

REPERCUSSÃO DA IDADE DA MULHER, DA TAXA DE CLIVAGEM E DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA, NA OBTENÇÃO DE GRAVIDEZ POR FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

ISABEL CORDEIRO, CARLOS CALHAZ-JORGE, MADALENA BARATA, FERNANDA LEAL, HELENA PROENÇA, A. M. PEREIRA COELHO

Unidade Pluridisciplinar de Reprodução Humana, Serviço de Ginecologia e Obstetria. Laboratório de Quimica Clínica, Serviço de Patologia Clínica. Hospital de Santa Maria. Lisboa.

RESUMO

Múltiplos factores influenciam a probabilidade de obtenção de uma gravidez através de Fertilização *in vitro* (FIV) e de transferência embrionária (TE). O objectivo deste estudo retrospectivo, foi avaliar a importância desses factores a fim de melhorar o prognóstico e o sucesso do tratamento. Foram considerados 341 ciclos consecutivos com transferência embrionária, usando o mesmo protocolo de estimulação ovárica, divididos em dois grupos: 92 ciclos em que se obteve uma gravidez clínica e 249 ciclos sem êxito. Todas as transferências de embriões foram realizadas em doentes do programa de fertilização *in vitro* da Unidade Pluridisciplinar de Reprodução Humana do Hospital de Santa Maria, Lisboa, entre Janeiro de 1991 e Dezembro de 1993. Não se encontraram diferenças significativas nos dois grupos estudados nas indicações para FIV, resposta ovárica à estimulação, qualidade do esperma, maturação ovocitária e número de ovócitos colhidos por doente. A idade das mulheres que não engravidaram era superior à das mulheres que engravidaram ($p < 0,001$), havendo um declínio na percentagem de êxito depois dos 35 anos. A taxa de fecundação ovocitária foi de 88,2% nos ciclos com gravidez e de 83,5% nos ciclos sem gravidez ($p < 0,02$). Nas mulheres que engravidaram houve um número significativamente maior de transferências em que todos os embriões transferidos tinham pelo menos quatro células às 42-43 horas pós-inseminação, quando comparadas com as mulheres que não engravidaram (82% versus 63%, $p < 0,001$). Todas as gravidezes obtidas resultaram da transferência de pelo menos um embrião com duas ou mais divisões mitóticas. Em conclusão, a transferência de 3 ou de 4 embriões de boa qualidade e com elevada taxa de clivagem teve um efeito positivo e a idade das mulheres teve um efeito negativo nas taxas de gravidez após FIV-TE.

SUMMARY

Influence of Women's Age, Cleavage Rates and Embryo Quality on the Occurrence of Pregnancy through *in vitro* Fertilization

Multiple factors influence the probability of obtaining a pregnancy through *in vitro* fertilization (IVF) and embryo transfer (ET). This retrospective study was designed to assess their importance in order to improve prognostic ability and treatment success. 341 consecutive embryo transfer cycles using the same ovarian stimulation protocol were considered and divided in two main groups: 92 cycles in which a clinical pregnancy was achieved and 249 cycles without success. All the embryo transfers were performed in patients from the *in vitro* fertilization program of the

Human Reproductive Unit, Santa Maria Hospital, Lisbon, between January 1991 and December 1993. No significant differences were found between the two groups studied concerning the IVF indications, ovarian response to the stimulation, sperm quality, oocyte maturation and mean number of oocytes retrieved per patient. The women's age was higher in the group which did not achieve a pregnancy, when compared with the pregnant group ($p < 0.001$), showing a decline of success after the age of 35. Overall oocyte fertilization rate was 88.2% in cycles with pregnancy and 83.5% in cycles without pregnancy ($p < 0.02$). In the pregnant patients, there was a significantly higher rate of embryo transfers in which all the embryos received had reached at least the four-cell stage at 42-43 hr postinsemination, compared with the non pregnant patients (82% versus 63%, $p < 0.001$). All the 92 pregnancies originated from transfers of at least one embryo that had undergone two or more mitotic divisions. In conclusion, the transfer of three or four good quality embryos and a high cleavage rate had a positive effect and age of the female partner had a negative effect on pregnancy rates after IVF-ET.

