correspondente a 567 ciclos de FIV iniciados de forma consecutiva.*

Intervenções: *Estimulação ovárica, punção folicular, FIV clássica ou ICSI, transferência embrionária e diagnóstico de gravidez.*

Variáveis principais: *Taxas de cancelamento, fecundação, gravidez e aborto.*

Resultados: *Dias de estimulação: 10,85±2,52. Dose total de FSH administrada: 2242±1017 UI. Nível de estradiol circulante no dia da hCG 1866±803 pg/ml. FIV clássica em 22,68% dos ciclos. ICSI em 72,3%. Ambas as técnicas em 3,53%. Taxa de cancelamento: 5,11%. Falhas de fecundação: 6 em FIV clássica, 30 em ICSI e 1 em TESE. Transferência de 1 embrião em 15,4% dos ciclos, de dois embriões em 69,7% e de 3 em 0,6%). Casos sem transferência: 14,3%: 62 por falta de embriões e 15 por adiamento por problemas uterinos ou por risco de hiperestimulação.*

Taxa de gravidez clínica: *24,9% por ciclo iniciado, 26,22% por punção e 30,59% por transferência. Taxa de aborto: 7,8% das gravidezes clínicas (em outros 3 casos a gravidez foi ectópica).*

Apoios: nenhum específico

Correspondencia: Dr. D.Vicente Lopez-Villaverde
Centro de Procriação Medicamente Assistida
Maternidade Alfredo da Costa
Rua Viriato
Lisboa. Portugal

Idade da mulher, nível circulante de FSH, IMC da mulher, número de ciclo de FIV e número de folículos antrais basais não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos considerados.

Tanto dispor de um número de ovócitos superior a 4 como o facto de criopreservar embriões permite obter taxas de gravidez significativamente maiores e, em consequência, podem considerar-se variáveis de bom prognóstico.

Conclusões: Ainda que a experiência geral apoie o valor prognóstico de distintos parâmetros na FIV (clássica ou ICSI), este valor não se confirma na análise de amostras reduzidas de ciclos.

Palabras clave: Fecundación in vitro. FIV. Microinyección espermática. ICSI. Resultado. Factores pronóstico.

Summary

Objectives: To consider the results after 567 consecutive IVF cycles and the predictive value of certain variables.

Design. Retrospective study

Setting: Maternity Alfredo da Costa. University public hospital

Patients. Unselected population corresponding to 567 consecutive IVF cycles.

Interventions. Ovarian stimulation, follicular transvaginal aspiration, classical IVF or ICSI, embryo transfer and diagnostic of pregnancy.

Primary end-points. Rates of cancellation, fertilization, pregnancy and abortion

Results. Days of stimulation: 10.85±2.52. Total dose of FSH administered: 2242±1017 UI. Level of circulating estradiol in the day of hCG 1866±803 pg/ml. Classical IVF in 22.68% of cycles; ICSI in 72.3%; both techniques in 3.53%. Rate of cancellation: 5.11%. Fertilization failure: 6 in classical IVF, 30 in ICSI and 1 in TESE. Transfer of 1 embryo in 15.4% of cycles, of two embryos in 69.7%, and of 3 in 0.6%. Cases without transfer: 14.3%; lack of embryos for transfer in 62 cycles and the transfer being delayed due either to uterine problems or risk of hyperstimulation in 15 cycles.

Clinical pregnancy rate: 24.9% per initiated cycle, 26.22% per aspiration and 30.59% per transfer. Abortion rate: 7.8% of the clinical pregnancies (in other 3 cases an ectopic pregnancy was observed).

Age and BMI of the woman, circulating levels of FSH, IVF previous attempts and number of antral follicles on cycle day 3 did not show statistically significant differences between the groups considered.

As well harvesting more than 4 oocytes as cryopreserving embryos are associated to significantly higher pregnancy rates and, as a consequence, can be considered parameters of good prognosis.

Conclusions. Although the general experience supports the predictive value of different parameters in IVF (classical or ICSI), this value is not always confirmed in the analysis of reduced number of cycles.

Key words: In Vitro Fertilization. IVF. Intracytoplasmic sperm injection. ICSI. Results. Prognostic factors.

INTRODUÇÃO

Entre os meses de maio 2009 e junho 2010, foram iniciadas 567 estimulações ováricas em 457 mulheres, com o fim de realizar uma fecundação in vitro (FIV). Entre estas mulheres, 95 foram estimuladas em duas ocasiões e 7 em três.

Ao longo dos anos, numerosos aspectos clínicos e biológicos foram considerados como fatores prognós-

tico mais ou menos relevantes para os resultados da FIV: idade da mulher, reserva ovarica, número e qualidade dos embriões obtidos, etc.

Por outro lado, só a análise dos resultados de um determinado programa pode permitir melhorar os protocolos de atuação e, portanto, a sua eficácia e eficiência.

O objetivo do presente estudo foi analisar as características clínicas dos casais tratados e avaliar a

possível influência de diferentes fatores de prognóstico (idade, IMC, protocolo de tratamento, número de ovócitos obtidos, etc) sobre o resultado da estimulação e o resultado final do tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

A descrição que se segue representa a metodologia habitual. Não obstante, deve assinalar-se que, mesmo hoje, existem limitações muito severas para a prática de punções em fins-de-semana e feriados e que, ao longo do tempo do estudo, foram introduzidas mudanças metodológicas, como a ecografia basal, a transferência embrionária ecoguiada, etc. Sem dúvida, esta circunstância obriga a violações do protocolo e modifica de forma relevante os resultados, condicionando o número de casos disponíveis em alguns dos parâmetros analisados.

