

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA
SAÚDE DE LISBOA

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Avaliação do efeito da cultura prolongada de embriões no peso dos recém-nascidos - estudo da população do Centro de Infertilidade e Reprodução Medicamente Assistida do Hospital Garcia de Orta

Pedro Miguel Lopes Ferreira

Orientador: Dr. Miguel Gallardo – MaloClinic Ginemed

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Margarida Eiras – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Mestrado em Gestão e Avaliação de Tecnologias em Saúde

LISBOA, JUNHO 2020

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA
SAÚDE DE LISBOA

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

**Avaliação do efeito da cultura prolongada de
embriões no peso dos recém-nascidos - estudo da
população do Centro de Infertilidade e Reprodução
Medicamentosa Assistida do Hospital Garcia de Orta**

Pedro Miguel Lopes Ferreira

Orientador: Dr. Miguel Gallardo – MaloClinic Ginemed

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Margarida Eiras – Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa

Júri: Presidente - Dr. André Coelho (ESTeSL), Arguente - Dr. Carlos Plancha
(Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa), Dr. Miguel Gallardo
(MaloClinic Ginemed)

Mestrado em Gestão e Avaliação de Tecnologias em Saúde

LISBOA, JUNHO 2020

Agradecimentos

Quero agradecer à Professora Margarida Eiras, co-orientadora deste trabalho, pelo espírito crítico e disponibilidade demonstrados, num tema que se revelou ser uma novidade mas ao mesmo tempo desafiante, assim espero.

Ao Dr. Miguel Gallardo, amigo, colega e orientador dedicado e assertivo, que muito contribuiu para a sua realização e concretização.

Aos meus colegas do Mestrado GATS. Todos nós embarcámos nesta viagem sem saber muito bem ao que íamos. Mas ao longo do tempo, fomos cimentando amizades e os desafios foram sendo superados. Espero que consigam alcançar tudo aquilo a que se propuseram, e desejo a todos muitos sucessos pessoais e profissionais. Uma palavra em especial para a Mané e Inês, colegas em alguns trabalhos de grupo. Com vocês, tudo se tornou mais fácil.

Aos meus colegas e amigos do Centro de Infertilidade e Reprodução Medicamente Assistida do Hospital Garcia de Orta, e em particular aos meus colegas do laboratório, Sandra e João. Numa instituição do Serviço Nacional de Saúde, com todas as dificuldades e constrangimentos inerentes ao mesmo, a sua dedicação e empenho permitem que todos os dias o trabalho seja concretizado com a qualidade que os utentes merecem e com os resultados que nos fazem orgulhar.

Um agradecimento ao José Luís Metello pela preciosa ajuda na análise estatística.

Aos meus pais por terem, desde sempre, acreditado em mim e por todos os esforços que fizeram permitindo-me chegar até aqui.

E à Mafalda, meu suporte e apoio incondicional em todos os momentos.

A todos, muito obrigado.

Resumo

Introdução: A tecnologia 'Cultura embrionária prolongada' e as consequentes transferências de blastocistos (dia 5 ou 6 após a fertilização) têm aumentado a nível global, muito devido aos melhores resultados clínicos em termos de gravidez e parto obtidos, quando comparadas com as transferências de embriões clivados (dia 2 ou 3 após a fertilização). No entanto, os estudos relativos que comparam resultados perinatais dos recém-nascidos após transferência de embriões de cultura prolongada têm sido inconclusivos, nomeadamente aqueles que dizem respeito ao indicador peso à nascença.

Objetivos: Avaliar a Tecnologia 'Cultura embrionária prolongada', comparando o peso à nascença dos bebés nascidos após transferência de blastocistos com o dos bebés nascidos após transferência de embriões clivados.

Metodologia: Estudo retrospectivo onde será avaliado o peso dos recém-nascidos de partos únicos após transferências a fresco de 1 ou 2 embriões realizadas no Centro de Infertilidade e Reprodução Medicamente Assistida do Hospital Garcia de Orta, entre 2014 e 2018. As transferências embrionárias constituirão 2 grupos independentes: embriões clivados (CL) e blastocistos (BL). Os dados da amostra foram recolhidos a partir do registo nacional do CNPMA.

Resultados: Não foram encontradas diferenças significativas no peso dos recém-nascidos entre os 2 grupos em estudo (3130,19 g CL vs.. 2999,76 g BL $p=0,296$). Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas idades gestacionais (38,58 semanas CL vs.. 38,20 semanas BL; $p=0,490$), bem como nos pesos dos recém-nascidos nas idades gestacionais de ≥ 37 semanas ($p=0,801$) ou < 37 semanas ($p=0,428$).

Conclusão: Este estudo demonstrou que a cultura prolongada de embriões *in vitro* não tem efeitos no peso dos recém-nascidos em partos únicos de transferências a fresco de 1 ou 2 embriões durante os tratamentos de reprodução assistida.

Palavras-chave: Peso dos recém-nascidos, Tecnologias de Reprodução Assistida, Blastocistos, Cultura embrionária prolongada

Abstract

Introduction: The extended embryo culture technology and its blastocyst transfers (5 or 6 days after fertilization) has been rising worldwide, mostly due to clinical results as pregnancy and live-birth rates, when compared with the transfers at the cleavage stage (2 or 3 days after fertilization). However, studies comparing perinatal outcomes of children born after the transfer of blastocysts have been inconclusive, specially those concerning birthweight.

Objectives: Evaluation of the 'Extended embryo culture' technology, comparing birthweight of babies born after blastocyst transfer with babies born after cleavage stage embryos.

Methodology: Retrospective study evaluating the birthweight of single births after fresh transfers of 1 or 2 embryos at the Centro de Infertilidade e Reprodução Medicamente Assistida, Hospital Garcia de Orta, between 2014 and 2018. Embryo transfers were divided in 2 independent groups: cleavage stage embryos (CL) and blastocysts (BL). Data from the national registry from CNPMA were used.

Results: No significant statistical differences in birthweight were found between the 2 groups (19 g CL vs. 2999,76 g BL $p=0,296$). Also no significant statistical differences were found in gestational age (38,58 semanas CL vs. 38,20 semanas BL; $p=0,490$), as well in birthweight of gestational age ≥ 37 weeks ($p=0,801$) or < 37 weeks ($p=0,428$).

Conclusion: This study shows that extended embryo culture technology in vitro does not affect birthweight of single birth babies after fresh transfers of 1 or 2 embryos during assisted reproduction treatments.

Key-words: Birthweight, Assisted Reproduction Technologies, Blastocyst, Extended embryo culture

Índice geral

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice geral	vii
Índice de tabelas	ix
Índice de figuras.....	x
Lista de abreviaturas	xi
Introdução	1
1. Enquadramento teórico	7
1.1 Qualidade e Segurança das TRA.....	7
1.2 Gravidezes múltiplas.....	8
1.3 Transferência eletiva de um embrião.....	9
1.4 Cultura embrionária prolongada e transferência de blastocistos.....	10
2. Objetivos	23
2.1 Objetivo principal.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3. Metodologia	25
3.1 Local do estudo.....	25
3.2 Tipo de estudo.....	25
3.3 População-alvo e amostra.....	25
3.4 Procedimentos laboratoriais.....	28
3.5 Questões éticas.....	29
3.6 Método para a recolha de dados.....	29
3.7 Análise estatística.....	29
4. Resultados	31
4.1 Caracterização da amostra.....	31
4.2 Características neonatais.....	34
5. Discussão	39

6. Conclusão	43
7. Referências bibliográficas.....	45
ANEXO I - Consentimento informado do CNPMA.....	57
ANEXO II - Parecer do Conselho de Ética do HGO.....	61

Índice de tabelas

Tabela 1: Estádios do desenvolvimento embrionário <i>in vivo</i>	4
Tabela 2: Revisão da literatura.....	14-21
Tabela 3: Variáveis do estudo.....	26
Tabela 4: Características maternas e paternas.....	31
Tabela 5: Características de acordo com o fator de infertilidade.....	32
Tabela 6: Características dos tratamentos.....	33
Tabela 7: Sexo dos recém-nascidos.....	34
Tabela 8: Tempo gestacional.....	34
Tabela 9: Peso dos recém-nascidos	35
Tabela 10: Peso dos recém-nascidos de acordo a idade gestacional.....	35
Tabela 11: Peso dos recém-nascidos de acordo com o sexo.....	36
Tabela 12: Regressão linear.....	37
Tabela 13: Taxa de transferências de blastocistos a fresco no CIRMA.....	39

Índice de figuras

Figura 1: Zigoto.....	4
Figura 2: Embrião clivado.....	4
Figura 3: Mórula.....	4
Figura 4: Blastocisto.....	4
Figura 5: Taxa de parto após transferências a fresco em Dia 3 e Dia 5 usando ovócitos próprios por grupos de idade.....	11
Figura 6: Critérios de exclusão.....	27

Lista de abreviaturas

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*

CIRMA – Centro de Infertilidade e Reprodução Medicamente Assistida

CNPMA – Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida

ESHRE – *European Society of Human Reproduction and Embryology*

FIV – Fertilização *in vitro*

HFEA - *Human Fertilisation and Embryology Authority*

ICSI – *Intracitoplasmatic Sperm Injection*

IMC – Índice de massa corporal

LGA – *Large for gestational age*

PMA – Procriação Medicamente Assistida

HR – Humidade relativa

TRA – Tecnologias de Reprodução Assistida

Introdução

A Infertilidade é definida como uma doença do sistema reprodutor que se manifesta pela ausência de obtenção de uma gravidez após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas⁽¹⁾, e estima-se que afete 10-15% dos casais em idade fértil. Um estudo de 2010 estimou que esta doença atinja cerca de 48.5 milhões de casais a nível mundial⁽²⁾. Apesar de não ser uma doença fatal, pode afetar de forma severa a qualidade de vida⁽³⁾. Em Portugal, foi realizado um estudo em 2009, com o objetivo de caracterizar a infertilidade no nosso país, e segundo este, a prevalência da infertilidade ao longo da vida situa-se entre os 9 e os 10% dos casais portugueses⁽⁴⁾.

Foi em 25 de Julho de 1978, no *Royal Oldham Hospital* em Inglaterra, após vários anos de trabalho e investigação da equipa de Patrick Steptoe e Robert Edwards, que nasceu Louise Brown, tornando-se no primeiro bebé com origem na utilização de TRA⁽⁵⁾. Com este feito notável, estava aberto o caminho para uma nova era de esperança para milhões de casais inférteis. Com a evolução da sociedade e das tecnologias disponíveis atualmente, também as mulheres solteiras ou casais de mulheres, têm a possibilidade de concretizar o objetivo de terem um filho, graças a estas técnicas. No nosso país, a aprovação da Lei nº 17/2016⁽⁶⁾ alargou o âmbito dos beneficiários das técnicas de procriação medicamente assistida garantindo o acesso de todas as mulheres à procriação medicamente assistida.

A utilização das Tecnologias de Reprodução Assistida (definidas como todas as intervenções que incluem a manipulação simultânea *in vitro* de ovócitos e espermatozoides ou embriões, com a finalidade de reprodução⁽⁷⁾) é considerada como o último recurso para fazer face a um problema de Infertilidade. Nesta definição não cabe uma técnica bastante utilizada e efetiva que é a inseminação intra-uterina (técnica onde uma amostra de sémen previamente processada é colocada no útero de forma a se obter uma gravidez⁽⁷⁾). Esta é uma terapia custo-efetiva e não invasiva de primeira linha para pacientes com trompas permeáveis e fatores de infertilidade cervicais, anovulação, fatores masculinos ligeiros a moderados, infertilidade inexplicada ou distúrbios na ejaculação, e cujas taxas de sucesso podem atingir os 10-20%. Está no entanto limitada a sua utilização em mulheres com endometriose, quando exista um fator masculino grave, infertilidade de causa tubária ou em mulheres com idade superior a 35 anos⁽⁸⁾. Nos casos em que abordagens mais simples e não invasivas, como a inseminação intra-uterina, não são suficientes, então os especialistas recorrem às TRA mais complexas.

Na Europa, de 1997 a 2014, foram realizados mais de 8 milhões de tratamentos com recurso às TRA, dos quais resultaram quase 1.5 milhões de crianças nascidas⁽⁹⁾. A proporção destas crianças na população em geral tem crescido substancialmente, e já atinge cerca de 4% em alguns países do continente europeu⁽¹⁰⁾. Mais de 40 anos após o nascimento de Louise Brown, estima-se que mais de 7 milhões de crianças nasceram com recurso a estas tecnologias em todo o mundo⁽¹¹⁾.

De modo geral, as TRA envolvem a manipulação de gâmetas femininos, gâmetas masculinos e embriões. Geralmente, o procedimento inicia-se com uma estimulação ovárica na mulher seguida da recuperação dos cúmulos ovocitários através de uma punção folicular ecoguiada.

A estimulação ovárica é realizada através da administração de gonadotrofinas (de origem recombinante ou urinária), durante aproximadamente 2-3 semanas. Tem como objetivo o crescimento folicular múltiplo, para a obtenção de vários ovócitos, em contraposição ao crescimento monofolicular de um ciclo natural, de forma a poderem ser fertilizados e originarem vários embriões. Quando os folículos atingem um tamanho de cerca de 16 mm são considerados maduros sendo necessário desencadear a sua ovulação e, ao mesmo tempo, cessando a administração das gonadotrofinas. O processo de ovulação é desencadeado através da administração de uma dose da hormona coriogonadotrófica (hCG) ou de um agonista da GnRH (*gonadotropin releasing hormone*).

Após 36 horas desta administração, é realizada a punção folicular transvaginal, um procedimento cirúrgico com sedação ou anestesia geral e ecoguiado, onde é aspirado o líquido folicular. Este líquido folicular recolhido é observado pelo embriologista ao microscópio, de forma a identificar e separar os chamados complexos cúmulos-ovócito (COC's), dos quais é expectável obter um por cada folículo puncionado. Estes COC's são estruturas formadas pelas células de suporte (células da granulosa) que contêm no seu interior o ovócito. Os COC's identificados são lavados em meio de lavagem apropriado, e posteriormente mantidos em cultura em condições de temperatura, humidade e gasificação controladas, a 37 °C, 6% CO₂, 5% O₂, e 90% de humidade relativa (HR).

Os ovócitos recolhidos na punção folicular podem ser fertilizados através de duas técnicas: a fertilização *in vitro* (FIV) ou a microinjeção intracitoplasmática do espermatozoide (geralmente usado o acrónimo inglês ICSI).