INTRODUÇÃO

Com o nascimento de Louise Brown em 1978, primeiro bebé a ser concebido por fertilização *in vitro* (FIV), iniciou-se uma nova era nas tecnologias de reprodução medicamente assistida.

Inicialmente empregue apenas em casos de infertilidade por obstrução tubária, rapidamente se tornou aparente que a fertilização *in vitro* tinha indicação como método terapêutico em outras causas de esterilidade, como a endometriose, factor masculino, esterilidade de causa desconhecida (idiopática) e esterilidade de causa imunológica.

Múltiplos factores têm sido apontados como sendo importantes para o sucesso de um ciclo terapêutico FIV, ou seja, para a obtenção de uma gravidez, nomeadamente: a etiologia da infertilidade, idade da mulher, tipo de resposta ovárica à estimulação, número de ovócitos colhidos, taxa de fecundação ovocitária e número e qualidade de embriões transferidos.

O objectivo deste estudo foi o de tentar identificar possíveis diferenças dos factores anteriormente apontados, em dois grupos de casais: casais em que houve gravidez e casais em que não houve gravidez após fertilização *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo incidiu sobre todos os ciclos FIV realizados na Unidade Pluridisciplinar de Reprodução Humana (U.P.R.H.) do HSM, de Janeiro de 1991 a Dezembro de 1993, que originaram transferência embrionária e em que se usou o mesmo protocolo de estimulação ovárica.

De um total de 341 ciclos incluídos no estudo, 92 ciclos culminaram em gravidez e 249 não originaram gravidez (percentagem de gravidez por ciclo de 27%). Das 92 gravidezes obtidas, 67 culminaram no nascimento de pelo menos 1 feto vivo, 3 resultaram em gravidezes extra-uterinas, 13 em abortos espontâneos com menos de 12 semanas de gestação, 3 em abortos espontâneos com mais de 12 semanas de gestação e num caso houve necessidade de interrupção terapêutica de gravidez. Duas gravidezes foram perdidas para *follow-up* e em três não se tem ainda conhecimento do seu desfecho.

A hiperestimulação ovárica foi induzida através de um protocolo com recurso à administração de um agonista da hormona libertadora de gonadotrofinas, protocolo longo

(Buserelina; Suprefact, Hoechst) e de gonadotrofina menopáusica humana (HMG; Humegon, Organon ou Pergonal, Serono). Todas as doentes iniciaram buserelina no 2º dia do ciclo menstrual e a HMG quando o estradiol sérico (E2) indicava supressão hipofisária adequada (valores ≤ 50 pg / ml) e na ausência de quisto ovárico com mais de 15 mm de diâmetro. Uma semana após o começo da administração da HMG, a resposta ovárica foi monitorizada diariamente através de avaliação ecográfica das dimensões dos folículos ováricos e de doseamento do estradiol sérico. Considerou-se como E2 inicial, o valor de estradiol encontrado no 1º dia de monitorização diária e E2 do dia - 1 o valor de estradiol no dia seguinte à administração da HCG. No momento adequado da estimulação foi administrada gonadotrofina coriônica humana (HCG; Pregnyl, Organon ou Profasi, Serono), destinada a induzir a completa maturação foliculo-ovocitária. 34 a 36 horas após esta administração, procedeu-se à recolha dos ovócitos, por via transvaginal com controlo ecográfico.

Os líquidos foliculares foram analisados ao microscópio e os ovócitos classificados em função do aspecto morfológico e grau de expansão e distensibilidade das células da corona radiata e cumulus: ovócitos maduros - cumulus muito expandido e corona radiata de aspecto radiante, com zona pelúcida bem visível; ovócitos imaturos - ovócitos por vezes sem cumulus, ou quando este está presente é muito denso e com corona radiata muito aderente e compacta; ovócitos pós-maturos (PM) - por vezes com ooplasma mais escuro ou de aspecto granuloso, com as células da corona radiata (que é incompleta ou irregular) e do cumulus, escuras e formando agregados; ovócitos com zona fracturada (ZF) - a membrana pelúcida apresenta uma solução de continuidade óbvia, ooplasma escurecido, muitas vezes bilobular e que extravaza os limites da zona pelúcida; ovócitos atrésicos - o ooplasma é escuro, muitas vezes de forma irregular, o espaço perivitelino é alargado e a corona radiata ausente ou muito irregular e com agregados.