Pacientes

As características das pacientes incluídas no estudo estão dispostas na tabela 1 e o seu diagnóstico principal na tabela 2. Em 59 dos casos foram detectadas outras patologias que poderiam estar relacionadas com a infertilidade ou modificar o prognóstico. Entre as mais relevantes estão: 11 casos de ooforectomia, salpingectomia ou anexectomia prévia por endometriose ou doença inflamatória pélvica; 6 casos de mioma uterino; 5 casos de malformação uterina; 2 casos de adenomiose e 7 casos em que se associavam obstrução tubária e endometriose.

O diagnóstico dos homens, em função da amostra de sêmen utilizada no estudo diagnóstico do casal, está exposto na tabela 3.

Em 36,5% dos casos (207 casos), as pacientes tinham sido estimuladas, entre 1 e 4 vezes, para a realização de uma FIV noutros centros, sem resultado. Em 62,2% dos casos tratou-se da primeira tentativa no nosso centro, em 20% da segunda, em 5% da terceira e em 1,9% da quarta tentativa. Estas últimas por cancelamento de um ciclo prévio. No que respeita ao número de gravidezes anteriores, 69,6% das mulheres eram nuligestas; 18,3% de mulheres tinham engravidado entre 1 e 4 vezes e em 12% não consta este dado.

Início da estimulação

A administração de gonadotrofinas iniciou-se no 2º ou 3º dia do ciclo, após a determinação do nível de FSH (nos ciclos em que se utilizou um antagonista da

Tabela 1

Idade, IMC, anos de infertilidade, nível de FSH basal e número de folículos antrais basais das mulheres e idade dos seus casais no momento de iniciar o tratamento

	Min	Max	X	DT
Idade (n= 567)	21	39	33,9	3,36
IMC (n= 514)	15,78	42,44	24,32	4,15
Anos Infertilidade (n= 559)	1	17	6,18	2,62
FSHb (n=561)	1,5	27	7,2	2,48
Folículos antrais (n= 314)	3	50	12,2	6,5
Idade homens (n= 517)	21	54	36,16	4,9

(Min: mínimo, max: máximo; X: meia; DT: desvio típica; IMC: índice de massa corporal)

Tabela 2

Diagnóstico principal das mulheres nos ciclos considerados

	N	%
Função reprodutora normal	306	54
Obstrução tubária	162	28,6
Endometriosis	49	8,6
Fator uterino (inclui mioma)	23	4
Anovulação	21	3,7
Fator peritoneal	4	0,7
No consta	2	0,4
Total	567	100

Tabela 3

Diagnóstico estabelecido a partir de a mostra seminal utilizada para o estudo diagnóstico básico

	N	%
Semen normal	180	31,7
Astenozoospermia	20	3,5
Asteneratozoospermia	93	16,4
Oligoasteneratozoospermia	101	17,8
Oligozoospermia	2	0,4
Oligoastenozoospermia	1	0,2
Oligoteratozoospermia	15	2,6
Teratozoospermia	124	21,9
Azoospermia	25	4,4
No consta	6	1,1
Total	567	100

GnRH para o bloqueio hipofisário) e a realização de uma ecografia. Nos ciclos em que a função gonadotrófica foi bloqueada mediante a administração de um agonista da GnRH em protocolo longo, considerou-se a última determinação de FSH, que pode ter sido efectuada meses antes.

Não se iniciou a estimulação nos casos em que o nível circulante de FSH foi superior a 15 UI/L, salvo se fossem contabilizados 5 ou mais folículos antrais

na ecografia basal, o que se verificou em 7 dos ciclos deste estudo. Em seis deles utilizou-se um antagonista e no restante um agonista.

O número de folículos antrais observado na ecografia basal foi registado em 314 ciclos, tendo oscilado entre 3 e 50. A distribuição foi efectuada como se segue: em 42 dos ciclos (7,4%) foram contabilizados 3 a 6 folículos antrais, em 170 ciclos (30%) 7 a 13, em 60 ciclos (16,6%) 14 a 18 e nos restantes 42 (7,4%) mais de 18.

Estimulação

Em todos os ciclos iniciados a estimulação do desenvolvimento e amadurecimento foliculares foi realizada com gonadotrofinas e sempre sob bloqueio gonadotrófico hipofisário.

O bloqueio gonadotrófico fez-se mediante a administração de agonistas da GnRH (Decapeptyl 0,1mg diário; IPSEN) em protocolo longo (373 casos; 65,8%) ou mediante a administração de um antagonista da GnRH (Orgalutran, MSD) na dose de 0,25 mg/dia, em protocolo fixo, a partir do dia 6 da estimulação (194 ciclos; 34,2%).

A estimulação utilizou FSH recombinante (FSHr; Gonal Merk ou Puregon, MSD) em 544 ciclos (85,94%), FSHr associada a hMGhp (Menopur, Lab. Ferring) ou LH recombinante (LHr; Luveris, Lab. Merck) em 13 ciclos (2,29%) e com hMGhp em 10 ciclos (1,76%).

A dose inicial de gonadotrofinas oscilou entre 100 e 450 UI de FSH (204±58 UI), com ou sem atividade LH associada. A escolha da dose realizou-se em função dos níveis circulantes de FSH determinados no próprio ciclo (quando o bloqueio hipofisário se realizou com antagonistas da GnRH) ou considerando a determinação mais recente e em função da contagem de folículos antrais na ecografia basal (dia 2-3 do ciclo), quando disponível. Quando possível foram tidas em conta as respostas a estimulações prévias.