Na primeira, ovócitos são co-incubados, durante cerca de 16-18 horas, com uma concentração específica de espermatozoides móveis, para que se dê a entrada de um espermatozoide através da membrana ovocitária, o que faz com que este seja um procedimento mais aproximado a uma fertilização natural. A segunda é uma técnica mais invasiva, onde é selecionado um único espermatozoide e injetado diretamente no citoplasma do ovócito. Em ambas as técnicas, as amostras de sêmen, são previamente processadas com meios específicos para o efeito.

A ICSI foi originalmente desenvolvida para casos em que a qualidade espermática não permitia a aplicação da FIV. No entanto, atualmente a sua utilização vem sendo cada vez mais generalizada para além destes casos. Isto é de certa forma controverso uma vez que a ICSI parece não oferecer qualquer benefício em relação à FIV convencional nos casos de infertilidade sem fator masculino⁽¹²⁾.

Outros fatores podem levar à escolha daquela técnica mais invasiva, como sejam os casos de falha de fecundação prévia na FIV convencional ou nos casos em que os embriões são sujeitos a técnicas de diagnóstico pré-implantatório.

Após a verificação da correta fertilização dos ovócitos, feita cerca de 18 horas após a fecundação, os embriões formados são mantidos em cultura em condições específicas de 37 °C, 6% CO₂, 5% O₂, e 90% de HR até 6 dias de desenvolvimento como máximo. Ao longo destes dias, podem ser observados e classificados de acordo com vários critérios. Na tabela 1 e nas figuras seguintes, estão indicados os diversos estadios de desenvolvimento embrionário, bem como a sua localização habitual num ciclo *in vivo*, bem como as suas principais características.

A transferência e/ou congelação dos embriões pode ser realizada 1 a 6 dias após a fertilização, sendo que habitualmente, essa decisão é tomada na fase de clivagem celular, ao 3º dia de desenvolvimento embrionário, ou na fase de blastocisto, do 5º ao 6º dia.

Tabela 1: Estádios do desenvolvimento embrionário *in vivo*

Embriogênese	Tempo	Localização	Descrição
1. Zigoto	12-24 horas após a ovulação	Oviduto	Célula única contendo 2 pronúcleos (material genético materno e paterno).
2. Embrião clivado	2-3 dias após a fertilização	Oviduto	Estádio inicial da embriogênese. Divisões sucessivas do ovócito fertilizado.
3. Mórula	3-4 dias após a fertilização	Oviduto	Estrutura com cerca de 12-16 células.
4. Blastocisto	4-6 dias após a fertilização	Útero	Estrutura com 2 tipos celulares distintos: trofoblasto e massa celular interna.

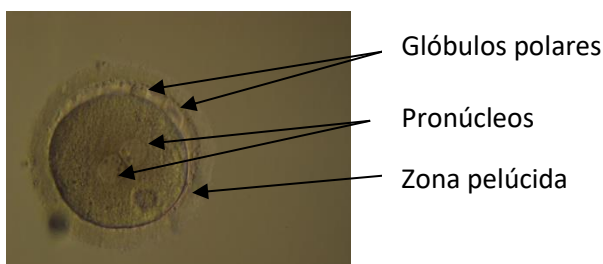


Figura 1: Zigoto

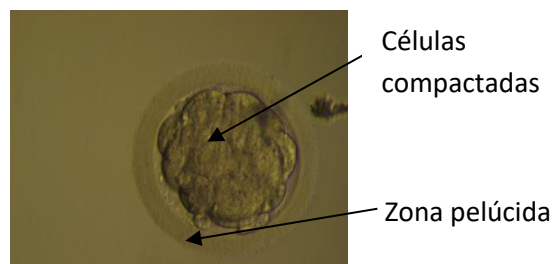


Figura 3: Mórula

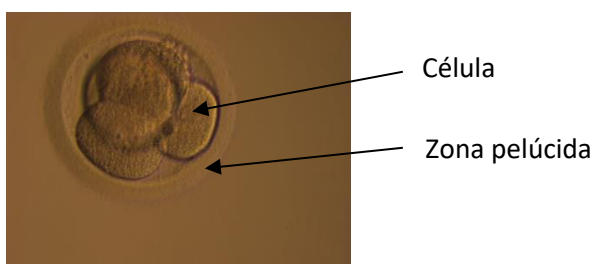


Figura 2: Embrião clivado

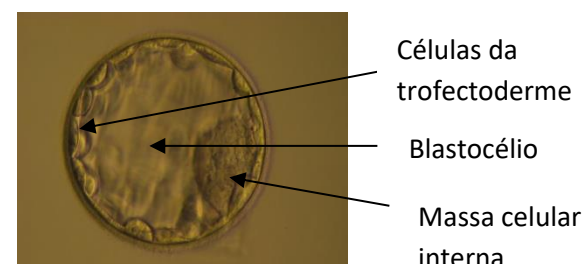


Figura 4: Blastocisto

A segurança dos procedimentos de PMA tem sido questionada, particularmente aquela que diz respeito aos potenciais efeitos na saúde da descendência⁽¹³⁾. Apesar da maioria das crianças concebidas por estas técnicas serem crianças saudáveis, tem sido reportado que a fertilização *in vitro* está associada com um aumento do risco de efeitos obstétricos e neonatais adversos, incluindo problemas de hipertensão na gravidez, parto pré-termo e baixo peso à nascença⁽¹⁴⁾. Têm também sido reportados efeitos a nível de

anomalias congénitas e defeitos no desenvolvimento neurológico nestas gravidezes^(15,16).

A utilização destas técnicas envolve um número considerável de desvios ao ambiente natural no qual a fertilização e desenvolvimento embrionário ocorrem, o que poderá originar alterações epigenéticas de longo prazo na descendência e, por sua vez, ter um efeito duradouro na saúde dos indivíduos, de acordo com o que é proposto pela *Development Origins of Health and Disease*⁽¹⁷⁾.

No entanto é necessário ter em atenção que alguns dos riscos anteriormente descritos podem não resultar das TRA mas da própria biologia subjacente aos casais inférteis^(11,18) sendo necessários estudos de larga escala baseados em dados populacionais, onde estejam incluídos dados sobre as TRA, para que uma avaliação das morbilidades a curto e longo prazo destas técnicas seja possível⁽¹¹⁾.

Apesar da ligação causal entre as TRA e os resultados da saúde dos recém-nascidos não estar ainda completamente estabelecida, vários procedimentos estão envolvidos. Entre eles, está a cultura prolongada dos embriões no laboratório e a transferência de blastocistos, cuja aplicação tem aumentado nos últimos anos. Apesar de alguns estudos mostrarem que as transferências de blastocistos estão associadas a taxas de gravidez cumulativas superiores⁽¹⁹⁾, uma recente meta-análise de seis estudos sugere que estas transferências podem aumentar o risco de parto pré-termo em partos únicos⁽²⁰⁾.

Por este motivo, é importante entender o papel das TRA no contexto dos riscos para os recém-nascidos, de forma a garantir a saúde a longo prazo destas crianças. Nesse sentido, este trabalho pretende dar mais um contributo para este conhecimento, avaliando o peso à nascença das crianças nascidas após transferência de blastocistos, comparando-o com crianças nascidas após transferência de embriões clivados.

Este trabalho inicia-se com um enquadramento teórico onde são explicados conceitos acerca das TRA e das algumas das suas implicações nos resultados neonatais e onde se apresentam alguns estudos prévios sobre o efeito da cultura prolongada de embriões e os resultados neonatais.

De seguida são definidos os objetivos, principal e específicos, deste estudo, após os quais é descrita a metodologia apresentada para a sua elaboração e apresentados os resultados do mesmo, com a respetiva análise estatística.

Finalmente são discutidos os resultados e apresentadas as considerações finais em forma de conclusão.

1. Enquadramento teórico

De forma a melhor enquadrar o tema de estudo do presente trabalho, apresentam-se de seguida alguns conceitos importantes de forma a fundamentar a sua justificação e ao mesmo tempo contribuir para uma melhor compreensão do mesmo.

1.1 Qualidade e Segurança das Tecnologias de Reprodução Assistida

A Qualidade e Segurança associada a estas técnicas é um tema muito importante para todos os envolvidos, sejam eles pais, profissionais e instituições de saúde, ou mesmo a sociedade em geral. Diversos estudos demonstraram que as gravidezes resultantes das TRA apresentam um risco elevado de efeitos perinatais adversos em relação a gravidezes espontâneas, que incluem parto pré-termo, baixo peso à nascença e defeitos dos recém-nascidos, bem como o aumento do tempo de internamento nas unidades de cuidados neonatais^(21,22).

Numa meta-análise de 2013, Hansen *et al.*, reportaram um aumento de 32% no risco de defeitos dos recém-nascidos de TRA, comparativamente a crianças nascidas de concepções naturais, com o risco absoluto para aquela população de 6.5-7%⁽²³⁾. Estes dados são confirmados por outros autores que referem um risco aumentado de partos pré-termo e baixo peso à nascença, nomeadamente nos partos únicos após TRA^(24,25). Apesar de se conhecer a associação entre as TRA e os defeitos dos recém-nascidos, está ainda por esclarecer a sua etiologia. Estes podem ser decorrentes das características parentais de subfertilidade *per se*⁽²⁶⁾, em que diversas causas de infertilidade, tais como fatores ovulatórios, infeções pélvicas, anomalias uterinas, obesidade e *stress* ou exposição a ambientes tóxicos, estão relacionadas com a ocorrência de efeitos neonatais adversos⁽²⁷⁾.

Diversos trabalhos demonstraram que a condição de infertilidade e não os tratamentos com aplicação das TRA estão associados a resultados menos favoráveis nos recém-nascidos^(28,29). Adicionalmente, casais que não recorreram a tratamentos de infertilidade e cujo tempo até conseguirem uma concepção foi superior a um ano, tinham um risco aumentado de parto pré-termo e os seus filhos tinham menor peso à nascença e uma maior taxa de malformações congénitas do que os casais que conseguiram conceber antes de um ano⁽³⁰⁾.

A nível do laboratório, os vários procedimentos utilizados, tais como o método de inseminação dos ovócitos ou as técnicas de congelação e descongelação, são fatores determinantes no desenvolvimento embrionário e nos resultados das crianças

nascidas⁽³¹⁾. As condições em que os embriões são cultivados afetam vários parâmetros do seu desenvolvimento incluindo o metabolismo e expressão genética⁽³²⁾, e onde os meios de cultura desempenham um papel fundamental, com uma ação na expressão genética e em processo epigenéticos do desenvolvimento embrionário^(33,34).

A componente farmacológica das TRA envolve a administração exógena de gonadotrofinas durante a hiper-estimulação controlada dos ovários para a produção de múltiplos ovócitos. Consequentemente, níveis hormonais suprafisiológicos entram em circulação sanguínea durante esta fase. Estudos demonstraram um efeito adverso destes fármacos na recetividade endometrial, bem como na qualidade e desenvolvimento embrionário, com possíveis implicações nos recém-nascidos^(27,35).

1.2 Gravidezes múltiplas

No entanto, a transferência de dois ou mais embriões para o útero, e as gravidezes múltiplas daí decorrentes, continua a ser o principal fator na base dos efeitos adversos neonatais após técnicas de TRA⁽³⁶⁾. Apesar de os riscos associados às gravidezes múltiplas serem bem conhecidos, as transferências de 2 embriões nos tratamentos de Procriação Medicamente Assistida (PMA) continuam a ser generalizados⁽³⁷⁾.

O *European IVF-Monitoring Consortium* divulgou uma taxa de 19,2% de partos múltiplos após transferências a fresco de embriões no ano de 2011⁽³⁸⁾. Nos Estados Unidos, dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostraram que aproximadamente 46% das crianças nascidas em 2011 após tratamentos de fertilização *in vitro* provinham de partos múltiplos⁽³⁹⁾. Por este motivo, e já desde o ano 2000, a *European Society for Human Reproduction and Embryology* (ESHRE) enfatizou que a obtenção de um parto de um recém-nascido saudável deve ser considerada como um parâmetro de qualidade num programa de Reprodução Assistida⁽⁴⁰⁾.

Este preocupante crescimento das taxas de gravidez múltiplas resultantes dos tratamentos após TRA levou a que várias publicações realçassem os riscos maternos, fetais e neonatais associados a estas gravidezes. Entre as complicações maternas incluem-se o risco elevado de hipertensão, diabetes gestacional, hemorragia periparto, aumento das taxas de cesarianas, depressões pós-parto e ansiedade⁽⁴¹⁻⁴³⁾. As gravidezes múltiplas estão também associadas a um aumento de 6 vezes no risco de parto pré-termo, que é a principal causa de mortalidade infantil, e a futuras doenças na vida futura da criança, como a paralisia cerebral, dificuldades de aprendizagem e doença pulmonar crónica⁽⁴⁴⁾.

Para além disso, os custos associados a estas gravidezes são consideravelmente superiores aos das gravidezes únicas. Num estudo do Reino Unido, o custo estimado para o *National Health Service* de um parto gemelar era 16 vezes superior ao de um parto com um recém-nascido⁽⁴⁵⁾.

1.3 Transferência eletiva de um embrião

Existe ainda, por parte dos doentes e dos profissionais de saúde, a ideia de que o sucesso de um tratamento de PMA é maior com a transferência de dois embriões do que com apenas um embrião transferido⁽⁴⁶⁾. Esta perceção contrasta com a literatura publicada, que demonstra claramente que a transferência eletiva de um embrião (definida pela *Society for Assisted Reproductive Technologies*, como a transferência de um embrião em que vários embriões de qualidade estão disponíveis, originados num ciclo de tratamento, tendo sido decidido transferir apenas um e congelar os restantes⁽⁴⁷⁾), juntamente com as transferências adicionais de embriões congelados permite taxas superiores de parto a termo de um recém-nascido, quando comparado com a transferência de dois embriões, ao mesmo tempo que permite taxas de gravidez múltipla comparáveis às das gravidezes espontâneas^(48,49).

A sensibilização dos doentes com um aconselhamento apropriado sobre os riscos das gravidezes múltiplas e as vantagens da transferência eletiva de um embrião é fundamental para a adoção desta estratégia⁽⁵⁰⁾. Neste sentido, alguns países têm tentado implementar políticas que visam reduzir o número de embriões transferidos, nomeadamente através de apoios estatais para os tratamentos⁽⁵¹⁾. Na Bélgica, por exemplo, o governo introduziu benefícios em termos de reembolsos aos centros de fertilidade, mediante a redução do número de embriões a transferir⁽⁴⁹⁾. Em Inglaterra, a *Human Fertilisation and Embryology Authority* (HFEA) aprovou, em 2009, uma política que encoraja os centros de fertilidade a adotar uma estratégia de transferência eletiva de um embrião. Esta política permitiu a redução da taxa de partos múltiplos de 24% em 2009 para 11% em 2016⁽⁵²⁾. Também na província canadiana do *Quebec*, a implementação da comparticipação pública para tratamentos de PMA, resultaram numa subida significativa na taxa de transferência eletiva de um embrião, de 1.6% para 31.6%, com uma descida na taxa de gravidez múltipla de 29.4% para 6.4% no mesmo período⁽⁵³⁾.