Após isolamento, identificação e lavagem dos ovócitos, procedeu-se à sua incubação em meio de cultura de Inra Menezo B2 (API System, Biomerieux), numa atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂, a 37°C.

As amostras de esperma, colhidas em recipiente estéril depois da recolha ovocitária, foram submetidas a análise macroscópica (volume e liquefação) e microscópica (motilidade, concentração e morfologia). O método utilizado

para a separação dos espermatozoides móveis do esperma, foi a técnica do *swim-up*, em B2, durante 60 minutos, após duas lavagens em meio de Ham F10 (Gibco) a 400 x g. O número de espermatozoides empregues no meio de inseminação dos ovócitos foi de 60.000 a 100.000 por mililitro de meio de cultura, suplementado com 15% de soro materno inativado. Nos casos de factor masculino grave, foram usados sempre que possível um maior número de espermatozoides por ovócito (150.000 a 300.000). O diagnóstico de factor masculino foi estabelecido sempre que nas avaliações do esperma, anteriores à inclusão no programa FIV, um ou vários dos seguintes parâmetros estava presente: concentração < 20x10⁶/ml, formas móveis progressivas rápidas < 30% e/ou formas normais < 30%.

A inseminação dos ovócitos foi realizada 3 a 6 horas depois da punção folicular, igualmente em meio de Inra Menezo B2 e nas condições ambientais já referidas.

A ocorrência de fecundação foi verificada 16 a 18 horas após a inseminação, através de observação microscópica e depois de se ter feito a remoção mecânica das células do complexo cumulo-ovocitário. A presença de dois pronúcleos é indicativa de uma fecundação de aspecto normal e a detecção de três ou mais pronúcleos é indicativa de poliploidia. Todos os zigotos foram nesta fase removidos para meio de cultura fresco (B2 suplementado com soro materno) e de novo incubados a 37°C, numa atmosfera de 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂.

Aproximadamente 42 a 43 horas após inseminação, imediatamente antes da transferência embrionária para o útero materno, procedeu-se à classificação dos embriões através de nova observação microscópica, avaliando o número e regularidade dos blastómeros e eventual presença de fragmentos citoplasmáticos: qualidade 1 – blastómeros iguais, sem fragmentos; qualidade 2 – blastómeros iguais, com fragmentos no espaço perivitelino; qualidade 3 – blastómeros desiguais, sem fragmentos; qualidade 4 – blastómeros desiguais e com muitos fragmentos.

Neste estudo apenas foram consideradas as gravidezes clínicas, ou seja, sempre que houve identificação ecográfica de saco gestacional às 6-7 semanas de gravidez, ou identificação histológica de vilosidades coriais nos casos de gravidez extra uterina ou de aborto precoce.

A análise estatística foi realizada, utilizando o teste t de Student e o teste de qui-quadrado. O teste exacto de Fisher foi usado, sempre que as frequências esperadas eram inferiores a 5. Consideraram-se significativos os valores de p < 0,05.

RESULTADOS

Dos 341 ciclos FIV analisados, 92 culminaram em gravidez e 249 não obtiveram êxito, ou seja, 27% de gravidez por transferência embrionária.

A idade das mulheres que engravidaram foi inferior (31,9±3,3) à idade das que não engravidaram (33,5 ± 3,7) - p < 0,001, não havendo diferenças nos dois grupos quanto às indicações diagnósticas que determinaram o recurso à fertilização *in vitro* (Quadro 1).

Quadro 1 – Causa da infertilidade e idade das mulheres

	Ciclos com gravidez	Ciclos sem gravidez
Número de ciclos	92	249
Idade (anos), média ± DP (limites)	31,9 ± 3,3* (25 - 39)	33,5 ± 3,7 (22-42)
< 30 anos	22 (24)	38 (15)
30 - 34 anos	46 (50)	111 (45)
≥ 35 anos	24 (26)**	100 (40)
Causa da infertilidade:		
Obstrução tubária (%)	51 (55)	158 (64)
Factor masculino (%)	7 (8)	23 (9)
Endometriose (%)	10 (11)	14 (6)
Idiopática (%)	8 (9)	23 (9)
Causa mista (%)	12 (13)	28 (11)
Outras (%)	4 (4)	3 (1)