A resposta às gonadotrofinas foi monitorizada mediante determinações de estradiol no sangue periférico e ecografias seriadas; ambas as explorações foram realizadas sempre no mesmo dia. O número de controlos necessários até ao dia da hCG, incluído o basal, foi 4,74±1,44.

A dose inicial foi mantida em 278 casos (49,03%) e teve que ser modificada em 242 ciclos (42,68%); em 47 casos (8,29%) esta informação não estava disponível. Em 87 casos foi necessário aumentar a dose e em 155 teve que ser diminuída.

Em 44 dos ciclos iniciados (7,76%) a administração de hCG teve que ser adiada (*coasting*) devido a

níveis circulantes de estradiol elevados, o que se estimou um risco. A duração do *coasting* foi de 1 dia em 31 casos, de 2 dias em 8 casos, de 3 dias em 2 casos e de 5 dias em 3 casos.

Administração de hCG

A administração de hCG foi proposta quando na ecografia de controlo foram observados pelo menos 3 folículos com um diâmetro médio de 17 ou mais milímetros, excepto quando os níveis circulantes de estradiol nesse mesmo dia fossem inferiores a 500 pg/ml; nestes casos continuou-se a estimulação até superar este valor.

A estimulação foi cancelada quando não se observou uma resposta suficiente às gonadotrofinas (pelo menos 3 folículos), quando se considerou a existência de risco de hiperestimulação nos ciclos com agonista da GnRH (nos ciclos com antagonista induziu-se o amadurecimento final com um agonista e criopreservaram-se os embriões), quando surgiu alguma intercorrência e perante violações irreparáveis do protocolo de tratamento.

É necessário assinalar que, excepcionalmente, o nível circulante de estradiol não esteve disponível no momento de indicar a administração de hCG.

Nos ciclos não cancelados foram administrados 250 µg de hCG recombinante (Ovitrelle, Lab Merck) por via subcutânea.

Punção folicular

A punção folicular foi programada 36 horas depois da administração de hCG, sendo efectuada por via vaginal com controlo ecográfico, sob sedoanalgesia e em condições de rigorosa assépsia.

Sistematicamente foram puncionados e aspirados todos os folículos visíveis de ambos ovários, com diâmetro superior a 14 milímetros.

No fim da punção foi feita revisão da vagina para comprovar que não existiam pontos sangrantes e efectuou-se uma ecografia para avaliar a quantidade de líquido acumulada no fundo-de-saco de Douglas.

Da sala de punções, as pacientes passaram para a sala de recobro, onde permaneceram numa cama, com monitorização constante, durante 45 minutos. No fim deste período, passaram para um cadeirão na mesma sala, onde permaneceram outros 45 minutos, tendo sido avaliada a tolerância digestiva. No caso de complicações ficaram em observação no serviço de internamento de Ginecologia.

Uma vez abandonada a sala de recuperação, foi efectuada avaliação clínica e nova exploração ecográfica, antes da alta do Centro.

O líquido folicular é encaminhado para o laboratório para pesquisa e identificação dos Complexo Oócito-Cumulus (COC). Estes são lavados em meio de lavagem (Gamete Buffer, COOK) e classificados pelo seu estágio de maturação. São colocados na incubadora em meio de fertilização (Fertilization Medium, COOK) até ao momento de inseminação, em FIV, ou da desnudação, em ICSI.

Preparação seminal

No dia da punção o esperma é recolhido e, após liquefacção, são avaliados os seguintes parâmetros seminais: volume, concentração e mobilidade. Relativamente à morfologia espermática são considerados os valores obtidos nos espermogramas realizados anteriormente, excepto em casos de dúvida em que para a decisão do tipo de técnica a utilizar (FIV ou ICSI) é quantificado o número de espermatozoides normais na amostra.

Depois de avaliado, o esperma é processado recorrendo a um gradiente duplo (Sperm Gradient, COOK), uma lavagem (Gamete Buffer, COOK) e colocado na incubadora para migrar (swim-up) em meio de lavagem no caso de ICSI ou em meio de fertilização (Fertilization Medium, COOK) no caso de FIV. O swim-up é retirado 30-60 minutos depois e é determinada a concentração total de espermatozoides móveis.

FIV

Os COCs são inseminados com uma concentração pré-calculada de espermatozoides móveis de modo a obter uma concentração final de 50-100.000/ml. Os COCs são colocados em grupos de 2 ou 3 por gota de 0.1ml de meio de fertilização (Fertilization Medium, COOK).

ICSI

Duas a quatro horas após a punção os oócitos são desnudados por meio mecânico e enzimático (Hyaluronidase, COOK) e permanecem mais 30-60 minutos na incubadora até ao momento da micro-injecção. Após a micro-injecção os oócitos são colocados individualmente em gotas de 0.025ml de meio de clivagem (Cleavage Medium, COOK).

Desenvolvimento Embrionário

A avaliação da fertilização é realizada 15-19h após inseminação. Os oócitos correctamente fertilizados são transferidos individualmente para gotas de 0.025ml de meio de clivagem (Cleavage medium,

COOK) sob óleo (Culture Oil, Cook). Na classificação são considerados os seguintes parâmetros: número de pronúcleos, alinhamento e quantidade de nucléolos, presença de halo, alterações citoplasmáticas e anormalidades da zona pelúcida.