De forma a incrementar o uso da transferência eletiva, diversos métodos têm sido estudados para identificar o embrião com maior potencial de implantação^(54,55), tais como

a cultura prolongada até blastocisto⁽⁵⁶⁾, a cultura de embriões com o apoio de sistemas integrados de imagem (*time-lapse*) ou o *screening* genético pré-implantatário.

1.4 Cultura prolongada de embriões e transferência de blastocistos

A extensão da cultura embrionária até o estadio de blastocisto, que é atingido pelo embrião no dia 5 ou 6 de desenvolvimento após a fertilização dos ovócitos, traz um número de vantagens teóricas em relação aos embriões clivados (2-3 dias de desenvolvimento)⁽⁵⁶⁾. É considerado um método mais fisiológico, devido a uma maior sincronia embrião-endométrio, aproximando-se do que se passa numa concepção natural em que a implantação do embrião, que envolve a adesão e penetração do endométrio ocorre durante um período, também chamado de “janela de implantação”, que tem lugar aproximadamente entre o 5º e 7º dia após a fertilização⁽⁵⁷⁾.

Para além disto, a cultura até ao estadio de blastocisto permite a oportunidade de uma melhor avaliação do desenvolvimento, incluindo aspetos morfológicos e morfocinéticos, uma vez que os embriões fazem a transição do genoma maternal para o genoma embrionário após o estadio de 8 células, que é atingido geralmente 3 dias após a fertilização. Desta forma, a cultura *in vitro* até ao estadio de blastocisto, em que o genoma embrionário já se encontra ativado, permite uma seleção baseada em critérios mais objetivos do que os critérios mais limitados e inconsistentes morfológicos dos embriões clivados⁽⁵⁸⁾. É possível, que um embrião ao 3º dia de desenvolvimento, classificado como de excelente qualidade, segundo critérios morfológicos, não atinja o estadio de blastocisto, e não tenha potencial de se implantar no útero. Como resultado disto, o potencial de implantação dos blastocistos é superior ao dos embriões clivados, uma vez que apenas os embriões viáveis têm a capacidade de atingir o aquele estadio permitindo, desta forma, uma melhor seleção do embrião a transferir⁽³⁷⁾.

Finalmente, existe uma menor probabilidade de o embrião ser expulso do local de implantação na fase de blastocisto, uma vez que as transferências nesta fase estão associadas a uma menor contratilidade uterina⁽⁵⁹⁾.

A transferência embrionária de embriões clivados foi inicialmente a estratégia mais utilizada, mas os últimos desenvolvimentos nas condições de cultura embrionária, sejam elas os meios de cultura, as estufas, ou outras condições como a cultura com baixas tensões de oxigénio, permitem prolongar a duração da cultura embrionária sem comprometer a capacidade de desenvolvimento dos embriões⁽⁶⁰⁾.

Por outro lado, a evidência de um melhor desempenho em termos de desenvolvimento embrionário e de resultados de gravidez, conduziram a uma mudança, na última década, no sentido de um prolongamento da cultura dos embriões e posterior transferência uterina. Comparando com a transferência de embriões clivados, a transferência de blastocistos apresenta taxas de implantação e parto por transferência superiores⁽⁶¹⁾, de modo que a transferência eletiva de um blastocisto, associado a um programa de criopreservação de qualidade, permite reduzir a taxa de parto múltiplo sem comprometer de forma significativa as taxas de gravidez dos tratamentos^(62,63).

Em Inglaterra, segundo dados da HFEA, a percentagem de transferências em blastocisto foi de 47,9% no ano de 2014. Este número evidencia claramente a tendência para a adoção deste tipo de transferências em detrimento das transferências de embriões clivados⁽⁶⁴⁾. Em Portugal, esta percentagem tem também vindo a aumentar, tendo sido de 19,2% em 2015, de acordo com os últimos dados disponibilizados pelo Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA)⁽⁶⁵⁾.

Apesar das aparentes vantagens que beneficiam as transferências de blastocistos em termos de taxas de gravidez por cada transferência embrionária (Figura 5), permanece por esclarecer se o dia da transferência embrionária tem algum impacto nas taxas de parto cumulativas, isto é, o número total de partos provenientes das transferências de todos os embriões obtidos provenientes de uma mesma recolha ovocitária, tal como é evidenciado por uma revisão da *Cochrane* de 2016⁽¹⁹⁾.

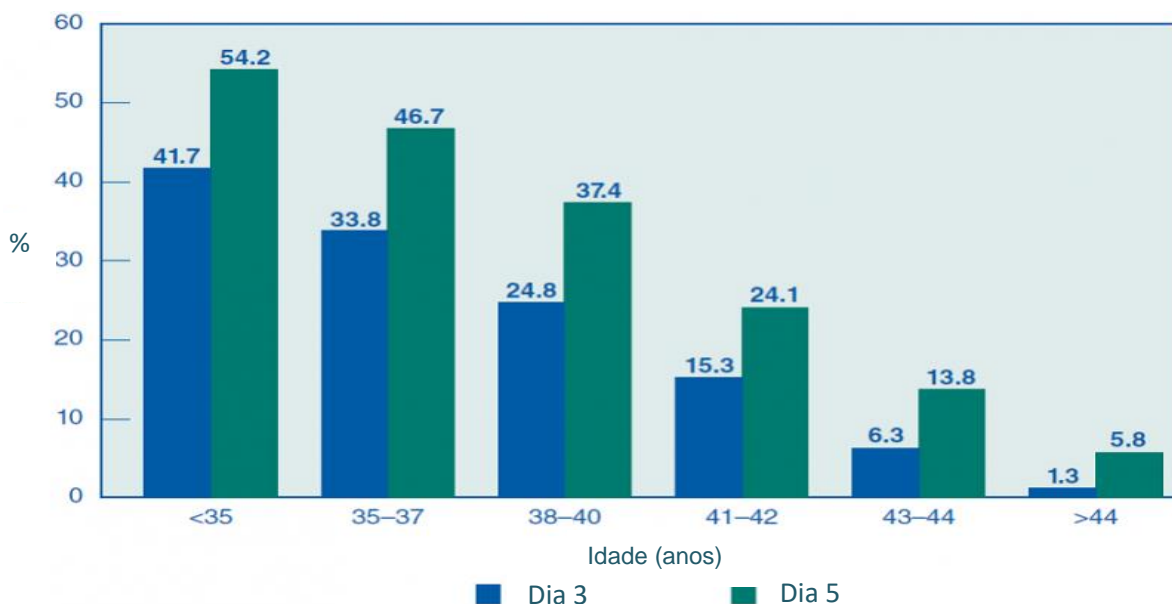


Figura 5 – Taxa de parto após transferências a fresco em Dia 3 e Dia 5 usando ovócito próprios por grupos de idade⁽⁶⁶⁾

Para além disto, os estudos relativos aos dados dos recém-nascidos após transferência de blastocistos apontam para potenciais riscos, como o aumento das taxas de gravidezes gemelares monozigóticas, alteração do rácio masculino/feminino, alterações epigenéticas^(67,68), ou risco aumentado de parto pré-termo^(69,70) bem como aqueles que dizem respeito ao indicador peso à nascença⁽⁷¹⁾.

Este indicador tem sido largamente estudado no que diz respeito à sua relação com futuras doenças das crianças, nomeadamente, doenças cardiovasculares, respiratórias, cancro e doenças do foro psiquiátrico⁽⁷²⁾. Ao mesmo tempo, e realçando a sua importância, a Organização Mundial de Saúde incluiu o baixo peso à nascença (<2500 g), como umas das suas prioridades, apontando para uma redução de 30% no número de crianças nascidas com um peso inferior a 2500 g até ao ano de 2025⁽⁷³⁾. Também nos últimos anos, tem aumentado o interesse dos potenciais riscos de pesos superiores a 4000 g, e a sua associação com efeitos adversos para a saúde⁽⁷²⁾.

À medida que a cultura prolongada dos embriões tem vindo a ganhar espaço e sendo adotada nos centros de Infertilidade em detrimento da transferência de embriões clivados, é importante que a segurança associada a esta tecnologia seja devidamente avaliada. Vários estudos têm sido publicados com resultados conflitantes no que diz respeito aos possíveis efeitos adversos das transferências de blastocistos⁽⁷⁴⁾.

Alguns desses estudos são apresentados na Tabela 2. Pela análise do quadro, pode-se verificar que a maioria deles não encontrou diferenças significativas nos resultados perinatais, comparando recém-nascidos de partos com origem em transferências de blastocistos e embriões clivados.

No entanto, deve ser referido que existe uma grande heterogeneidade nos estudos, já que foram incluídas transferências a fresco, transferências de embriões congelados ou ambas e outras diferenças metodológicas, nomeadamente o não ajustamento para fatores de confusão em alguns estudos. Adicionalmente, trata-se de estudos com reduzido tamanho amostral na maioria dos casos e devido à sua natureza essencialmente observacional e retrospectiva, verificou-se uma diversidade e conflitualidade nos resultados dos trabalhos analisados. No entanto, parece haver uma tendência para um aumento dos partos pré-termo e um aumento do peso dos recém-nascidos após transferências de blastocistos.

Um dos possíveis fatores que poderá influenciar e explicar estes resultados menos favoráveis nas transferências de blastocistos, são os meios de cultura utilizados na cultura prolongada.

Estudos em animais demonstraram que o peso médio dos recém-nascidos depende do meio de cultura utilizado. Em humanos, diversos trabalhos sugerem que o possível impacto dos meios de cultura no crescimento fetal está relacionado com a formulação de meios específicos e não para a sua generalidade, havendo, no entanto, a necessidade de confirmar estes dados com estudos randomizados e controlados de grandes dimensões⁽³⁴⁾.

Uma nota que deve ser salientada é a de que a completa composição dos meios de cultura atualmente disponíveis no mercado é ainda desconhecida, pelo que se torna difícil chegar a resultados e conclusões fiáveis, especulando-se qual dos componentes podem ter um efeito benéfico ou deletério no desenvolvimento e competência embrionária^(93,94).

Tabela 2: Estudos sobre o efeito da cultura embrionária prolongada nos resultados neonatais

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Zhu, 2019 ⁽⁷⁵⁾	Jan 2007 – Dez 206, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Transferências de embriões congelados após ciclo completo <i>freeze-all</i> . Embriões clivados: 11801 Blastocistos: 1009	Em partos únicos: <ul style="list-style-type: none"> • Risco de parto pré-termo aumentado nas transferências de blastocistos • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos relativamente aos pesos dos recém-nascidos.
Wang, 2019 ⁽⁷⁶⁾	Fev 2015 – Fev 2017, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Transferências a fresco de embrião único usando a tecnologia <i>time-lapse</i> em mulheres ≤ 40 anos. Embriões clivados: 171 Blastocistos: 62	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados neonatais.
Shi, 2019 ⁽⁷⁴⁾	Dez 2006 – Dez 2015, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Partos após transferências de embriões a fresco e congelados. Embriões clivados: 5348 Blastocistos: 9906	<ul style="list-style-type: none"> • Rácio masculino/feminino balanceado para o sexo masculino após transferências de blastocistos; • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos restantes resultados neonatais

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Fang, 2018 ⁽³¹⁾	Jan 2015 – Jun 2016, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Partos únicos >28 semanas após transferências de 1 ou 2 embriões congelados. Embriões clivados: 5348 Blastocistos: 9906	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados neonatais.
Holden, 2018 ⁽⁷⁷⁾	2004-2013, E.U.A.	Retrospectivo Coorte de dados reportados ao <i>SART-CORS database</i>	Transferências de embriões congelados. Embriões clivados: 117619 Blastocistos: 118572	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados neonatais.
Litzky, 2018 ⁽⁷¹⁾	2007-2014, E.U.A.	Retrospectivo Coorte de dados reportados ao <i>NASS database</i>	Partos únicos a termo após transferências a fresco. Embriões clivados: 56985 Blastocistos: 67169 Mulheres com \leq 45 anos	<ul style="list-style-type: none"> • Ligeiro aumento significativo do peso dos recém-nascidos após transferências de blastocistos nas transferências de 1 embrião.

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
DeVos, 2018 ⁽⁷⁸⁾	Jan 2010 – Dez 2013, Bélgica	Retrospectivo Coorte de centro único	Transferências de 1 embrião a fresco. Embriões de Dia 3: 113 Embriões de Dia 5: 218 Transferências de 1/2 embriões congelados Embriões de Dia 3: 58 Embriões de Dia 5: 58 Mulheres com <36 anos	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados neonatais nas transferências a fresco; • Z-score do peso dos recém-nascidos significativamente maior nas transferências de blastocistos congelados.
Zhang, 2018 ⁽⁷⁹⁾	Jan 2016 – Dez 2016, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Partos únicos >20 semanas após transferências de 1/2 embriões congelados. Embriões de Dia 3: 3520 Embriões de Dia 5: 215 Embriões de Dia 6: 466 Mulheres com ≤40 anos	<ul style="list-style-type: none"> • Z-score do peso dos recém-nascidos e proporção de bebês LGA significativamente maior nas transferências de blastocistos congelados.

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Li, 2017 ⁽⁸⁰⁾	Mai 2014 – Abr 2015, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Transferências a fresco. Embriões clivados: 798 Blastocistos: 829	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados neonatais.
Ernstad, 2016 ⁽⁸¹⁾	2002 - 2013, Suécia	Retrospectivo Coorte do registo nacional	Partos únicos após transferências a fresco e congelados e de gravidezes espontâneas. Embriões clivados: 25747 Blastocistos: 4819 Gravidezes espontâneas: 1196394	<ul style="list-style-type: none"> • Mortalidade perinatal maior nas transferências de blastocistos em relação aos embriões clivados • Nos partos únicos: <ul style="list-style-type: none"> ➢ Maior taxa de partos pré-termos de embriões clivados em relação a gravidezes espontâneas; ➢ Menor taxa de baixo peso à nascença em blastocistos comparado com embriões clivados; ➢ Menor taxa de LGA em blastocistos.