* p < 0,001; ** p < 0,02

Não se detectaram diferenças significativas entre o grupo das grávidas e o grupo das não grávidas, quando se analisou o número de dias de terapêutica com busserlina necessários para se atingir a supressão hipofisária (12,4 ± 5,3 versus 12,3 ± 5,7) e os valores de E2 inicial (357,4 ± 309,8 versus 308,9 ± 282,4). O número de ampolas de HMG usadas na hiperestimulação, a duração da estimulação, os valores de E2 no dia da administração da HCG e os valores máximos de E2 atingidos, não apresentaram igualmente diferenças significativas entre os dois grupos. 95% das mulheres que engravidaram e 88% das que não engravidaram atingiram os valores máximos de E2 no dia seguinte à administração da HCG. Esta diferença não é estatisticamente significativa (Quadro 2).

Quadro 2 – Resposta ovárica à hiperestimulação

	Nº ampolas HMG	Dias de estimulação	E2 dia da HCG	E2 máximo	Dia de E2 máximo	
					-1	-2
Grávidas	25,2 ± 8,8 ^{a)}	11,2 ± 2,4	1205,4 ± 389,9	1600,8 ± 652,8	87 (95) ^{b)}	5 (5)
Não Grávidas	26,8 ± 9,4	11,3 ± 2,2	1190,3 ± 416,5	1552,7 ± 589,1	217 (88)	29 (12)

a) os valores são média ± desvio padrão; b) os valores entre parêntesis são percentagens

Quadro 3 – Classificação morfológica dos ovócitos colhidos

	Maturos	Imaturos	P.M.	Z.F. + atrésicos	Total
Grávidas	5,7 ± 2,7 ^{a)}	0,2 ± 0,4	0,4 ± 1,0	0,8 ± 1,3	7,0 ± 3,3
Não Grávidas	5,7 ± 2,9	0,1 ± 0,3	0,4 ± 0,7	0,7 ± 1,1	6,8 ± 3,3

a) os valores são média ± desvio padrão

O número de ovócitos colhidos nas mulheres que engravidaram (7,0 ± 3,3) e nas que não engravidaram (6,8 ± 3,3), bem como o seu estadió maturativo, não foi significativamente diferente. No *Quadro 3* encontram-se discriminadas as classificações morfológicas dos ovócitos colhidos, tendo-se para o efeito englobado no mesmo grupo os ovócitos atrésicos e os ovócitos com zona fracturada, dadas as características de inviabilidade dos dois tipos de células.

No dia da punção folicular não se observaram diferenças significativas nas características dos espermatozoides entre os dois grupos estudados, quanto à presença de um ou vários dos seguintes parâmetros: concentração < 20 x 10⁶/ml, formas normais < 30% e formas móveis progressivas rápidas < 30%.

A percentagem de ovócitos fecundados no grupo das grávidas (88,2%) foi superior à percentagem de fecundação no grupo das mulheres que não engravidaram (83,5%), p < 0,02.

O número médio de embriões transferidos por ciclo (mínimo de 1 embrião, máximo de 4) foi de 2,9 ± 0,9 nos 92 ciclos que originaram gravidez e de 2,7 ± 0,9 nos 249 ciclos sem gravidez. Esta diferença não é significativa.

Nenhum dos embriões transferidos no grupo das grávidas se apresentava em fase de 2 pronúcleos, ou seja, antes da 1ª divisão mitótica, o que não aconteceu no grupo das mulheres em que não houve gravidez, em que 10 dos embriões transferidos se encontravam ainda nesta fase precoce de desenvolvimento.

Analisando o número de células dos embriões transferidos, observado às 42-43 horas após inseminação, verificou-se que em 75 das 92 (82%) transferências que originaram gravidez e em 156 das 249 (63%) transferências sem gravidez, todos os embriões transferidos tinham pelo menos 4 células - p < 0,001. Além disso, em todas as transferências em que houve gravidez, foi transferido pelo menos 1 embrião com ≥ 4 células, o que se verificou em 90% das transferências sem gravidez - p < 0,01 (*Quadro 4*).