Cerca de 24 horas após a avaliação da fertilização, os embriões são classificados. Para a classificação embrionária são avaliados os seguintes parâmetros: número de blastómeros, simetria, percentagem de fragmentos, presença de núcleos, alterações citoplasmáticas e alterações da zona pelúcida (1).

Transferência embrionária

A transferência é realizada entre o segundo e o quinto dia após inseminação. Antes da transferência os embriões são classificados. A decisão do número de embriões a transferir é tomada em equipa e está dependente de: qualidade embrionária, idade da mulher, condição geral da mulher e o desejo do casal. Os melhores embriões são seleccionados para transferência tendo em consideração que a avaliação é um processo contínuo, logo, são consideradas as avaliações embrionárias diárias anteriormente e não apenas a avaliação realizada no dia da transferência (2).

Depois de seleccionados, os embriões a serem transferidos são colocados em meio de clivagem (Cleavage Medium, COOK). O catéter a utilizar é definido pelo médico que realiza a transferência.

Os restantes embriões se apresentarem critérios de qualidade são criopreservados (Cryopreservation Kit, COOK) caso contrário são descartados.

A transferência é realizada numa das salas do bloco, junto ao recobro, em condições de asepsia, e pode ser ou não ecoguiada, em dependência do critério do ginecologista.

Fase lutea

Durante a fase lutea não se tomam medidas especiais, salvo a indicação para aplicação de progesterona vaginal na dose de 300 mg/día e para a toma de ácido fólico na dose de 5 mg/día.

Diagnóstico de gravidez

Quatorze dias depois da punção foi efectuada uma determinação de β hCG no sangue periférico e quando esta foi positiva e teve uma evolução adequada (duplicação do valor em 48 horas) considerou-se a existência de uma gravidez bioquímica, sendo agendada a realização de uma ecografia cerca de 4 a 5 se-

manas após a punção, com o fim de confirmar a presença de um ou mais embriões vivos e a localização dos mesmos. Quando a gravidez foi confirmada ecograficamente, considerou-se que estávamos perante uma gestação clínica.

RESULTADOS

Dos 567 ciclos iniciados, 29 (5,11%) foram cancelados: 1 (0,18%) foi cancelado pela identificação de um volumoso quisto do ovário na ecografia basal, 25 (4,41%) por baixa resposta e os 3 restantes (0,53%) por resposta ovárica excessiva com risco de síndrome de hiperestimulação ovárica. Em 5 dos 25 ciclos cancelados por resposta ovárica insuficiente foi realizada uma inseminação intra-uterina (IIU) já que as mulheres tinham apresentado trompas normais na histerossalpingografia diagnóstica. O resultado destas inseminações, em termos de gravidez, é considerado aqui como negativo.

Em consequência, foram efetuadas 538 punções foliculares. Os dias de estimulação e a dose total de FSH administrada nos ciclos não cancelados foram $10,85 \pm 2,52$ dias e 2242 ± 1017 UI, respectivamente. O nível de estradiol circulante no dia em que foi administrada hCG foi 1866 ± 803 pg/ml (variação: 275-5067).

Em seis dos ciclos (1,12%) não foram obtidos ovócitos na punção. A distribuição dos restantes ciclos em função do resultado das punções realizadas, em termos de complexos ovócito-cúmulo e de ovócitos em estágio metafase II (MII), está registada no Tabla 4; os dados relativos aos ovócitos M II só foram recolhidos nos ciclos em que se praticou uma ICSI.

Uma FIV clássica foi realizada em 122 dos ciclos (22,68%) e a ICSI em 389 ciclos (72,3%), 19 dos quais com espermatozoides descongelados procedentes de testículo (3,53%). Em 19 dos ciclos (3,53%) utilizaram-se ambas as técnicas, FIV clássica e ICSI, devido às características limite da amostra seminal.

A taxa de fecundação registada para cada uma das técnicas está descrita no Tabla 5. Verificou-se uma falha total de fecundação em 37 casos (6,95%). Deles, 6 em FIV (4,91%), 30 em ICSI (8,11%), 1 em ICSI com espermatozoides testiculares (5,26%) e nenhum quando foram utilizadas ambas técnicas.

A conduta habitual na UMR de MAC é transferir um máximo de 2 embriões, com o fim de minimizar o risco de gravidez múltipla. Em consequência, sempre que se dispõe de mais de dois embriões viáveis, são transferidos os dois considerados de melhor qualidade biológica, em função de suas características crono-

biológicas (transferência seletiva), e criopreservam-se os restantes. Não se realizam transferências seletivas de um só embrião. Na série analisada foi transferido um embrião em 83 ciclos (15,4%), foram transferidos 2 em 375 ciclos (69,7%) e 3 em 3 casos (0,6%). Em 77 ciclos (14,3%) não houve transferência por inexistência de embriões (62 ciclos) ou por indicação para diferir a transferência: 1 caso de adenomiose, 1 caso de hemorragia post-punção e 13 casos de risco de hiperestimulação.

A determinação de β hCG resultou positiva em 25,98% dos ciclos iniciados, em 28,44% das punções praticadas e em 33,19% dos ciclos com transferência (tabla 6).