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Kartinen, 2015 ⁽⁸²⁾	Jan 2008 – Mar 2014, Finlândia	Retrospectivo Coorte <i>case-control</i> multicêntrico	Partos únicos ≥37 semanas após transferências de embriões a fresco e congelados. Embriões a fresco: Embriões Dia 2/3: 142 Embriões Dia 5/6: 142 Embriões congelados: Embriões Dia 2/3: 135 Embriões Dia 5/6: 135	<ul style="list-style-type: none"> • Bebês do sexo masculino com peso à nascença significativamente superior após transferências de embriões de Dia 5/6 a fresco e congelados.
Sotiroska, 2015 ⁽⁸³⁾	Fev 2008 – Dez 2013, Macedónia	Retrospectivo Coorte de centro único	Transferências a fresco. Mulheres <36 anos: Embriões Dia 3: 654 Embriões Dia 5: 304 Mulheres ≥36 anos: Embriões Dia 3: 275 Embriões Dia 5: 167	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas no peso médio dos partos únicos e gêmeares em mulheres com <36 anos; • Partos triplos de transferências de embriões de Dia 5 com peso significativamente maior; • Nos partos únicos das mulheres com ≥36 anos, peso significativamente maior após transferência de embriões de Dia 5.

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Oron, 2015 ⁽⁸⁴⁾	Ago 2010 – Dez 2013, Canadá	Retrospectivo <i>Matched case-control</i> Centro único	Transferência de 1 embrião a fresco com partos únicos. Embriões clivados: 106 Blastocistos: 212	<ul style="list-style-type: none"> • Sem risco aumentado de complicações obstétricas ou perinatais nos 2 grupos em estudo.
Zhu, 2014 ⁽⁸⁵⁾	Jan 2009 – Jun 2012, China	Retrospectivo Coorte de centro único	Partos únicos ≥20 semanas após transferências a fresco Embriões Dia 3: 2833 Embriões Dia 5/6: 96 Mulheres ≤40 anos	<ul style="list-style-type: none"> • Peso à nascença médio absoluto e o z-score médio dos embriões de Dia 5/6 superior aos dos embriões de Dia 3.
DeVos, 2014 ⁽⁸⁶⁾	Abr 2004 – Dez 2009	Retrospectivo Coorte de centro único	Partos únicos de transferências a fresco Embriões Dia 3: 1234 Embriões Dia 5/6: 864 Mulheres ≤40 anos	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos peso dos recém-nascidos.
Dar, 2014 ⁽⁸⁷⁾	Até Mar 2013	Revisão sistemática e meta-análise	6 Estudos observacionais e ensaios clínicos. Partos únicos após transferências de blastocistos e embriões clivados.	<ul style="list-style-type: none"> • Risco de parto pré-termo aumentado após transferências de blastocistos; • Risco de anomalias congénitas pode estar aumentado após transferências de blastocisto

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Mäkinen, 2013 ⁽⁸⁸⁾	2000 – 2010, Finlândia	Retrospectivo <i>Cross-sectional</i> Centro único	Partos únicos após transferências a fresco. Embriões Dia 2: 871 Embriões Dia 3: 139 Embriões Dia 5/6: 69	<ul style="list-style-type: none"> • Período de cultura está associado a um aumento na proporção de bebês LGA.
Maheswari, 2013 ⁽³⁷⁾	1984 – Mar 2013	Revisão sistemática e meta-análise	7 Estudos retrospectivos. Partos únicos após transferências de embriões clivados e blastocistos.	<ul style="list-style-type: none"> • Transferências em blastocistos associados a um risco aumentado de partos pré-termo; • O risco de restrições de crescimento é menor em bebês após transferências de blastocistos.
Fernando, 2012 ⁽⁸⁹⁾	2004-2009, Austrália	Retrospectivo Coorte de centro único	Partos únicos após transferências de embriões clivados e blastocistos. Embriões Dia 2/3/4: 2486 Embriões Dia 5/6: 1716	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados obstétricos e perinatais.
Martin, 2011 ⁽⁹⁰⁾	Jan 2002 – Jun 2009, França	Retrospectivo Coorte de centro único. Dados obtidos a partir de inquéritos aos casais.	Partos únicos em mulheres de idades semelhantes. Embriões Dia 2: 959 Blastocistos: 959	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados obstétricos e perinatais.

Estudo	Anos, País	Tipo de estudo	População e grupos de estudo	Principais conclusões
Kallén, 2010 ⁽⁶⁹⁾	2002 – 2006, Suécia	Retrospectivo Coorte da base de dados nacional.	Partos resultantes de tratamentos de FIV. Embriões clivados: 12562 Blastocistos: 1311	<ul style="list-style-type: none"> • Risco aumentado de parto pré-termo e defeitos neonatais após transferências de blastocistos.
Schwärzler, 2004 ⁽⁹¹⁾	Dez 1999 – Abr 2001, Áustria	Retrospectivo Coorte de centro único	Transferências de ciclos FIV/ICSI. Embriões clivados: 549 Blastocistos: 710	<ul style="list-style-type: none"> • Sem diferenças significativas entre os 2 grupos nos resultados neonatais.
Kausche, 2001 ⁽⁹²⁾	Austrália, Embriões clivados em 1995; Blastocistos a partir de 1996	Retrospectivo Coorte de centro único e centros de infertilidade na Austrália e Nova Zelândia.	Partos em mulheres de 24-43 anos Embriões clivados: 258 Embriões clivados (Austrália e Nova Zelândia): 1785 Blastocistos: 125	<ul style="list-style-type: none"> • Sem evidências de crescimento fetal anormal ou alterações no <i>sex-ratio</i> nos 2 grupos em estudo.

2. Objetivos

A efetividade de um tratamento na área da Reprodução Assistida está associada a uma melhoria da probabilidade de se obter um recém-nascido vivo, enquanto a segurança está associada à saúde da criança e da mãe, e desta forma relacionada com os efeitos adversos. Ambos os conceitos devem ser avaliados de forma a permitir decisões clínicas baseadas na evidência⁽⁹⁵⁾. Portanto, qualquer potencial benefício de uma intervenção deve ser avaliado perante um possível efeito neonatal adverso e os custos que daí possam decorrer.

Face ao enquadramento anterior, define-se como objetivo do trabalho:

2.1 Objetivo principal

- Avaliar, no contexto das Técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA), o peso dos recém-nascidos após transferência de blastocistos comparando com os recém-nascidos após transferência de embriões clivados.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a população cujos partos únicos tiveram origem na tecnologia de transferência de embriões clivados (características maternas e dos respetivos tratamentos de PMA);
- Caracterizar a população cujos partos únicos tiveram origem na tecnologia de transferência de blastocistos (características maternas e dos respetivos tratamentos de PMA);
- Comparar a população cujos partos únicos tiveram origem na tecnologia de transferência de embriões clivados com a população cujos partos únicos tiveram origem na tecnologia de transferência de blastocistos;
- Caracterizar o peso dos recém-nascidos originados pela tecnologia de transferência de embriões clivados;
- Caracterizar o peso dos recém-nascidos originados pela tecnologia de transferência de blastocistos;
- Comparar o peso dos recém-nascidos originados pelas tecnologias de transferência de embriões clivados e transferência de blastocistos.

3. Metodologia

3.1 Local do estudo

Este estudo foi realizado no Centro de Infertilidade e Reprodução Medicamente Assistida (CIRMA) do Hospital Garcia de Orta.

3.2 Tipo de estudo

Tendo em conta os objetivos definidos, este estudo é observacional (baseia-se na observação de factos objetivos independentes do investigador), transversal (fornece um retrato de uma população num determinado momento) e retrospectivo (baseia-se em dados de períodos passados)⁽⁹⁶⁾.

3.3 População-alvo e amostra

A população do trabalho é constituída por mulheres com idades compreendidas entre os 18 e 39 anos que realizaram ciclos de tratamentos FIV/ICSI no CIRMA e com transferência de 1 ou 2 embriões a fresco entre 2014 e 2018.

A partir desta população foi selecionada uma amostra que consistiu nos partos únicos com recém-nascido vivo, tendo sido excluídos os partos únicos resultantes de gravidezes em que foi visualizado ecograficamente mais de um saco gestacional, de forma a evitar o efeito de “*vanishing twin*”.

Foram definidas variáveis independentes, ou seja, aquelas que determinam e influenciam outra variável, sendo a causa para um determinado resultado (características maternas, características dos tratamentos de PMA), e as variáveis dependentes, isto é, aquelas que são encontradas e explicadas pelo facto de serem influenciadas ou determinadas pelas variáveis independentes (características dos partos e dos recém-nascidos) (Tabela 3).

Tabela 3: Variáveis do estudo

Variável	Depend./ Independ.	Tipo	Definição operacional
Idade materna	Independ.	Quantitativa contínua	Idade materna em anos registada no dia do tratamento de PMA
IMC materno e paterno	Independ.	Quantitativa contínua	IMC materno e paterno registado no dia do tratamento de PMA
Partos anteriores	Independ.	Qualitativa nominal	Partos anteriores (sim,não) do elemento feminino registados no dia do tratamento de PMA
Hábitos tabágicos maternos	Independ.	Qualitativa nominal	Hábitos tabágicos maternos (sim, não) registados no dia do tratamento de PMA
Hábitos tabágicos paternos	Independ.	Qualitativa nominal	Hábitos tabágicos paternos (sim, não) registados no dia do tratamento de PMA
Fator de infertilidade	Independ.	Qualitativa nominal	Fator de infertilidade (feminino, masculino, múltiplos sem fator masculino, múltiplos com fator masculino, idiopático, outro)
Método de fertilização	Independ.	Qualitativa nominal	Método de fertilização dos ovócitos (FIV, ICSI, Misto) usado no tratamento de PMA
Protocolo de estimulação	Independ.	Qualitativa nominal	Protocolo de estimulação ovárica usado no tratamento de PMA
Dose de gonadotrofinas	Independ.	Qualitativa nominal	Dose total de gonadotrofinas (UI) usadas nos tratamentos de PMA
Nº de embriões transferidos	Independ.	Quantitativa discreta	Nº de embriões transferidos (1,2) no tratamento de PMA
Dia da transferência	Independ.	Qualitativa nominal	Dia da transferência embrionária (2º,3º,5º, 6º) no tratamento de PMA
Tipo de parto	Depend.	Qualitativa nominal	Tipo de parto (vaginal, cesariana) após técnica de PMA
Idade gestacional do recém-nascido	Depend.	Quantitativa contínua	Semanas de gestação do recém-nascido após parto resultante de técnica de PMA
Género do recém-nascido	Depend.	Qualitativa nominal	Género do recém-nascido (masculino, feminino) após parto resultante de técnica de PMA
Peso do recém-nascido	Depend.	Quantitativa contínua	Peso em gramas do recém-nascido após parto resultante de técnica de PMA

Após a aplicação dos critérios de exclusão (Figura 6), a amostra foi dividida em 2 grupos independentes: o grupo das transferências de embriões clivados (cultura até dia 2 ou 3 após fertilização) e o grupo das transferências de blastocistos (cultura prolongada até dia 5 ou 6 após fertilização). Ambos os grupos foram caracterizados face às variáveis independentes e posteriormente avaliados e comparados o peso dos recém-nascidos nos 2 grupos em estudo. Foram também comparadas as variáveis dependentes entre os 2 grupos.

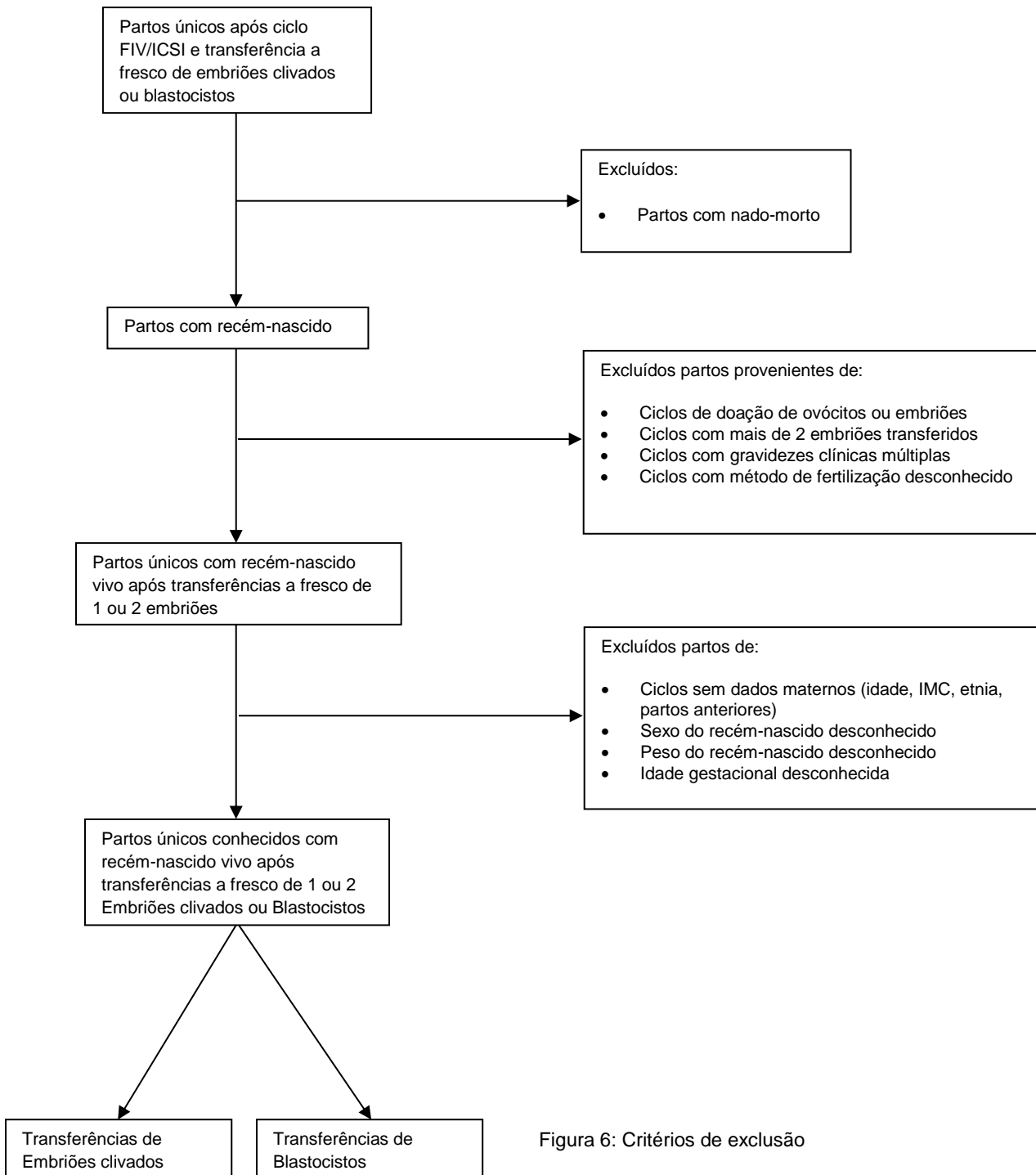


Figura 6: Critérios de exclusão

3.4 Procedimentos laboratoriais

Após estimulação ovárica com gonadotrofinas de acordo com os protocolos habituais, os ovócitos foram colhidos através de punção folicular ecoguiada. Após lavagem num meio tamponado, foram incubados a 37°C em 6% CO₂ e 95% de humidade relativa (HR) usando um meio de fertilização contendo HSA (*human serum albumin*). A microinjeção dos ovócitos (ICSI) foi realizada em casos de parâmetros seminais alterados ou em casos prévio de falhas de fertilização em FIV convencional. Após decumulação dos ovócitos numa enzima específica para o efeito (hialuronidase a 80IU/ml) e remoção mecânica das células da granulosa, por meio de capilares com diâmetro de 135µm, os ovócitos maduros foram incubados a 37°C em 6% CO₂ e 95% HR em meio de fertilização até ao momento da microinjeção. Os ovócitos imaturos foram colocados nas mesmas condições e deixados a maturar durante 4-6 horas. Se a maturação *in vitro* ocorresse estes eram também microinjetados.