Quadro 4 – Grau de clivagem dos embriões transferidos

Grau de clivagem às 42 - 43 horas	N.º Transferências Grávidas	N.º Transferências não Grávidas		
			N.º de embriões transferidos por caso	
	1	2	≥3	
Todos os embriões com ≥ 4 células	75 (82) ^{a)}	156 (63)		
Pelo menos 1 embrião com ≥ 4 células	92 (100) ^{**}	225 (90)		

a) os valores entre parêntesis são percentagens; * p < 0,001; ** p < 0,01

Em relação à qualidade dos embriões transferidos, em 67 das 92 (73%) transferências com gravidez e em 138 das 249 (55%) transferências sem gravidez, todos os embriões transferidos para o útero materno tinham qualidade 1 ou 3 - p < 0,01. Verificou-se igualmente uma diferença significativa entre os dois grupos (p < 0,02), quando se comparou o número de transferências em que pelo menos 1 dos embriões transferidos era de qualidade 1 ou 3 (*Quadro 5*).

Quadro 5 – Qualidade dos embriões transferidos

Qualidade dos embriões	N.º Transferências	
	Grávidas	não Grávidas
Todos os embriões de qualidade 1 ou 3	67 (73) [*]	138 (55) ^{a)}
Pelo menos 1 embrião de qualidade 1 ou 3	88 (96) ^{**}	214 (86)

a) os valores entre parêntesis são percentagens; * p < 0,01; ** p < 0,02

Quando considerámos as transferências em que todos os embriões transferidos para o útero materno apresentavam taxa de clivagem elevada (≥ 4 células) e ausência de fragmentos (qualidade 1 ou 3), verificou-se que no grupo das mulheres que engravidaram havia um número maior de transferências de 3 ou 4 embriões com estas características, quando comparado com o grupo das mulheres que não engravidaram - p < 0,001 (*Quadro 6*).

Quadro 6 – Transferências em que todos os embriões tinham ≥ 4 células e qualidade 1 ou 3 / Total de transferências

	N.º de embriões transferidos por caso			Total de Transferências
	1	2	≥3	
Grávidas	7/9	9/14	45/69 ^{**}	61/92 (66) ^{**}
Não grávidas	17/33	21/55	61/161	99/249 (40) ^{a)}

a) os valores entre parêntesis são percentagens; ** p < 0,001

DISCUSSÃO

Múltiplos factores têm sido apontados como sendo importantes no estabelecimento de gravidez por fertilização

in vitro. O objectivo deste estudo foi o de tentar identificar um ou vários parâmetros que possam constituir factores prognósticos para os casais que recorrem ao nosso programa FIV.

Dado que os diferentes protocolos de estimulação ovárica empregues diferem em termos de resposta ovárica, número de ovocitos colhidos, número de ovocitos fecundados e embriões transferidos, decidimos considerar neste estudo apenas os ciclos FIV em que se usou o mesmo protocolo de estimulação (análogo da GnRH + HMG).

Várias diferenças foram encontradas entre o grupo das mulheres que engravidaram e o grupo das mulheres que não engravidaram depois de um ciclo terapêutico FIV.

Um dos factores com maior impacte negativo na obtenção de uma gravidez é a idade avançada da mulher, verificando-se neste estudo que 40 % das mulheres que não engravidaram tinham ≥ 35 anos de idade e que apenas 26% das mulheres que engravidaram pertenciam a este grupo etário. Vários autores são unânimes em afirmar que com a idade há um declínio da taxa de gravidez,^{1,3} estando o nosso estudo em consonância com aqueles que consideram que esse declínio se verifica a partir dos 35 anos de idade^{1,2}. A falência reproductiva verificada com a idade avançada da mulher pode dever-se a factores uterinos ou ováricos (como inadequação do endométrio, diminuição da perfusão uterina, má qualidade ovocitária) ou a uma combinação de ambos. Estudos recentes tendem a sugerir que o declínio da fecundidade nos grupos etários mais avançados dependerá mais da idade dos ovocitos do que da idade do útero⁴.

Quando comparámos o tipo de resposta ovárica à hiperestimulação nos dois grupos estudados, verificámos não haver diferenças significativas nos vários parâmetros analisados, nomeadamente no número de dias de terapêutica com buserelina, número de ampolas de HMG administradas, duração da estimulação, níveis de E2 no dia da administração da HCG e os valores máximos de E2 atingidos. Num programa FIV é da maior importância determinar o dia adequado para a punção folicular, a fim de se obterem ovocitos pré-ovulatórios saudáveis, susceptíveis de serem fecundados. De acordo com a maioria das equipas, pensamos que a administração da HCG deverá ser feita idealmente no dia anterior ao pico máximo de E2. Na maioria das grávidas (95%) e nas não grávidas (88%), os níveis máximos de E2 verificaram-se no dia seguinte à administração da HCG. Contudo, em 5 das mulheres que engravidaram a HCG foi administrada numa fase de descida do E2, o que não foi portanto incompatível com o estabelecimento de uma gravidez, facto já referido por outros autores⁵.