A presença ecográfica de pelo menos um embrião viável foi estabelecida em 131 dos casos na semana 6-7; em outros 10 casos a gravidez clínica foi confirmada telefonicamente. Pode, em consequência, confirmar-se uma taxa de gestação clínica de 24,9% dos 567 ciclos iniciados, de 26,21% das punções e de 30,59% das transferências (tabla 6). Observou-se a presença de um embrião com batimentos cardíacos em 107 casos (18,9%; 75,89% das gravidezes) e de dois embriões em 24 casos (4,2%; 17,02% das gravidezes); nos 10 casos restantes (1,8%; 7,09% das gestações) não existem dados ecográficos mas sim informação clínica de que a gestação segue o seu curso.

Confirmada ecograficamente a gestação, verificou-se aborto em 11 casos e em outros 3 a gravidez foi ectópica (2,13% das gravidezes clínicas). Em consequência, a taxa de gestação evolutiva foi de 22,4% por ciclo iniciado, de 23,6% por punção e de 27,54% por transferência (tabla 6).

Taxas de gravidez e aborto em função da idade da mulher

A totalidade dos ciclos foi dividida em função de grupos de idade das mulheres: 20 a 30 anos, 30,1 a 36 anos e mais de 36 anos. As taxas de gravidez e aborto em função destes grupos de idade da mulher refletem-se no tabla 7. Ao comparar estas taxas não se observaram diferenças significativas entre os diferentes grupos.

Taxa de gestação em função do nível circulante de FSH

Os níveis circulantes de FSH foram estratificados como se segue: < 8,5 UI/L; 8,6 a 10 UI/L; 10,1 a 15 UI/L e > 15 UI/L. As taxas de gravidez em função

Tabela 4

Distribuição das punções, em função do número e percentagem dos complexos ovócito-cumulus (COC) e ovócitos metafase II (M II) obtidos nas mesmas. (*Dado não disponível em 7 punções; ** Dado não disponível em 8 punções)

N CO-C / M II	Punções (n*)	Punções (%)	Punções (n**)	Punções (%)
1-3	82	15,4	114	28,5
4-6	145	27,3	126	31,5
7-10	163	30,7	119	29,8
11-15	105	19,8	-	-
>10	-	-	41	10,2
>15	36	6,8	-	-
Total	531	100	400	100

Tabela 5

Distribuição dos ciclos em função da técnica de PMA utilizada e da taxa de fecundação observada. (Dados não disponíveis em 10 das punções)

	0	1-25	25,1-75	75,1-100	Total
FIV	6	4	51	60	121
ICSI	30	16	193	130	369
TESE	1	4	11	3	19
Misto	0	3	10	6	19
Total	37	27	265	199	528

Tabela 6

Taxas de gravidez (%) bioquímica (β hCG +), clínica (latido embrionário +) e evolutiva consideradas em função dos ciclos iniciados e as punções e transferências embrionárias realizadas

	Por Ciclo iniciado (n= 567)	Por Punção (n=538)	Por Transferência (n= 461)
Gravidez Bioquímica	25,98	28,44	33,19
Gravidez Clínica	24,86	26,21	30,59
Gravidez Evolutiva	22,39	23,60	27,54

destes níveis estão registadas no tabla 8. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas.

Taxas de gravidez em função do IMC da mulher

Os ciclos em que se conhecia o IMC (512) foram classificados em diferentes grupos: 1 -IMC menor de 20; 2 - IMC 20,1 a 25; 3 - IMC 25,1 a 30; 4 - IMC maior de 30. As taxas de gravidez bioquímica e de gravidez ecográfica em função do IMC reflectem-se no tabela 8. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas.

Taxas de gravidez em função do número de ciclo

Como norma habitual, na MAC, quando não se consegue gravidez, são realizadas 3 tentativas por paciente, entendendo-se por tentativa um tratamento

completo. Na série considerada, em 395 ciclos tratava-se da primeira tentativa, em 127 ciclos foi a segunda, em 32 a terceira e em 12 ciclos foi a quarta.

As taxas de gravidez, bioquímica e ecográfica, em função do número de ciclo estão registadas na Tabela VIII. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos.

Taxas de gravidez em função do número de folículos antrais

O número de folículos antrais presentes na ecografia basal foi registado em 314 ciclos. Entre os ciclos em que o dado estava disponível, as taxas de gravidez bioquímica e clínica por ciclo iniciado, em função do número destes folículos, encontram-se na Tabela 8. As diferenças existentes entre os grupos considerados não alcançaram significado estatístico.

Tabela 7*Taxas de gravidez (bioquímica e clínica) e aborto, em função da idade das mulheres*

Idade (años)	Gravidez bioquímica (%)	Gravidez clínica (%)	Aborto (%)
20 a 30	27,27	22,68	13,6
30,1 a 36	25,87	23,44	8,33
36,1 a 40	29,03	24,18	5,4

Tabela 8*Taxas de gravidez em função do nível circulante basal de FSH, do Índice de Massa Corporal (IMC), do número de ciclo e da criopreservação ou não de embriões. (*p<0,001)*

FSH	Gravidez Bioquímica (%)	N	Gravidez Clínica (%)	N
<8,5	28,30	424	24,58	415
8,6 - 10	21,69	83	18,07	83
10,1 - 15	30,43	46	28,89	45
>15	0	7	-	-
IMC				
<20	29,51	61	25,00	60
20,1 - 25	25,87	259	23,04	256
25,1 - 30	29,23	130	25,2	127
>30	18,18	55	14,81	54
Nº de ciclo				
1º	26,84	395	23,04	387
2º	28,35	127	24,00	125
3º	31,25	32	31,25	32
4º	8,33	12	0	32
Nº de Folículos antrais				
<5	20,83	24	20,83	24
5 - 15	33,33	219	30,05	213
16 - 25	45,76	59	32,73	55
>25	16,70	12	16,70	12
Criopreservação				
No	22,07	367	18,80	362
Sí	43,75*	160	38,71*	155