As amostras de sémen (utilizadas a fresco ou criopreservadas do ejaculado ou originadas através de biópsia testicular criopreservada), foram colhidas ou descongeladas no dia da punção folicular. Posteriormente foram analisadas e processadas usando gradientes de densidade por centrifugação a 1200 rpm durante 20 minutos. Após remoção do sobrenadante, foram adicionados 2ml de meio de cultura espermática ao precipitado e novamente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos. Uma segunda lavagem foi realizada usando 1ml de meio de cultura espermática, a 1500 rpm durante 5 minutos. Finalmente, procedeu-se a um *swim-up* ou a uma ressuspensão do precipitado, consoante a qualidade da amostra, à temperatura ambiente no mesmo meio de cultura.

Após a realização da microinjeção, os ovócitos foram colocados em placas de cultura em gotas individuais de 30 µl de meio de cultura cobertas com óleo mineral e incubados a 37°C em 6% CO₂ e 95% HR.

A FIV convencional foi realizada em placas de cultura com poços preenchidos com 500 µl de meio de fertilização e inseminados com cerca de 50.000 espermatozoides móveis progressivos por poço. As placas eram depois incubadas a 37°C em 6% CO₂ e 95% HR. A fertilização dos ovócitos foi avaliada às 14-19 horas após a inseminação/microinjeção dos ovócitos. Os ovócitos da FIV convencional foram primeiramente decumulados e posteriormente colocados em gotas individuais de 30 µl de meio de cultura cobertas com óleo mineral.

Os embriões assim formados permaneceram nas mesmas condições de cultura durante 2, 3, 5 ou 6 dias de cultura, nos quais eram avaliados morfológicamente, até à sua transferência uterina ou criopreservação.

O tipo de meio de cultura (ORIGIO, Dinamarca), os protocolos laboratoriais e as condições de cultura permaneceram constantes ao longo de todo o período abrangido por este estudo.

3.5 Questões éticas

Todos os casais sujeitos a tratamentos de infertilidade assinam um consentimento informado emitido pelo CNPMA (Anexo I). O estudo foi aprovado pelo Conselho de Ética do Hospital Garcia de Orta (Anexo II).

3.6 Método para recolha de dados

Os dados foram obtidos com base na informação do 'Registo de Atividade em PMA' do CNPMA, relativos ao CIRMA. Este registo é confidencial, sendo o acesso feito através de *username* e *password* confidenciais.

3.7 Análise estatística

As características da amostra, bem como os resultados neonatais foram comparados entre os 2 grupos através do teste Mann-Whitney (variáveis contínuas) ou através do teste de qui-quadrado (variáveis categóricas). Foi realizada uma regressão linear multivariada para avaliar a relação entre o tempo de cultura embrionária e o peso dos recém-nascidos, ajustando para possíveis fatores de confusão, nos quais se incluem, a idade materna, idade paterna, duração de infertilidade, IMC materno, IMA paterno, hábitos tabágicos maternos e paternos, existência de filhos anteriores do elemento feminino, fator de infertilidade, dose de gonadotrofinas, método de fertilização, número de ovócitos recolhidos, dia da transferência dos embriões, número de semanas de gestação e sexo do recém-nascido.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 25.0. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo (realçados a **negrito**).

4. Resultados

4.1 Caracterização da amostra

Um total de 171 mulheres preencheu os critérios de inclusão do estudo e foram, portanto, incluídas no mesmo. Destas, 130 pertencem ao grupo de transferências de embriões clivados (EC) e 41 de transferências de blastocistos (BL). As principais características maternas e paternas da amostra estão descritas na tabela 4.

Tabela 4: Características maternas e paternas

		N	Média	Erro Desvio	Erro padrão	p
Duração de infertilidade (meses)	Clivados	130	53,39	25,629	2,248	0,913
	Blastocistos	41	52,46	20,872	3,26	
Idade do elemento feminino	Clivados	130	33,34	3,67	0,322	0,311
	Blastocistos	41	32,85	3,554	0,555	
IMC do elemento feminino	Clivados	130	23,88	4,152	0,364	0,383
	Blastocistos	41	23,15	3,561	0,556	
Idade do elemento masculino	Clivados	130	36,36	5,536	0,486	0,232
	Blastocistos	41	34,76	4,375	0,683	
IMC do elemento masculino	Clivados	130	26,09	3,873	0,34	0,068
	Blastocistos	41	24,85	2,798	0,437	
Hábitos tabágicos do elemento feminino (sim)	Clivados	56	43,08%			0,282
	Blastocistos	22	53,66%			
Hábitos tabágicos do elemento masculino (sim)	Clivados	56	46,92%			0,371
	Blastocistos	22	56,10%			
Partos anteriores do elemento feminino (sim)	Clivados	12	9,23%			0,381
	Blastocistos	6	14,63%			

A idade média das mulheres foi de 33,34 anos no grupo de embriões clivados e de 32,85 anos no grupo dos blastocistos, não havendo diferença significativa neste parâmetro

($p=0,311$). Também no que diz respeito ao tempo de infertilidade não foram encontradas diferenças significativas entre os 2 grupos, sendo de 53,39 meses no grupo de embriões clivados e de 52,46 no grupo dos blastocistos ($p=0,913$). Em termos de IMC, não foi detetada uma diferença significativa entre os 2 grupos no que diz respeito aos valores de IMC (IMC paterno de 26,09 nos EC vs. 24,85 nos BL; $p=0,068$ e IMA materno de 23,88 nos EC vs. 23,15 nos BL; $p=0,312$). Nas restantes características avaliadas (hábitos tabágicos maternos e paternos, método de fertilização dos ovócitos, existência de filhos anteriores do elemento feminino), não foram encontradas quaisquer diferenças significativas entre os 2 grupos em estudo.

Relativamente aos fatores de infertilidade dos casais (Tabela 5), não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos ($p=0,880$)

Tabela 5: Características de acordo com o fator de infertilidade

Fator de infertilidade		N	%	p
Tubário	Clivados	17	13,08%	0,880
	Blastocistos	7	17,07%	
Masculino	Clivados	49	37,69%	
	Blastocistos	15	36,59%	
Endometriose	Clivados	9	6,92%	
	Blastocistos	3	7,32%	
Ovulatório	Clivados	11	8,46%	
	Blastocistos	1	2,44%	
Uterino	Clivados	1	0,77%	
	Blastocistos	0	0,00%	
Múltiplos (femininos + masculinos)	Clivados	10	7,69%	
	Blastocistos	3	7,32%	
Múltiplos (apenas femininos)	Clivados	1	0,77%	
	Blastocistos	0	0,00%	
Idiopático	Clivados	30	23,08%	
	Blastocistos	12	29,27%	
Outro	Clivados	2	1,54%	
	Blastocistos	0	0,00%	

Foram encontradas diferenças significativas em termos de número de ovócitos recolhidos (8,41 nos EC vs. 9,76 nos BL; $p=0,048$), número de embriões obtidos (5,09 nos EC vs. 6,34 nos BL; $p=0,016$) e dose total de gonadotrofinas (2031,35 UI nos CL vs 2587,80 nos BL; $p=0,001$). Em relação ao número de ovócitos inseminados/injetados as diferenças encontradas não se revelaram ser estatisticamente significativas (7,72 nos EC vs. 9,02 nos BL; $p=0,063$), bem como no método de fertilização dos ovócitos ($p=0,192$) (Tabela 6).

Tabela 6: características dos tratamentos

		N	Média	Erro Desvio	Erro padrão	p
N.º ovócitos recolhidos	Clivados	130	8,41	3,495	0,306	0,048
	Blastocistos	41	9,76	3,659	0,571	
N.º ovócitos inseminados/injetados	Clivados	130	7,72	3,538	0,31	0,063
	Blastocistos	41	9,02	3,705	0,579	
N.º embriões obtidos	Clivados	130	5,09	2,777	0,244	0,028
	Blastocistos	41	6,34	3,167	0,495	
Dose total de gonadotrofinas (UI)	Clivados	130	2031,35	806,040	70,694	0,001
	Blastocistos	41	2587,80	919,326	143,575	
Método de fertilização						
FIV	Clivados	57	43,85%			0,192
	Blastocistos	24	58,54%			
ICSI	Clivados	70	53,85%			
	Blastocistos	17	41,46%			
Misto	Clivados	3	2,31%			
	Blastocistos	0	0,00%			

4.2 Características neonatais

Em relação ao sexo dos recém-nascidos (Tabela 7) verificou-se uma taxa de RN femininos maior no grupo blastocistos (68,3% vs. 50,8%) no entanto esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,071$).

Tabela 7: Sexo dos recém-nascidos

Sexo	Clivados		Blastocistos		p
	N	%	N	%	
feminino	66	50,8%	28	68,3%	0,071
masculino	64	49,2%	13	31,7%	

No que diz respeito ao tempo de gestação (Tabela 8), calculada em número de semanas a partir da data de realização do ciclo de PMA, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos (média de 38,58 semanas nos EC vs. 38,20 nos BL; $p=0,490$). Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os 2 grupos nos partos a termo (partos ocorridos após as 36 semanas) (média de 38,91 semanas EC vs. 38,86 semanas nos BL; $p=0,998$) ou nos partos pré-termo, ou seja, nos partos ocorridos antes das 37 semanas de gestação (média de 34,60 semanas nos EC vs. 34,33 nos BL; $p=0,954$). Ocorreram ainda, em cada um dos grupos, um parto de muito pré-termo (partos ocorridos antes das 32 semanas de gestação). Este tipo de partos (pré-termo ou muito pré-termo) correspondeu a 7,7% (10/130) dos partos totais dos embriões clivados e 14,6% nos blastocistos (6/41).

Tabela 8: Tempo gestacional

Tempo de gestação		N	Média	Desvio padrão	p
Tempo de gestação (semanas)	Clivados	130	38,58	1,632	0,490
	Blastocistos	41	38,20	2,159	
Partos de termo (≥ 37 semanas)	Clivados	120	38,91	1,085	0,998
	Blastocistos	35	38,86	1,141	
Partos pré-termo (< 37 semanas)	Clivados	10	34,60	1,897	0,954
	Blastocistos	6	34,33	2,733	
Partos muito pré-termo (< 32 semanas)	Clivados	1	31,00		
	Blastocistos	1	29,00		

Em termos dos pesos dos recém-nascidos (Tabela 9), os resultados demonstram não haver uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo das transferências de embriões clivados e o das transferências de blastocistos (média de 3130,19 g nos EC vs. 2999,76 g nos BL; $p=0,296$).

A taxa de bebês com baixo peso à nascença (peso inferior a 2500 g) foi de 4,6% (6/130) no grupo dos embriões clivados e de 22,0% no grupo de blastocistos (9/41). Apesar desta aparente diferença existente entre os 2 grupos, esta não foi estatisticamente significativa (média de 2017,78 g nos EC vs. 1928,33 g nos BL). Foram ainda reportados 1 parto com muito baixo peso à nascença (peso inferior a 1500 g) em cada um dos grupos.

Tabela 9: Peso dos recém-nascidos

Peso		N	Média	Desvio padrão	p
Peso dos recém-nascidos (g)	Clivados	130	3130,19	501,120	0,296
	Blastocistos	41	2999,76	614,173	
Baixo peso à nascença (< 2500 g)	Clivados	6	2017,78	455,721	0,724
	Blastocistos	9	1928,33	591,208	
Muito baixo peso à nascença (< 1500 g)	Clivados	1	990,00		
	Blastocistos	1	775,00		
Elevado peso à nascença (> 4500 g)	Clivados	0			
	Blastocistos	0			

Fazendo uma separação entre os partos de termos (≥ 37 semanas) e os partos pré-termo (<37 semanas), verificamos que não se encontram diferenças significativas no peso dos recém-nascidos entre os 2 grupos (Tabela 10).

Tabela 10: Peso dos recém-nascidos de acordo com a idade gestacional

Peso (de acordo com a idade gestacional)		N	Média	Desvio padrão	p
≥ 37 semanas	Clivados	120	3196,71	417,414	0,801
	Blastocistos	35	3172,29	414,584	
< 37 semanas	Clivados	10	2332,00	727,153	0,428
	Blastocistos	6	1993,33	651,964	

Avaliando o peso dos recém-nascidos de acordo com o sexo (Tabela 11), também não foram encontradas diferenças significativas entre os 2 grupos, quer para o sexo masculino (3187,03 g nos EC vs. 3291,92 g nos BL; $p=0,472$) quer para o sexo feminino (3075,08 g nos EC vs. 2864,11 g nos BL).

Tabela 11: peso dos recém-nascidos de acordo com o sexo

Peso (de acordo com o sexo)		N	Média	Desvio padrão	p
Masculino	Clivados	64	3187,03	473,020	0,472
	Blastocistos	13	3291,92	530,909	
Feminino	Clivados	66	3075,08	524,643	0,093
	Blastocistos	28	2864,11	611,042	

Uma análise de regressão linear foi realizada para determinar a relação do peso dos recém-nascidos com possíveis fatores de confusão (Tabela 12).

Da análise dos resultados, foram encontradas associações positivas entre o peso dos recém-nascidos com o tempo de gestação ($p<0,001$) e o sexo ($p=0,012$), funcionando como preditores independentes para aquele indicador neonatal. Para os restantes parâmetros, tais associações não foram encontradas.