Outra diferença encontrada entre as mulheres que engravidaram e as que não engravidaram, foi a maior taxa de fecundação ovocitária observada nas primeiras, embora não se tenham detectado diferenças significativas quer na qualidade do esperma, quer no número e qualidade dos ovocitos colhidos nos dois grupos. O facto de não se terem encontrado diferenças entre os dois grupos estudados, quanto à qualidade do esperma, poderá resultar da população sobre a qual incidiu o nosso estudo: apenas foram considerados os ciclos FIV que chegaram à fase de

transferência de embriões para o útero materno, tendo sido excluídos à partida todos os casos em que não ocorreu fecundação, por espermatozoides muito deficientes. É nossa convicção que muito embora não se tendo observado diferenças significativas na classificação morfológica dos ovocitos, a maior fecundabilidade dos ovocitos das mulheres que engravidaram, resulta de uma melhor qualidade dos ovocitos neste grupo. Com efeito, o critério de classificação utilizado para avaliar o grau de maturidade dos ovocitos, baseado no aspecto morfológico do complexo cumulo-ovocitário, para além de subjectivo, pode por vezes induzir em erro: na nossa experiência já foi possível detectar às 17 horas após inseminação ovocitos com vesícula germinativa e que no entanto apresentavam um complexo cumulo-ovocitário com características compatíveis com um ovocito pré-ovulatório (Metafase II) na altura da aspiração folicular. Outros autores têm feito referência a esta discrepância entre o aspecto morfológico observado e a qualidade real do ovocito^{6,7}. Por exemplo, é sabido que os primeiros sinais de atresia se verificam dentro do folículo ovárico muito antes que possam ser detectados no complexo cumulo-ovocitário e que só numa fase tardia da atresia é que o ovocito apresenta sinais claros de degenerescência⁷.

Entre as várias causas de falência da implantação dos embriões humanos obtidos por FIV, sem dúvida que uma das mais difíceis de avaliar será a viabilidade embrionária. Na verdade, ao transferirmos para o útero materno embriões com 2, 4 ou mais blastómeros não sabemos da sua posterior capacidade de desenvolvimento in útero. Por este motivo, decidimos avaliar neste estudo não apenas o número de embriões transferidos, mas também o número de células presentes e a qualidade.

Vários autores têm referido que a taxa de gravidez aumenta quando se transfere um maior número de embriões para a cavidade uterina^{1,8,9}. Embora durante o período em que incidiu o nosso estudo (1991 a 1993) não tenhamos encontrado diferença significativa no número de embriões transferidos, entre as mulheres que engravidaram e as que não engravidaram, é possível afirmar que na nossa experiência há uma tendência para que se verifique aumento da taxa de gravidez, quando se transfere mais do que um embrião. Na realidade, desde o início do funcionamento da U.P.R.H.(1987) até final de 1993, verificámos que a taxa global de gravidez foi de 13,4% após a transferência de apenas 1 embrião e de 30,5% quando se transferiram 3 ou 4 embriões - $p < 0,01$ (dados não publicados).

Quando analisámos o número de células dos embriões transferidos (observação feita às 42 a 43 horas após inseminação), encontrámos uma clara relação entre a taxa de clivagem embrionária e o estabelecimento de gravidez. Em todas as transferências que originaram gravidez, pelo menos 1 dos embriões transferidos tinha 4 ou mais blastómeros e o número de transferências em que todos os embriões transferidos tinham 4 ou mais blastómeros foi maior nas mulheres que engravidaram (82%) do que naquelas que não engravidaram (63%). Estes resultados estão de acordo com outros autores⁸⁻¹⁰ que também consideram que os embriões com pelo menos duas divisões

mitóticas terão maior capacidade de implantação do que os embriões com apenas duas células.