Taxas de gestação em função do número de ovócitos e ovócitos M II obtidos na punção

Os dados do número de complexos ovócito-cúmulus estavam disponíveis em 537 dos 538 ciclos em que a punção foi realizada. Em 6 dos ciclos não se obteve qualquer ovócito. As taxas de gravidez por punção (bioquímica e clínica), em função do número de complexos ovócito-corona-cúmulos obtidos, expõem-se na Tabela 9. As diferenças entre os grupos avaliados alcançaram significado estatístico, tanto para as gravidezes bioquímicas ($p=0.002$), como para as gravidezes clínicas ($p=0.003$).

Os dados sobre o número de ovócitos M II obtidos na punção só foram registados nos ciclos em que foi praticada uma ICSI, tanto de forma isolada como nos ciclos em que os ovócitos obtidos foram repartidos

entre FIV clássica e ICSI. Isso supõe um total de 416 ciclos, mesmo que em dois deles não se disponha deste dado. Em 5 dos ciclos foram obtidos ovócitos mas nenhum estava em MII.

As taxas de gravidez bioquímica e clínica em função do número de ovócitos M II obtidos na punção podem observar-se na Tabela 9. As diferenças observadas alcançaram significado estatístico, tanto para as gravidezes bioquímicas ($p=0.002$), como para as clínicas ($p=0.003$).

Taxas de gravidez em função da criopreservação ou não de embriões

A conduta habitual na MAC é criopreservar os embriões viáveis que restam depois da transferência. Na série de casos considerada foram criopreservados embriões em 160 dos ciclos.

As taxas de gravidez bioquímica e ecográfica reflectem-se na Tabela 9. A diferença entre os ciclos em que foram criopreservados embriões e aqueles em que não foram foi altamente significativa.

DISCUSSÃO

Diferentes parâmetros, biométricos, clínicos ou de Laboratório foram propostos como fatores predictivos da gravidez após FIV (3).

Clássicamente, a idade da mulher foi considerada um importante fator prognóstico do resultado da FIV (4-6), sendo tanto menor a taxa de gravidez observada quanto maior é a idade da mulher no momento do tratamento. De facto, está comprovado que a capacidade para conceber, na ausência de alterações do sistema reprodutor, diminui com a idade (7).

Admite-se que o fator uterino desempenha um papel secundário, se desempenha algum, no declive da possibilidade de gravidez relacionada com a idade (8, 9) e considera-se que a influência da idade se deve a fatores ováricos relacionados com a diminuição da reserva ovárica (10) e embrionários (11), como a aneuploidia, cuja frequência aumenta com a idade materna (12). De facto, quando mulheres de idade avançada recebem na transferência embriões obtidos a partir de mulheres jovens, as taxas de gestação são similares às das mulheres jovens (13).

No entanto, na série aqui analisada, não se confirmaram estas diferenças, talvez porque o número de casos é pequeno ou por outros fatores (bloqueio hipofisário, protocolo de estimulação, etc.) que deverão ser analisados. De qualquer forma, os achados do presente estudo asseguram a decisão de atender, nos sis-

temas públicos de saúde, mulheres de até 40 anos, porque as taxas de gravidez observadas até esta idade são aceitáveis e não supõem uma diminuição excessiva na eficiência dos programas.

À medida que, com a idade, diminui a reserva ovárica, produz-se um aumento dos níveis circulantes de FSH na fase folicular precoce devido à diminuição da inibina circulante e com o fim de impulsionar o crescimento folicular (14). Por esta razão, considera-se o nível basal de FSH um fator prognóstico da resposta ovárica às gonadotrofinas exógenas e, indiretamente, para o resultado do tratamento (15).

Na prática, numerosos estudos confirmaram o valor preditivo do nível de FSH, tanto em condições basais como após estimulação com citrato de clomifeno ou com agonistas da GnRH (16, 17).

No presente estudo não foram confirmadas estas observações ao dividir os ciclos em função do nível circulante de FSH. Isto deve-se, possivelmente, ao reduzido número de casos em algum dos grupos, a que só nos ciclos em que se utilizou antagonista pôde realizar-se a determinação de FSH no ciclo de tratamento (nos ciclos com agonista a determinação pode ter sido realizada meses antes) ou a outros fatores clínicos ou de laboratório que será necessário investigar.

Não obstante, quando os ciclos se agruparam segundo o nível de FSH, tomando como valor de corte 8,5 UI/L, mesmo que as diferenças não sejam estatisticamente significativas, comprovou-se que as taxas de gestação eram superiores nos ciclos com nível de FSH inferior a 8,5 UI/L:

- Ciclos com FSH \leq 8,5 UI/L: 28,3% (bioquímica; n= 424) e 24,58% (ecográfica; n= 415);

- Ciclos com FSH $>$ 8,5 UI/L: 23,53% (bioquímica; n= 136) e 20,74% (ecográfica; n= 135)

Tabela 9

*Taxas de gravidez bioquímica e clínica (por punção) em função do número de ovócitos M II obtidos na punção (*p= 0.002; **p= 0.003)*

Nº Ovócitos	Gravidez bioquímica (%)*	N	Gravidez clínica (%)**	N
C O-C				
0	0	6	0	6
1 - 3	12,2	82	10,98	82
4 - 8	29,00	221	24,54	216
9 - 13	37,01	164	30,62	160
14 - 30	32,81	64	30,16	63
M II				
0	0	11	0	11
1 - 3	16,66	114	14,91	114
4 - 8	34,33	201	21,86	195
9 - 24	31,76	85	30,59	85

Estes resultados coincidem com o observado por outros autores (18).