Tabela 12: Regressão linear

Variável Dependente: Peso do recém-nascido	Coeficientes não padronizados		Coeficientes padronizados	t	p
	Beta	Erro	Beta		
(Constante)	-3668,746	825,825		-4,443	0,000
Idade do elemento feminino	-7,225	10,143	-0,049	-0,712	0,477
Idade do elemento masculino	1,274	6,790	0,013	0,188	0,851
Duração de infertilidade (meses)	1,231	1,388	0,057	0,887	0,376
IMC do elemento feminino	13,305	8,667	0,101	1,535	0,127
IMC do elemento masculino	-13,254	9,207	-0,092	-1,439	0,152
Hábitos tabágicos do elemento feminino	53,957	74,037	0,051	0,729	0,467
Hábitos tabágicos do elemento masculino	-24,291	70,772	-0,023	-0,343	0,732
Filhos anteriores do elemento feminino	107,084	102,840	0,062	1,041	0,299
Fator de infertilidade	-2,377	12,370	-0,012	-0,192	0,848
Dose total de gonadotrofinas (UI)	-0,028	0,044	-0,045	-0,633	0,527
Método de fertilização	29,294	62,891	0,029	0,466	0,642
N.º ovócitos recolhidos	-2,041	9,707	-0,014	-0,210	0,834
Dia de transferência dos embriões	6,289	33,741	0,012	0,186	0,852
N.º semanas gestação	186,566	18,238	0,623	10,229	0,000
Sexo do recém-nascido	-167,514	66,013	-0,157	-2,538	0,012

5. Discussão

O acesso e utilização das Tecnologias de Reprodução Assistida têm vindo a aumentar a nível global, fazendo mais dados relativos à saúde dos milhões de crianças nascidos estejam disponíveis. Nos anos mais recentes, a cultura prolongada de embriões, tem sido adotada como uma forma de melhor selecionar o embrião a transferir, aumentando a taxa de implantação e reduzindo as taxas de gravidez gemelar. No entanto, permanecem ainda dúvidas sobre a evidência da sua segurança, pelo que se torna necessário comparar os resultados neonatais e de longo prazo após transferências de blastocistos com as transferências de embriões clivados.

Tendo em conta o objetivo principal deste trabalho, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no peso dos recém-nascidos únicos, quando comparados os 2 grupos em análise (3131,19g nos CL vs. 2999,76 g nos BL; $p=0,171$). Estes resultados estão de acordo com diversos estudos anteriores que também não encontraram quaisquer diferenças entre os 2 grupos^(78,84,97).

A diferença no número de mulheres entre os 2 grupos pode ser explicada pelo facto de que apenas a partir do ano de 2017 se ter iniciado a transferência de blastocistos no CIRMA de forma sistemática (Tabela 13)

Tabela 13: Taxa de transferências de blastocistos a fresco no CIRMA

2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
0,0%	0,0%	0,0%	0,6%	0,5%	18,9%	53,2%

Apesar de não terem sido encontradas diferenças estatisticamente significativas nas idades gestacionais entre os 2 grupos, verificou-se que a taxa de partos pré-termo foi superior no grupo dos blastocistos (14,6% vs. 7,7%). Estes resultados estão de acordo com os resultados de três grandes estudos populacionais do Canadá, Suécia e Estados Unidos^(20,70,81), que sugerem que as transferências de blastocistos estão associadas a um maior risco de parto pré-termo quando comparadas com transferência de embriões clivados.

Quando se faz uma avaliação do peso em relação à idade gestacional dos recém-nascidos, verifica-se que não existem diferenças significativas entre os 2 grupos, quer nos partos a termo, quer nos partos pré-termo (Tabela 10). No entanto, deve ser realçado que as médias dos pesos do blastocistos são inferiores à dos embriões clivados, em qualquer das avaliações efetuadas.

O peso à nascença é um importante parâmetro relativo à gravidez para avaliar a saúde neonatal. Está associado com a mortalidade infantil durante o primeiro mês de vida, mas também com a mortalidade em idades mais avançadas, seja em crianças ou mesmo em adultos⁽⁹⁸⁾. Para além disto, a hipótese proposta por David Barker sugere que um baixo peso à nascença pode estar associado com um aumento na hipertensão, doença coronária e diabetes tipo 2 na idade adulta⁽⁹⁹⁾.

Este parâmetro tem sido frequentemente estudado nas TRA. Alguns dos estudos demonstraram resultados contraditórios devido aos diferentes procedimentos usados, ou demonstraram um aumento do peso à nascença após transferências de embriões a fresco, comparadas com gestações naturais^(100,101). Pelo contrário, publicações recentes sugerem que, bebés nascidos após transferência de embriões congelados têm melhores resultados perinatais do que os bebés resultantes de transferências de embriões a fresco, nomeadamente aumento do peso do recém-nascido e uma diminuição das taxas de prematuridade. No entanto, as taxas de macrosomia (peso superior a 4000 g) e grande para a idade gestacional parecem ser superiores nos primeiros⁽¹⁰²⁾.

A literatura demonstrou que os bebés de parto único resultantes de TRA com ou sem ICSI apresentam um maior risco de baixo peso à nascença (inferior a 2500 g), parto pré-termo (anterior às 37 semanas de gestação), anomalias congénitas e pequenos para a idade gestacional, quando comparados com recém-nascidos únicos provenientes de concepções naturais^(103,104). No entanto, a relação de causa-efeito entre as TRA e estas complicações da saúde das crianças continua a ser debatida.

Alguns estudos sugerem também que outros fatores, para além das TRA, estão associados ao peso dos recém-nascidos. Por exemplo, o número de gestações anteriores e a idade da mulher são alguns desses fatores que se sabe estarem associados aos resultados perinatais⁽¹⁰⁵⁾.

Outras características maternas estão também associadas ao peso dos recém-nascidos, as quais incluem o IMC, a diabetes gestacional, hipertensão ou pré-eclâmpsia⁽¹⁰⁶⁾ ou estilos de vida, como por exemplo o tabagismo⁽¹⁰⁷⁾.

Apesar de o nosso estudo não incluir alguns destes fatores (diabetes, gestacional, hipertensão ou pré-eclâmpsia), nenhuma das características maternas, analisadas através da regressão linear, demonstrou influenciar o peso dos recém-nascidos (idade $p=0,477$; IMC $p=0,127$; hábitos tabágicos $p=0,467$; presença de filhos anteriores $p=0,299$).

Em relação aos dados paternos, alguns estudos concluíram que as características masculinas, como a altura ou o peso, podem ser estatisticamente determinantes no

peso dos recém-nascidos, sendo no entanto um efeito pequeno^(108,109). No presente estudo, não ficou demonstrado qualquer efeito das características paternas investigadas (idade $p=0,851$; IMC $p=0,152$; presença de hábitos tabágicos $p=0,732$) no peso dos recém-nascidos.

Ainda pela análise da regressão linear apresentada, foram determinados como únicos fatores que determinam o peso dos recém-nascidos, a idade gestacional do recém-nascido ($p<0,001$) e o sexo ($p=0,012$), tal como demonstram outros estudos^(107,110).

Ao longo dos últimos anos, o debate sobre se o tempo de cultura embrionária no laboratório de FIV ou no período pré-implantatário afeta o peso neonatal tem sido alvo de vários estudos e debate, tal como ficou demonstrado na revisão da literatura que foi efetuada para este trabalho. As discrepâncias encontradas nesses estudos, tal como também já foram explicitadas, podem ser explicadas em parte pelos reduzidos tamanhos das amostras da maioria dos estudos, impedindo-os de apresentarem sólidas conclusões. Para além disso, os estudos são heterogêneos em termos de metodologia, populações e fatores de confusão, pelo que alguns dos resultados poderão estar comprometidos. Adicionalmente, diferentes tipos de meios de cultura utilizados podem explicar em parte os resultados conflituosos.

Muitos desses estudos, tal como este trabalho, focaram-se em ciclos com transferências de embriões a fresco, ciclos esses onde existe a possibilidade de um efeito adverso no desenvolvimento fetal causado por um meio com níveis de estradiol elevados. Vários investigadores indicaram que níveis suprafisiológicos de estradiol originados pela estimulação controlada dos ovários podem criar um ambiente pré-implantatário sub-ótimo, que poderá levar a uma disfunção placentária e, desta forma, conduzir um menor peso à nascença^(111,112).

O exato mecanismo que estabelece a associação entre o peso dos recém-nascidos e a duração do tempo de cultura embrionária permanece ainda desconhecido. A maioria dos dados de que dispomos atualmente sobre este assunto advém da investigação em animais. Já em 1998, Young *et al.* propunham que a exposição a meios de cultura de embriões bovinos e ovinos resultavam no denominado '*large offspring syndrome*'⁽¹¹³⁾.

Novas evidências demonstram que o desenvolvimento embrionário precoce é vulnerável e sensível às condições ambientais onde se desenvolve, tais como a cultura *in vitro*, e quaisquer distúrbios nestas condições pode forçar os embriões a processos de adaptação, nomeadamente a nível de alterações epigenéticas, que levam a alterações na trajetória desenvolvimento e crescimento fetal e, conseqüentemente, alterações no peso dos recém-nascidos^(114,115).

Também outros estudos identificaram que a composição dos meios de cultura poderá interferir com a expressão genética e os padrões de metilação do ADN em embriões pré-implantatários de ratinho, quando comparados com modelos *in vivo*⁽¹¹⁶⁾. Tendo em conta que estes resultados foram obtidos em estudos de animais, tais conclusões não poderão ser extrapoladas para pacientes sujeitos a tratamentos de reprodução assistida, pelo que mais investigação em humanos é necessária. Nesse sentido, foi realizado um estudo em 2014, que comparou o efeito de diferentes meios de cultura, ao mesmo tempo que avaliava o tempo de cultura dos embriões, tendo concluído que nenhum destes parâmetros influenciava o peso de recém-nascidos únicos⁽⁸⁶⁾.

6. Conclusão

Este estudo demonstrou que a cultura prolongada de embriões em laboratório não tem efeitos no peso dos recém-nascidos de partos únicos após transferências a fresco de 1 ou 2 embriões. Isto parece indicar que os benefícios conferidos por uma melhoria na avaliação da qualidade embrionária, uma melhor sincronia embrião-endométrio e uma diminuição da contratilidade uterina que advêm das transferências de blastocistos, se sobrepõem aos potenciais efeitos adversos de uma cultura prolongada.

Segundo a *International Network of Agencies for Health Technology Assessment* (INAHTA), a definição do conceito de avaliação das tecnologias da saúde consiste na “avaliação sistemática das propriedades, efeitos e/ou impactos destas tecnologias”. Nestas, podemos incluir qualquer intervenção que pode ser utilizada para prevenir, diagnosticar ou tratar a doença ou cuidados de reabilitação ou continuados, e que podem incluir medicamentos, dispositivos, procedimentos e sistemas organizacionais utilizados na prestação de cuidados de saúde.

Tendo em conta que, o objetivo fundamental dos tratamentos de infertilidade e das tecnologias de reprodução assistida é o nascimento de uma criança saudável, pretendeu-se que este trabalho, apesar de ser baseado num único centro de estudo e de carácter retrospectivo, permita uma escolha fundamentada na prática laboratorial e clínica no momento da tomada de decisão do tempo de cultura dos embriões. A análise dos resultados obstétricos e neonatais deste tipo de estudos permitem o acesso a importantes informações, quer dos profissionais de saúde, quer dos próprios pacientes que se submetem a tais tratamentos.

Sendo certo que do ponto de vista da prática clínica a tendência largamente prevalente nos últimos anos na PMA é a da transferência ao 5º ou 6º dia, importa ainda sublinhar que, em termos de causalidade, o peso do recém-nascido depende de uma vasta plêiade e acervo multifatorial, sobretudo de condicionalismos genéticos dos progenitores, da idade materna e das condições maternas aquando da placentação e da gravidez – aumento ponderal, ameaça de abortamento, descolamentos placentários, tipo de alimentação, situação emocional, por exemplo.

Quer isto dizer que, quaisquer que sejam eventuais diferenças de peso dos recém-nascidos associadas a diferentes tipos de embriões transferidos, e sem agora referir sequer a desejável homogeneidade quantitativa e qualitativa dos grupos em comparação (para eliminação deste viés à partida), importa sinalizar a prudência na interpretação de eventuais associações, que não são necessariamente de causalidade.

Longe do debate sobre a influência da cultura prolongada de embriões no peso dos recém-nascidos estar terminado, este foi mais um contributo para esse debate, sendo certo que uma contínua vigilância das TRA em termos de eficácia e segurança deve continuar a ser uma prioridade nesta área.

7. Referências bibliográficas

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, De Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod.* 2009;24(11):2683–7.
2. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 2012;9(12):1–12.
3. Greil AL, Shreffler KM, Schmidt L, McQuillan J. Variation in distress among women with infertility: Evidence from a population-based sample. *Hum Reprod.* 2011;26(8):2101–12.
4. Silva-Carvalho JL, Santos A. Estudo Afrodite: Caracterização da infertilidade em Portugal (Vol. 1. Estudo na Comunidade). *Porto Fac Med da Univ do ...* [Internet]. 2009;74. Available from: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Estudo+AFRODITE:+Caracterização+da+Infertilidade+em+Portugal+\(I+-+Estudo+na+Comunidade\)#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Estudo+AFRODITE:+Caracterização+da+Infertilidade+em+Portugal+(I+-+Estudo+na+Comunidade)#0)
5. Steptoe P.C., R.G. Edwards. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978;21:17.
6. Lei no. 17/2016. *Diário da República*, 1ª série — Nº 116 [Internet]. 2016;1903–4. Available from: http://www.cnpma.org.pt/Docs/Legislacao_Lei_17_2016.pdf
7. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil Steril May 2017* [Internet]. 2017;108(3):393–406. Available from: <http://0212u4oop.y.http.eds.a.ebscohost.com.proxy.uludag.deep-knowledge.net/eds/detail/detail?vid=1&sid=d4915b1d-e084-4322-b352-15da5ac3dbe6%40sessionmgr4009&bdata=JnNpdGU9ZWRzLWxpdmU%3D#AN=S0015028217304296&db=edselp>
8. Allahbadia GN. Intrauterine Insemination: Fundamentals Revisited. *J Obstet Gynecol India.* 2017;67(6):385–92.
9. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, et al. ART in Europe, 2014: Results generated from European registries by ESHRE.