Outro dos factores que no nosso estudo parece ter contribuído para o estabelecimento de uma gravidez, foi a qualidade dos embriões transferidos para o útero materno. As mulheres que engravidaram têm um maior número de transferências com pelo menos um embrião de qualidade 1 ou 3 e um maior número de transferências em que todos os embriões transferidos tinham qualidade 1 ou 3. Embora a presença de fragmentos citoplasmáticos nos embriões transferidos não exclua à partida a possibilidade de uma gravidez, sem dúvida que a sua detecção é um sinal de mau prognóstico. Estes dados estão de acordo com outros autores que corroboram a opinião de que a probabilidade de obtenção de uma gravidez por FIV aumenta quando se transferem embriões de boa qualidade^{8,11,12}, havendo portanto uma correlação entre o aspecto morfológico dos embriões e a sua qualidade intrínseca.

Finalmente, quando comparámos o número de transferências em que todos os embriões tinham 4 ou mais blastómeros e ausência de fragmentos citoplasmáticos, verificámos que nas mulheres que engravidaram há um número maior de transferências de 3 ou 4 embriões com estas características ($p < 0,001$). Ou seja, a presença de múltiplos embriões de boa qualidade e em fase avançada de divisão celular, influencia significativamente o estabelecimento de uma gravidez por fertilização *in vitro*. Perante estes resultados, deverá ser feita a reavaliação de eventuais factores que possam impedir a implantação, em todos os casais com várias tentativas FIV falhadas e com transferências de múltiplos embriões de boa qualidade. Por outro lado, os casais com tentativas FIV falhadas em que persistentemente todos os embriões foram de má qualidade, deverão ser informados de que poderão ter um problema a nível de gâmetas e que a probabilidade de êxito é menor. A nossa experiência parece apontar para uma certa semelhança na qualidade embrionária, em tentativas FIV repetidas.

Em conclusão, o nosso estudo revelou que a idade das pacientes teve um valor prognóstico negativo na ocorrência das gravidezes, enquanto que a transferência de múltiplos embriões de boa qualidade e elevada taxa de clivagem teve um efeito prognóstico positivo.

BIBLIOGRAFIA

1. WOOD C, McMASTER R, RENNIE G, TROUNSON A, LEETON J: Factors influencing pregnancy rates following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1985; 43:245
2. STEPTOE PC, EDWARDS RG, WALTERS DE: Observations on 767 clinical pregnancies and 500 births after human in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1986; 1:89
3. HUGHES EG, KING C, WOODE C: A prospective study of prognostic factors in in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1989; 51:838
4. ABDALLA HI, BURTON G, KIRKLAND A, JOHNSON M R, LEONARD T, BROOKS A A, STUDD J W W: Age, pregnancy and miscarriage: uterine versus ovarian factors. *Hum Reprod* 1993; 8:1512.
5. METTLER L, MICHELMANN H W: Estradiol values under gonadotropin stimulation in relation to the outcome of pregnancies in in vitro fertilization and embryo transfer. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4: 303
6. VEECK L L: Morphological estimation of mature oocytes and their preparation for insemination. In: *In vitro fertilization*, Norfolk, ed. Jones H J, Jones G S, Hodgen G D, Rosenwaks Z, Baltimore, Williams and Wilkins 1986; 81
7. PLACHOT M, MANDELBAUM J: Gamete quality in human in vitro fertilization. *Acta Europaea Fertilitatis* 1984; 15: 431
8. STAESSEN C, CAMUS M, BOLLEN N, DEVROEY P, VAN STEIRTEGHEM A C: The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992; 57:626
9. CLAMAN P, ARMANT D R, SEIBEL M M, WANG T A, OSKOWITS SP, TAYMOR M L: The impact of embryo quality and quantity on implantation and the establishment of viable pregnancies. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1987; 4:218
10. MORH L R, TROUNSON A O, LETON J F, WOOD C: Evaluation of normal and abnormal human embryo development. In: *Fertilization of human egg in vitro*, ed. Beier H M, Lindner H R, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo 1983; 211
11. SCOTT R T, HOFMMAN G E, VEECK L L, JONES H W, MUASHER S J: Embryo quality and pregnancy rates in patients attempting pregnancy through in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991; 55:426
12. ERENUS M, ZOUVES C, RAJAMAHENDRAN P, LEUNG S, FIUKER M, GOMEL V: The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991; 56:707