Diferentes pesquisadores assinalaram a influência negativa que a obesidade exerce sobre os resultados da FIV (19-21), sobretudo quando se alcança a categoria de obesidade mórbida (22-24). No presente estudo confirma-se uma importante, mesmo que não significativa, diminuição das taxas de gestação nos ciclos realizados a mulheres com IMC superior a 30 Kg/m².

O facto de se tratar de uma primeira tentativa ou de tentativas sucessivas não tem suposto a existência de diferenças entre os grupos quanto a taxas de gravidez que, surpreendentemente, foram maiores nos segundas e terceiras tentativas que nas primeiras. Talvez isto se deva a uma melhor eleição no uso farmacológico para a estimulação depois do primeiro fracasso. Observa-se uma importante diminuição nas quartas tentativas. Provavelmente, porque as mulheres que foram estimuladas pela quarta vez tinham sido canceladas em alguma ocasião prévia ou por causa do muito reduzido número de casos.

À partida parece razoável a hipótese de que o número de folículos antrais existentes no ovário antes de iniciar a estimulação para FIV pode predizer o número de folículos que vão desenvolver-se com a estimulação e, indiretamente, o número de ovócitos que poderá ser obtido.

No entanto, o facto de que existam folículos visíveis por ultra-sons não garante o desenvolvimento dos mesmos, já que este vai depender da atividade das gonadotrofinas e da sensibilidade dos receptores às mesmas.

Scheffer e cols afirmaram que o número de folículos antrais presentes nos ovários é um fiel indicador da reserva ovárica e da "idade reprodutiva" da mulher (25).

Kwee e cols desenvolveram um estudo, no qual foram incluídas 110 mulheres, com o fim de comparar a sensibilidade e a especificidade da contagem de folículos antrais (RFA) como fator preditivo da resposta ovárica às gonadotrofinas com as do teste de clomifeno e o teste EFORT (26). Concluíram que o RFA resulta um teste pelo menos tão eficaz como os outros estudados, mais caros e complicados.

Aflatoonian e cols concluíram que o RFA é tão eficaz como a determinação da hormona antimulleriana (AMH) para predizer as respostas elevadas às gonadotrofinas (27).

Em resumo, a contagem de folículos antrais parece não só útil para tomar a decisão de incluir ou não a uma mulher num programa de reprodução assistida mas também, em certos casos, para decidir o tipo de estimulação ovárica a realizar.

A partir da análise de 880 ciclos, Dor e cols chegaram à conclusão que os ciclos em que o nível de estradiol não supera 500 pg/ml ou se obtêm menos de 3 ovócitos apresentam muito mau prognóstico em FIV (28), o que concorda com os achados deste estudo relativos às taxas de gravidez em função do número de ovócitos e M II obtidos na punção (Tabela 9). Pode observar-se que as melhores taxas de gestação se obtêm na categoria média do número de ovócitos obtidos; isto poderia ser devido a que na categoria mais elevada se situam as mulheres com ovário poliquístico, a propósito das quais foi defendida uma menor qualidade ovocitaria (29, 30).

As taxas de gravidez mostraram-se significativamente superiores nos ciclos em que um ou mais embriões foram criopreservados. Não é de estranhar pois, ao não praticar a transferência seletiva de um embrião (mas sim a de dois) e criopreservando-se exclusivamente embriões considerados viáveis, criopreservar equivale a dispor de ovócitos maduros (28) e embriões em maior número e esta circunstância sempre se considerou um fator de bom prognóstico em FIV. Por outro lado, aos bons resultados obtidos nestes ciclos haverá que acrescentar, no seu dia, as gravidezes que se produzam depois da transferência dos embriões criopreservados, uma vez descongelados.

Mesmo que o número de casos analisados seja pequeno, não parece que, incluindo no programa apenas mulheres com menos de 40 anos, a idade jogue um papel decisivo nos resultados.

Seria conveniente dispor do nível circulante de FSH dentro dos últimos 6 meses nos ciclos em que se utiliza agonista para o bloqueio hipofisário. As mulheres com nível superior a 8,5 UI/L merecem especial atenção e protocolos de estimulação ovárica específicos. Provavelmente, pode considerar-se discutível, iniciar estimulações a mulheres com níveis circulantes de FSH superiores a 15 UI/L ou com menos de 5 folículos antrais na ecografia basal.

Os casos em que a estimulação ovárica não consiga níveis circulantes de estradiol superiores a 500 pg/ml devem ser cancelados.

A julgar pelos resultados observados nesta série de pacientes, uma percentagem não desprezível de mulheres beneficiaria de doação de ovócitos, o que torna desejável a implementação de um programa de doação que permita a assistência a estas mulheres no âmbito da medicina pública.

Agradecimentos.