- Hum Reprod. 2018;33(9):1586–601.
10. Lu Y, Wang N, Jin F. Long-term follow-up of children conceived through assisted reproductive technology. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2013;14(5):359–71.
 11. Pinborg A. Short- and long-term outcomes in children born after assisted reproductive technology. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2019;126(2):145–8.
 12. Drakopoulos P, Garcia-Velasco J, Bosch E, Blockeel C, de Vos M, Santos-Ribeiro S, et al. ICSI does not offer any benefit over conventional IVF across different ovarian response categories in non-male factor infertility: a European multicenter analysis (*Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, (2019), 36, 10, (2067-2076),. *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(10):2077–8.
 13. Lambert RD. Safety issues in assisted reproductive technology: Aetiology of health problems in singleton ART babies. *Hum Reprod*. 2003;18(10):1987–91.
 14. Qin J, Sheng X, Wu D, Gao S, You Y, Yang T, et al. Adverse obstetric outcomes associated with in vitro fertilization in singleton pregnancies: A prospective cohort study. *Reprod Sci*. 2017;24(4):595–608.
 15. Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: A population-based study. *Lancet*. 2002;359(9305):461–5.
 16. Lehti V, Brown AS, Gissler M, Rihko M, Suominen A, Sourander A. Autism spectrum disorders in IVF children: A national case-control study in Finland. *Hum Reprod*. 2013;28(3):812–8.
 17. *Gillman, Matthew W. (2005-10-27). "Developmental origins of health and disease". The New England Journal of Medicine. 353 (17): 1848–1850. doi:10.1056/NEJMe058187. ISSN 1533-4406. PMC 1488726. PMID 16251542*
 18. Sutcliffe AG, Ludwig M. Outcome of assisted reproduction. *Lancet*. 2007;370(9584):351–9.
 19. Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012;(6).
 20. Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):439–48.
 21. Zhao J, Yan Y, Huang X, Li Y. Do the children born after assisted reproductive

- technology have an increased risk of birth defects? A systematic review and meta-analysis. *J Matern Neonatal Med* [Internet]. 2018;0(0):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1488168>
22. Nakashima A, Araki R, Tani H, Ishihara O, Kuwahara A, Irahara M, et al. Implications of assisted reproductive technologies on term singleton birth weight: An analysis of 25,777 children in the national assisted reproduction registry of Japan. *Fertil Steril* [Internet]. 2013;99(2):450–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.027>
 23. Hansen M, Kurinczuk JJ, Milne E, de Klerk N, Bower C. Assisted reproductive technology and birth defects: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(4):330–53.
 24. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from ivf/icsi: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2012;18(5):485–503.
 25. Pinborg A, Wennerholm UB, Romundstad LB, Loft A, Aittomaki K, Söderström-Anttila V, et al. Why do singletons conceived after assisted reproduction technology have adverse perinatal outcome? Systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(2):87–104.
 26. Romundstad LB, Gunnell D, von Düring V, Romundstad PR, Sunde A, Skjærven R, et al. Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet*. 2008;372(9640):737–43.
 27. Kondapalli LA, Perales-Puchalt A. Low birth weight: Is it related to assisted reproductive technology or underlying infertility? *Fertil Steril* [Internet]. 2013;99(2):303–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.12.035>
 28. Draper ES, Kurinczuk JJ, Abrams KR, Clarke M. Assessment of separate contributions to perinatal mortality of infertility history and treatment: A case-control analysis. *Lancet*. 1999;353(9166):1746–9.
 29. Ombelet W, Martens G, De Sutter P, Gerris J, Bosmans E, Ruysinck G, et al. Perinatal outcome of 12 021 singleton and 3108 twin births after non-IVF-assisted reproduction: A cohort study. *Hum Reprod*. 2006;21(4):1025–32.
 30. Zhu JL, Basso O, Obel C, Bille C, Olsen J. Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: Danish national birth cohort. *Br Med J*.

- 2006;333(7570):679–81.
31. Fang J, Zhu L, Li D, Xu Z, Yan G, Sun H, et al. Effect of embryo and blastocyst transfer on the birthweight of live-born singletons from FET cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(10):1905–10.
 32. Behr B, Wang H. Effects of culture conditions on IVF outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;115(SUPPL.):72–6.
 33. Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E, Derhaag JG, Geraedts JP, Smits LJ, et al. Further evidence that culture media affect perinatal outcome: Findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum Reprod.* 2012;27(7):1966–76.
 34. Sunde A, Brison D, Dumoulin J, Harper J, Lundin K, Magli MC, et al. Time to take human embryo culture seriously. *Hum Reprod.* 2016;31(10):2174–82.
 35. Kapiteijn K, de Bruijn CS, de Boer E, de Craen AJM, Burger CW, van Leeuwen FE, et al. Does subfertility explain the risk of poor perinatal outcome after IVF and ovarian hyperstimulation? *Hum Reprod.* 2006;21(12):3228–34.
 36. Klitzman R. Deciding how many embryos to transfer: ongoing challenges and dilemmas. *Reprod Biomed Soc Online [Internet].* 2016;3:1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbms.2016.07.001>
 37. Maheshwari A, Kalampokas T, Davidson J, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril [Internet].* 2013;100(6):1615–1621.e10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.08.044>
 38. Kupka MS, D'Hooghe T, Ferraretti AP, De Mouzon J, Erb K, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2011: Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod.* 2016;31(2):233–48.
 39. Sunderam S, Kissin DM, Zhang Y, Folger SG, Boulet SL, Warner L, et al. Assisted Reproductive Technology Surveillance — United States, 2016. *MMWR Surveill Summ.* 2019;68(4):1–23.
 40. B.L.Rubin PGC. Multiple gestation pregnancy The ESHRE Capri Workshop Group* rates in most circumstances. Embryo reduction involves extremely difficult decisions for infertile couples and should be used only as a last resort. *Assisted reproductive treat. Hum Reprod.* 2000;15(7):1856–64.

41. Wen SW, Demissie K, Yang Q, Walker MC. Maternal morbidity and obstetric complications in triplet pregnancies and quadruplet and higher-order multiple pregnancies. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(1):254–8.
42. Wenze SJ, Tezanos KM. *parenthood*. 2015;18(2):163–76.
43. Medical Advisory Secretariat. In vitro fertilization and multiple pregnancies: an evidence-based analysis. [Internet]. Vol. 6, Ontario health technology assessment series. 2006. 1-63 p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23074488><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3379537>
44. Chambers GM, Ledger W. The economic implications of multiple pregnancy following ART. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2014;19(4):254–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2014.04.004>
45. Ledger WL, Anumba D, Marlow N, Thomas CM, Wilson ECF. The costs to the NHS of multiple births after IVF treatment in the UK. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2006;113(1):21–5.
46. Md Latar IL, Razali N. The Desire for Multiple Pregnancy among Patients with Infertility and Their Partners. *Int J Reprod Med*. 2014;2014:1–7.
47. Gerris J, Sutter P De. Elective single-embryo transfer. *Bienn Rev Infertil Vol 1* [Internet]. 2009;97(4):171–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.11.050>
48. Gerris J, Tiitinen A, de Neubourg D, van Montfoort APA, Norman RJ, McLernon DJ, et al. Clinical effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Bmj*. 2010;341(dec21 2):c6945–c6945.
49. Lee AM, Connell MT, Csokmay JM, Styer AK. Elective single embryo transfer- the power of one. *Contracept Reprod Med* [Internet]. 2016;1(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40834-016-0023-4>
50. Newton CR, McBride J, Feyles V, Tekpetey F, Power S. Factors affecting patients' attitudes toward single- and multiple-embryo transfer. *Fertil Steril*. 2007;87(2):269–78.
51. Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer. *Hum Reprod Update*. 2011;17(1):107–20.
52. Harbottle S, Hughes C, Cutting R, Roberts S, Brison D. Elective Single Embryo

- Transfer: An update to UK Best Practice Guidelines. *Hum Fertil.* 2015;18(3):165–83.
53. Vélez MP, Connolly MP, Kadoch IJ, Phillips S, Bissonnette F. Universal coverage of IVF pays off. *Hum Reprod.* 2014;29(6):1313–9.
 54. Khalaf Y, El-Toukhy T, Coomarasamy A, Kamal A, Bolton V, Braude P. Selective single blastocyst transfer reduces the multiple pregnancy rate and increases pregnancy rates: A pre- and postintervention study. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2008;115(3):385–90.
 55. Tiitinen A. Single embryo transfer: Why and how to identify the embryo with the best developmental potential. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2019; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.beem.2019.04.001>
 56. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: A prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004;81(3):551–5.
 57. Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med.* 1999;340(23):1796–9.
 58. Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R, Tucker MJ. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril.* 2000;74(3):495–7.
 59. Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod* [Internet]. 2001;16(6):1115–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11387279>
 60. Consensus Group C. ‘There is only one thing that is truly important in an IVF laboratory: everything’ Cairo Consensus Guidelines on IVF Culture Conditions. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2020;40(1):33–60. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.10.003>
 61. Wang SS, Sun HX. Blastocyst transfer ameliorates live birth rate compared with cleavage-stage embryos transfer in fresh in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycles: Reviews and meta-analysis. *Yonsei Med J.* 2014;55(3):815–25.
 62. Abuzeid OM, Deanna J, Abdelaziz A, Joseph SK, Abuzeid YM, Salem WH, et al. The impact of single versus double blastocyst transfer on pregnancy outcomes:

- A prospective, randomized control trial. *Facts, views Vis ObGyn*. 2017;9(4):195–206.
63. Blake DA, Proctor M, Johnson NP. The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: A Cochrane review. *Hum Reprod*. 2004;19(4):795–807.
 64. HFEA. Fertility treatment 2014. Trends and figures. HfeaGovUk [Internet]. 2016;(March):1–49. Available from: <https://tinyurl.com/yaezlzek>
 65. Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida. Relatório da Atividade Desenvolvida pelos Centros de PMA em 2015. 2017;27.
 66. CDC, ASRM S. 2012 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. 2014.
 67. Chang HJ, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH. Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* [Internet]. 2009;91(6):2381–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.03.066>
 68. Maheshwari A, Hamilton M, Bhattacharya S. Should we be promoting embryo transfer at blastocyst stage? *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2016;32(2):142–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.09.016>
 69. Källén B, Finnström O, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. Blastocyst versus cleavage stage transfer in in vitro fertilization: Differences in neonatal outcome? *Fertil Steril*. 2010;94(5):1680–3.
 70. Kalra SK, Ratcliffe SJ, Barnhart KT, Coutifaris C. Extended embryo culture and an increased risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol*. 2012;120(1):69–75.
 71. Litzky JF, Boulet SL, Esfandiari N, Zhang Y, Kissin DM, Theiler RN, et al. Birthweight in infants conceived through in vitro fertilization following blastocyst or cleavage-stage embryo transfer: a national registry study. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(6):1027–37.
 72. Belbasis L, Savvidou MD, Kanu C, Evangelou E, Tzoulaki I. Birth weight in relation to health and disease in later life: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *BMC Med* [Internet]. 2016;14(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12916-016-0692-5>
 73. O'Brien NG, Dundon SP. Low Birth Weight. *Br Med J*. 1970;4(5737):745.
 74. Shi W, Zhang W, Li N, Xue X, Liu C, Qu P, et al. Comparison of perinatal outcomes following blastocyst and cleavage-stage embryo transfer: analysis of

- 10 years' data from a single centre. *Reprod Biomed Online*. 2019;38(6).
75. Zhu Q, Zhu J, Wang Y, Wang B, Wang N, Yin M, et al. Live birth rate and neonatal outcome following cleavage-stage embryo transfer versus blastocyst transfer using the freeze-all strategy. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2019;38(6):892–900. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.12.034>
 76. Wang S, Chen L, Fang J, Jiang W, Zhang N. Comparison of the pregnancy and obstetric outcomes between single cleavage-stage embryo transfer and single blastocyst transfer by time-lapse selection of embryos. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2019;35(9):792–5. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1594762>
 77. Holden EC, Kashani BN, Morelli SS, Alderson D, Jindal SK, Ohman-Strickland PA, et al. Improved outcomes after blastocyst-stage frozen-thawed embryo transfers compared with cleavage stage: a Society for Assisted Reproductive Technologies Clinical Outcomes Reporting System study. *Fertil Steril* [Internet]. 2018;110(1):89–94.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.033>
 78. De Vos A, Santos-Ribeiro S, Van Landuyt L, Van de Velde H, Tournaye H, Verheyen G. Birthweight of singletons born after cleavage-stage or blastocyst transfer in fresh and warming cycles. *Hum Reprod*. 2018;33(2):196–201.
 79. Zhang J, Wang Y, Liu H, Mao X, Chen Q, Fan Y, et al. Effect of in vitro culture period on birth weight after vitrified-warmed transfer cycles: analysis of 4,201 singleton newborns. *Fertil Steril* [Internet]. 2018;111(1):97–104. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.006>
 80. Li W, Xue X, Zhao W, Ren A, Zhuo W, Shi J. Blastocyst transfer is not associated with increased unfavorable obstetric and perinatal outcomes compared with cleavage-stage embryo transfer. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2017;33(11):857–60. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1332175>
 81. Ginström Ernstad E, Bergh C, Khatibi A, Källén KBM, Westlander G, Nilsson S, et al. Neonatal and maternal outcome after blastocyst transfer: A population-based registry study Presented orally at the 36th Society for Maternal-Fetal Medicine Annual Pregnancy Meeting, Atlanta, GA, Feb. 1-6, 2016. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016;214(3):378.e1-378.e10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.12.040>

82. Kaartinen NM, Kananen KM, Rodriguez-Wallberg KA, Tomás CM, Huhtala HS, Tinkanen HI. Male gender explains increased birthweight in children born after transfer of blastocysts. *Hum Reprod.* 2015;30(10):2312–20.
83. Sotiroska V, Petanovski Z, Dimitrov G, Hadji-Lega M, Shushleski D, Saltirovski S, et al. The day of embryo transfer affects delivery rate, birth weights, female-to-male ratio, and monozygotic twin rate. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2015;54(6):716–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tjog.2015.06.011>
84. Oron G, Sokal-Arnon T, Son WY, Demirtas E, Buckett W, Zeadna A, et al. Extended embryo culture is not associated with increased adverse obstetric or perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2014;211(2):165.e1-165.e7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2014.03.018>
85. Zhu J, Lin S, Li M, Chen L, Lian Y, Liu P, et al. Effect of in vitro culture period on birthweight of singleton newborns. *Hum Reprod.* 2014;29(3):448–54.
86. De Vos A, Janssens R, VandeVelde H, Haentjens P, Bonduelle M, Tournaye H, et al. The type of culture medium and the duration of in vitro culture do not influence birthweight of ART singletons. *Hum Reprod.* 2014;30(1):20–7.
87. Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2014;20(3):439–48.
88. Mäkinen S, Söderström-Anttila V, Vainio J, Suikkari AM, Tuuri T. Does long in vitro culture promote large for gestational age babies? *Hum Reprod.* 2013;28(3):828–34.
89. Fernando D, Halliday JL, Breheny S, Healy DL. Outcomes of singleton births after blastocyst versus nonblastocyst transfer in assisted reproductive technology. *Fertil Steril* [Internet]. 2012;97(3):579–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.12.032>
90. Martin L, Frapsauce C, Royère D, Guérif F. Devenir des grossesses uniques après transfert au stade blastocyste : comparaison avec les transferts précoces. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012;40(5):291–5.
91. Schwärzler P, Zech H, Auer M, Pfau K, Göbel G, Vanderzwalmen P, et al. Pregnancy outcome after blastocyst transfer as compared to early cleavage stage embryo transfer. *Hum Reprod.* 2004;19(9):2097–102.
92. Kausche A, Jones GM, Trounson AO, Figueiredo F, MacLachlan V, Lolatgis N.

- Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. *Fertil Steril*. 2001;76(4):688–93.
93. Morbeck DE, Baumann NA, Oglesbee D. Composition of single-step media used for human embryo culture. *Fertil Steril* [Internet]. 2017;107(4):1055–1060.e1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.01.007>
 94. Marianowski P, Dąbrowski FA, Zyguła A, Wielgoś M, Szymusik I. Do We Pay Enough Attention to Culture Conditions in Context of Perinatal Outcome after In Vitro Fertilization? Up-to-Date Literature Review. *Biomed Res Int*. 2016;2016:1–6.
 95. Martins WP, Nastri CO, Rienzi L, van der Poel SZ, Gracia C, Racowsky C. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;49(5):583–91.
 96. R. Hernández Sampieri, C. Fernández Collado PBL. Metodología de la Investigación. 6a edición. Mc Graw Hill, editor. 2014.
 97. Kushnir VA, Barad DH, Albertini DF, Darmon SK, Gleicher N. Systematic review of worldwide trends in assisted reproductive technology 2004-2013. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2017;15(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12958-016-0225-2>
 98. Wilcox AJ. On the importance-and the unimportance-of birthweight. *Int J Epidemiol*. 2001;30(6):1233–41.
 99. Barker DJP. Birth weight and hypertension. *Hypertension*. 2006;48(3):357–8.
 100. Dunietz GL, Holzman C, Zhang Y, Talge NM, Li C, Todem D, et al. Assisted reproductive technology and newborn size in singletons resulting from fresh and cryopreserved embryos transfer. *PLoS One*. 2017;12(1):1–13.
 101. Koudstaal J. Obstetric outcome of singleton pregnancies after IVF: a matched control study in four Dutch university hospitals. *Hum Reprod*. 2000;15(8):1819–25.
 102. Wennerholm UB, Henningsen AKA, Romundstad LB, Bergh C, Pinborg A, Skjaerven R, et al. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: A Nordic cohort study from the CoNARTaS group. *Hum Reprod*. 2013;28(9):2545–53.

103. Pinborg A, Henningsen AA, Loft A, Malchau SS, Forman J, Andersen AN. Large baby syndrome in singletons born after frozen embryo transfer (FET): Is it due to maternal factors or the cryotechnique? *Hum Reprod.* 2014;29(3):618–27.
104. Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S, Maheshwari A. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from ivf/icsi: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2012;18(5):485–503.
105. Kozuki N, Lee AC, Silveira MF, Sania A, Vogel JP, Adair L, et al. The associations of parity and maternal age with small-for-gestational-age, preterm, and neonatal and infant mortality: A meta-analysis. *BMC Public Health.* 2013;13(SUPPL.3).
106. Rosenberg TJ, Garbers S, Lipkind H, Chiasson MA. Maternal obesity and diabetes as risk factors for adverse pregnancy outcomes: Differences among 4 racial/ethnic groups. *Am J Public Health.* 2005;95(9):1545–51.
107. Cogswell ME, Serdula MK, Hungerford DW, Yip R. Gestational weight gain among average-weight and overweight women - What is excessive? *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(2 PART 1):705–12.
108. To WWK, Cheung W, Kwok JSY. Paternal height and weight as determinants of birth weight in a Chinese population. *Am J Perinatol.* 1998;15(9):545–8.
109. Morrison J, Williams GM, Najman JM, Andersen MJ. The Influence of Paternal Height and Weight on Birth-weight. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 1991;31(2):114–6.
110. McCormick MC, Brooks Gunn J, Workman Daniels K, Turner J, Peckham GJ. The Health and Developmental Status of Very Low—Birth-Weight Children at School Age. *JAMA J Am Med Assoc.* 1992;267(16):2204–8.
111. Imudia AN, Awonuga AO, Doyle JO, Kaimal AJ, Wright DL, Toth TL, et al. Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclâmpsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril [Internet].* 2012;97(6):1374–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.03.028>
112. Pereira N, Elias RT, Christos PJ, Petrini AC, Hancock K, Lekovich JP, et al. Supraphysiologic estradiol is an independent predictor of low birth weight in full-term singletons born after fresh embryo transfer. *Hum Reprod.* 2017;32(7):1410–7.

113. Young LE, Sinclair KD, Wilmut I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod.* 1998;3(3):155–63.
114. Rivera RM, Stein P, Weaver JR, Mager J, Schultz RM, Bartolomei MS. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet.* 2008;17(1):1–14.
115. Chason RJ, Csokmay J, Segars JH, Decherney AH, Armant R. Embryo Metabolism and Development. 2012;22(10):412–20.
116. Schwarzer C, Esteves TC, Araúzo-Bravo MJ, Le Gac S, Nordhoff V, Schlatt S, et al. ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses. *Hum Reprod.* 2012;27(9):2627–40.

ANEXO I

FERTILIZAÇÃO IN VITRO OU MICROINJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZOIDES

Consentimento Informado

As técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA) são um conjunto de métodos clínicos e laboratoriais entre cujos objetivos se inclui o aumento significativo da probabilidade de um casal infértil conseguir a gravidez que procura.

A Fertilização *In Vitro* (FIV) e a Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection) têm indicações definidas e a sua utilização deve obedecer, por isso, a critérios clínicos rigorosos, não estando indicadas em todos os casos de infertilidade.

De um modo simplificado, estas técnicas incluem os seguintes passos:

- Estimulação do desenvolvimento e maturação das células reprodutoras femininas – os ovócitos – através do recurso a medicamentos injetáveis; a resposta dos ovários a estes medicamentos é variável de mulher para mulher e é controlada com análises e/ou ecografias com intervalos a definir caso a caso.
- Punção dos ovários para recolha (aspiração) de ovócitos (é efetuada por via vaginal, sob anestesia local ou sedação).
- Recolha de células reprodutoras masculinas – os espermatozoides.
- Procedimentos laboratoriais que têm como objetivo a fecundação dos ovócitos pelos espermatozoides e consequente formação de embriões.
- Transferência de embriões para o útero - o número de embriões a transferir é variável de acordo com a situação concreta de cada casal, podendo ser 1 ou 2 (e, em casos muito excecionais, um máximo de 3).

Alguns pontos fundamentais merecem ser salientados:

- Por razões várias, pode haver necessidade de interromper o ciclo de tratamento antes da punção para obtenção dos ovócitos, a mais frequente das quais é a resposta deficiente dos ovários à medicação.
- Em situações raras, a estimulação dos ovários pode desencadear uma resposta excessiva, dando origem à designada “síndrome de hiperestimulação ovárica”, que, em certas circunstâncias, pode atingir uma intensidade que obrigue a um tratamento específico em regime de internamento e, em situações verdadeiramente excecionais, pode colocar a vida em risco.
- A administração de medicamentos para sedação ou anestesia pode provocar reações individuais inesperadas, de tipo alérgico ou outro.
- Sendo a colheita dos ovócitos um ato cirúrgico, da sua execução podem, em casos muito raros, resultar complicações (por exemplo, hemorragias ou infeções) que justifiquem internamento hospitalar e que, em circunstâncias verdadeiramente excecionais, podem mesmo colocar a vida em risco.
- Nenhuma destas técnicas garante a obtenção de gravidez, sendo a taxa de sucesso muito variável, nomeadamente em função da realidade clínica dos dois membros do casal.
- As gestações resultantes destas técnicas estão sujeitas a complicações como quaisquer outras, incluindo a implantação do embrião fora do útero, como por exemplo numa trompa.
- Uma incidência ligeiramente aumentada de malformações nos recém-nascidos resultantes destas técnicas não pode ser excluída.

- A transferência de mais do que um embrião aumenta a probabilidade de gravidez múltipla; estas gestações constituem um maior risco para os recém-nascidos, nomeadamente pela maior possibilidade de parto pré-termo.
- Não é possível prever com segurança a proporção dos ovócitos que fecundarão em cada ciclo de tratamento. No caso de se tentar a fecundação de mais ovócitos do que o número de embriões que se pretende transferir para o útero, existe a possibilidade de resultarem mais embriões viáveis do que os que poderão ser transferidos. Todos os embriões viáveis não transferidos serão criopreservados. De acordo com a escolha do casal, os embriões criopreservados poderão ser utilizados posteriormente pelo casal, ou doados a outras pessoas beneficiárias e/ou para investigação científica. Na ausência de qualquer uma destas opções e, sem prejuízo do alargamento do prazo de criopreservação dos embriões por um novo período de três anos, decorrido o prazo de três ou seis anos previsto na Lei, os embriões serão descongelados e eliminados. Em alternativa, o casal poderá optar por aceitar que se tente fecundar apenas tantos ovócitos quantos os embriões que, de acordo com a boa prática médica, possam vir a ser transferidos para o útero. Esta opção, no entanto, levará provavelmente à obtenção de um número menor (ou mesmo ausência) de embriões para transferir e, por isso, a uma menor taxa de gravidez.
- Nos termos do n.º 3 do artigo 22.º da Lei n.º 32/2006, de 26 de julho, em caso de falecimento do parceiro masculino do casal durante o tratamento, é permitida a transferência de embriões desde que tenha sido previamente estabelecido, através de declaração escrita, que é esse o desejo do pai para permitir a concretização de um projeto parental claramente definido.

CONSENTIMENTO

Nós, abaixo assinados, declaramos que:

- Lemos e compreendemos este documento, tal como as informações verbais e escritas que nos foram fornecidas, incluindo a informação sobre os custos do tratamento.
- Sempre que a recolha de esperma seja efetuada fora das instalações do centro, a amostra deverá ser obrigatoriamente entregue pelo originário do produto biológico.
- Foram esclarecidas as dúvidas e respondidas as perguntas por nós colocadas.
- Reconhecemos que este texto não pode descrever de forma exaustiva a totalidade das situações que possam vir a ter lugar no futuro.
- Entendemos e aceitamos as condições, riscos e limitações destas técnicas, incluindo que não pode ser dada qualquer garantia quanto ao decurso e desfecho final de uma gravidez obtida por Fertilização *In Vitro* ou Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides.
- Fomos informados das taxas de sucesso da aplicação destas técnicas neste centro nos últimos dois anos.
- Compreendemos que, independentemente do número de ciclos terapêuticos, este consentimento é válido e eficaz até ser revogado por qualquer um dos membros do casal; em cada ciclo terapêutico, essa revogação só pode ser operada até à concretização da transferência embrionária.
- Fomos informados e esclarecidos dos deveres dos beneficiários previstos no artigo 13.º, n.º 2, da Lei n.º 32/2006, de 26 de julho (***“A fim de serem globalmente avaliados os resultados médico-sanitários e psicossociológicos dos processos de PMA, devem os beneficiários prestar todas as informações relacionadas com a saúde e o desenvolvimento das crianças nascidas com recurso a estas técnicas”***), pelo que assumimos o compromisso de prestar estas informações. Assim, comprometemo-nos a devolver ao centro os dois modelos de relatório médico, um a preencher pelo médico assistente, descrevendo as condições do parto e as características do recém-nascido, e um outro, preenchido pelo pediatra ou médico de família assistente, no final do primeiro ano de vida da criança, bem como a responder a quaisquer questionários sobre este tema que nos sejam enviados no futuro pelo centro.
- **Fomos informados que os dados referentes ao(s) tratamento(s) efetuado(s) e os seus resultados terão obrigatoriamente que ser registados e conservados durante 30 anos e que poderão, em regime de completo anonimato, ser utilizados em trabalhos científicos para apresentação pública e/ou publicação.**

Por isso, esclarecidos e de livre vontade, assumimos as obrigações decorrentes da celebração do presente acordo e damos o nosso consentimento para a execução de Fertilização *In Vitro* ou Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides como tratamento da nossa situação de infertilidade conjugal e para a transferência de um número máximo de _____ embrião(ões).

Mais declaramos que (escrever **Sim** ou **Não**):

Consentimos na possível criação de mais embriões do que os que serão transferidos e na criopreservação dos restantes embriões que cumpram critérios técnicos para tal.

NOME _____

ASSINATURA _____

N.º ID CIVIL/PASSAPORTE _____

NOME _____

ASSINATURA _____

N.º ID CIVIL/PASSAPORTE _____

Médica/o: _____

ANEXO II



PARECER E AUTORIZAÇÃO PARA REALIZAÇÃO DE ESTUDO

Hospital Garcia de Orta EPE
Centro de Investigação Hospital Garcia de Orta

Título: Projecto intitulado "Avaliação do peso dos recém nascidos após transferência de blastocistos comparando com os recém nascidos após transferência de embriões clivados"

Investigador Principal: Dr. Pedro Ferreira

A Comissão de Ética para a Saúde do Hospital Garcia de Orta informa que o trabalho em epígrafe obteve parecer positivo por unanimidade maioria em reunião do dia 04/02/2020.

Estiveram presentes:

Nome: Dra Natália Dias (Presidente)

Nome: Dra Ana Soares

Nome: Dra Benedita Nunes

Nome: Dra Célia Gradil

Nome: Dra Isabel Pereirinha

Nome: Dr. José Luís Metello

Nome: Dra Maria Gomes Ferreira

Nome: Dr. Miguel Rodrigues

Nome: En^q Teresa Chambel

A CES solicita ao Investigador Principal que quando da conclusão deste estudo, lhe seja enviada uma síntese dos resultados e conclusões do mesmo.

Dra. Natália Dias
Presidente da Comissão de Ética

O Estudo em epígrafe foi aprovado pelo Conselho de Administração em reunião do dia 06/02/2020.

Dra. Paula Breia
Presidente do Centro Garcia de Orta

Almada, 07 / 02 / 2020