Os autores agradecem aos profissionais da MAC e da sua Unidade de Medicina Reprodutiva o esforço

realizado para que o desenvolvimento do programa de procriação medicamente assistida seja possível.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B.:** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2394-403.
2. **Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa M, Herrer R, Moreno J, et al.:** Critérios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. In: ASEBIR, editor. Cuadernos de Embriología Clínica. Barcelona: GÓBALO Gráfica; 2008. p. 25-37.
3. **Sahakyan M, Harlow B, Hornstein M.:** Influence of age, diagnosis, and cycle number on pregnancy rates with gonadotropin induced controlled ovarian hyperstimulation and intrauterine insemination. *Fertil Steril.* 1999; 72: 500-4.
4. **Romeu A, Muasher S, Acosta A, Veeck L, Díaz J, Jones G, et al.:** Results of in vitro fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. *Fertil Steril.* 1987; 47: 130-6.
5. **Wood C, McMaster R, Rennie G, Trounson A, Leeton J.:** Factors influencing pregnancy rates following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 1985; 43: 245-50.
6. **Ciray H, Ulug U, Tosun S, Erden H, Bahceci M.:** Outcome of 1114 ICSI and embryo transfer cycles of women 40 years of age and over. *Reprod Biomed Online.* 2006; 13: 516-22.
7. **Mosher W, Pratt W.:** Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril.* 1991; 56: 192-3.
8. **Meldrum D.:** Female reproductive aging-ovarian and uterine factors. *Fertil Steril.* 1993; 59: 1-5.
9. **Navot D, Drews M, Bergh P, Guzman I, Karstaedt A, Scott RJ, et al.:** Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril.* 1994; 61: 97-101.
10. **Levi A, Raynault M, Bergh P, Drews M, Miller B, Scott RJ.:** Reproductive outcome in patients with diminished ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2001; 76: 666-9.
11. **Ziebe S, Loft A, Petersen J, Andersen A, Lindenberg S, Petersen K, et al.:** Embryo quality and developmental potential is compromised by age. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2001; 80: 169-74.
12. **Munné S, Alikani M, Tomkin G, et al.:** Embryo morphology, development rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril.* 1995; 64: 382-91.
13. **Sauer M, Paulson R, Lobo R.:** Oocyte donation to women of advanced reproductive age: pregnancy results and obstetrical outcomes in patients 45 years and older. *Hum Reprod.* 1996; 11: 2540-3.
14. **Lenton E, De Krester D, Wooward A, Robertson D.:** Inhibin concentrations throughout the menstrual cycle of normal, infertile, and older women compared with those during spontaneous conception cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991; 73: 1180-90.
15. **Muasher S, Oehninger S, Simonetti S, Matta J, Ellis L, Liu HC, et al.:** The value of basal and/or stimulated gonadotropin levels in prediction of stimulation response and in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 1988; 50: 298-307.
16. **Scott RJ, Hofmann G.:** Prognostic assessment of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 1995; 63: 1-11.
17. **Toner J, Philput C, Joner G, Muasher S.:** Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age. *Fertil Steril.* 1991; 55: 784-91.
18. **Romeu M.:** El fallo ovárico oculto y su importancia en reproducción asistida Tesina de Licenciatura. Valencia; 2000.
19. **Tamer Erel C, Senturk L.:** The impact of body mass index on assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2009; 21: 228-35.
20. **Dessolle L, Daraï E, Cornet D, Rouzier R, Coutant C, Mandelbaum J, et al.:** Determinants of pregnancy rate in the donor oocyte model: a multivariate analysis of 450 frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod.* 2009; 24: 3082-9.
21. **Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Patson H, et al.:** Association of moderate obesity with a poor pregnancy outcome in women with polycystic ovary syndrome treated with low dose gonadotropin. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992; 99: 128-31.
22. **Dechaud H, Ferron G, Anahorv T, Hamal F, Humeau C, Hedon B.:** Obesity and assisted reproduction techniques. *Contracept Fertil Sex.* 1998; 26: 564-7.
23. **Awartani K, Nahas S, Al Hassan S, Al Deery M, Coskun S.:** Infertility treatment outcome in subgroups of obese population. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7: 52.
24. **Jungheim E, Lanzendorf S, Odem R, Moley K, Chang A, Ratts V.:** Morbid obesity is associated with lower clinical pregnancy rates after in vitro fertilization in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2009; 92: 256-61.
25. **Scheffer G, Broekmans F, Looman C, Blankenstein M, Fauser B, de Jong F, et al.:** The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod.* 2003; 18: 700-6.

26. **Kwee J, Elting M, Schats R, McDonnell J, Lambalk C.:** Ovarian volume and antral follicle count for the prediction of low and hyper responders with in vitro fertilization. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007; 15: 5-9.
27. **Aflatoonian A, Oskouian H, Ahmadi S, Oskouian L.:** Prediction of high ovarian response to controlled ovarian hyperstimulation: anti-müllerian hormone versus small antral follicle count (2-6 mm). *J Assist Reprod Genet.* 2009; 26: 319-25.
28. **Dor J, Seidman D, Ben-Shlomo I, Levrán D, Karasik A, Mashiach S.:** The prognostic importance of the number of oocytes retrieved and estradiol levels in poor and normal responders in in vitro fertilization (IVF) treatment. *J Assisted Reprod Genet.* 1992; 9: 228-32.
29. **Wood J, Dumesic D, Abbott D, Strauss Jr.:** Molecular abnormalities in oocytes from women with polycystic ovary syndrome revealed by microarray analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92: 705-13.
30. **Dumesic D, Padmanabhan V, Abbott D.:** Polycystic ovary syndrome and oocyte developmental competence. *Obstet Gynecol Surv.* 2008; 63: 39-48.