

Oscar Barbosa Duarte Filho

**CONGELAMENTO DE TODOS OS EMBRIÕES EM CICLOS DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM MULHERES COM RESPOSTA
NORMAL À INDUÇÃO DA OVULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

São Paulo

2019

Oscar Barbosa Duarte Filho

**CONGELAMENTO DE TODOS OS EMBRIÕES EM CICLOS DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM MULHERES COM RESPOSTA
NORMAL À INDUÇÃO DA OVULAÇÃO**

Dissertação apresentada à Faculdade
Israelita de Ciências da Saúde Albert
Einstein para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

São Paulo

2019

Duarte Filho, Oscar Barbosa

Congelamento de todos os embriões em ciclos de fertilização in vitro em mulheres com resposta normal à indução da ovulação / Oscar Barbosa Duarte Filho. -- São Paulo, 2019.
x, 50 f.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Freezing all embryos in fertilization in vitro cycles in women with normal response to ovulation induction.*

1. Fertilização in vitro. 2. Transferência embrionária. 3. Criopreservação. 5. Indução da ovulação. 6. Síndrome de hiperestimulação ovariana.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

Oscar Barbosa Duarte Filho

**CONGELAMENTO DE TODOS OS EMBRIÕES EM CICLOS DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM MULHERES COM RESPOSTA NORMAL
À INDUÇÃO DA OVULAÇÃO**

Presidente da banca: Prof. Dr. Sérgio Podgaec

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:

Prof. Dr. Adolfo Wenjaw Liao

Prof. Dr. Maurício Simões Abrão

Prof. Dr. Sidney Glina

Membros suplentes:

Prof. Dr. Eduardo Juan Troster

Prof. Dr. Dani Ejzenberg

Prof. Dr. Carlos Roberto Izzo

Aprovada em: 12/12/2019.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Oscar Barbosa Duarte e Nelly de Oliveira Duarte e irmãos José Reinaldo, Andréa e Isadora pela participação ativa em minha formação como pessoa e como médico. À minha esposa Cynthia e filhos Arthur, Alice e Nicholas pelo apoio e compreensão, especialmente pelo tempo que deixamos de estar juntos.

Agradecimentos

Agradeço à toda equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein por todo apoio durante a elaboração deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Podgaec pela ajuda em todas as etapas deste processo.

Agradeço às clínicas de reprodução humana envolvidas, Projeto ALFA e Vidabemvinda, e, especialmente às embriologistas Françoise Elia Mizrahi e Joyce Fioravante, por serem tão solícitas quando do levantamento dos dados.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de tabelas	viii
Resumo	ix
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Fertilização <i>in vitro</i> : número de óvulos e chances de gravidez.....	11
1.2 Congelamento de embriões: a técnica de vitrificação	11
1.3 Ciclo fresco <i>versus</i> congelamento de todos os embriões (<i>freeze-all</i>).....	2
1.4 <i>Freeze-all</i> em pacientes com resposta alta à indução da ovulação	5
1.5 <i>Freeze-all</i> em pacientes com resposta normal à indução da ovulação	8
1.6 <i>Freeze-all</i> em pacientes com resposta baixa à indução da ovulação.....	13
1.7 Objetivo	14
2 MÉTODOS	15
2.1 Tipo de estudo e local de realização da pesquisa	15
2.2 Aspectos e procedimentos éticos envolvidos	15
2.3 Dinâmica do estudo	15
2.4 Cálculo amostral	16
2.5 Descrição das variáveis observadas	16
2.6 Análise estatística.....	18
2.6.1 Análise descritiva das variáveis	18
2.6.2 Análises de associação: modelos de regressão logística.....	18
2.6.3 Análises de associação: modelo de pareamento por escore de propensão	19
2.6.3.1 Análise preliminar	19
3 RESULTADOS	21
3.1 Descrição dos dados	21
3.2 Regressão logística: variáveis associadas ao desfecho primário	25
3.3 Pareamento dos grupos: método pelo escore de propensão	27
4 DISCUSSÃO	31
5 CONCLUSÕES	43
6 REFERÊNCIAS	44
Abstract	
Bibliografia consultada	

Lista de tabelas

Tabela 1. Análise descritiva das características clínicas segundo os grupos	22
Tabela 2. Análise descritiva das características no laboratório de fertilização <i>in vitro</i> segundo os grupos	23
Tabela 3. Dados relativos ao congelamento e descongelamento dos ciclos no grupo <i>freeze-all</i>	24
Tabela 4. Descrição dos dados de transferência embrionária e desfechos clínicos, segundo os grupos	25
Tabela 5. Associação entre idade da mulher e o número de óvulos maduros, número de embriões formados e proporção de embriões e boa qualidade.....	25
Tabela 6. Regressão logística simples para as variáveis explicativas em relação ao desfecho primário “gestação clínica”	26
Tabela 7. Regressão logística múltipla para probabilidade estimada de ocorrência do desfecho primário “gestação clínica” dividido para os grupos <i>freeze-all</i> e <i>fresco</i>	27
Tabela 8. Descrição das características dos grupos após pareamento	28
Tabela 9. Desfechos na amostra pareada por grupos, sem distinção do estágio em que foi realizada transferência embrionária.....	29
Tabela 10. Desfechos na amostra pareada por grupos, para embriões em estágio de clivagem	30
Tabela 11. Desfechos na amostra pareada por grupos, para embriões em estágio de blastocistos.....	30

Resumo

Introdução: A prática clínica mais comum em ciclos de fertilização *in vitro* é a transferência de embriões a fresco, ou seja, no mesmo ciclo da indução da ovulação. Essa estratégia aumenta o risco de síndrome de hiperestimulação ovariana e de desfechos obstétricos e perinatais desfavoráveis, como restrição de crescimento fetal e baixo peso ao nascer. Pode ainda alterar a receptividade endometrial e impactar negativamente nas taxas de implantação embrionária. Com a técnica atual de congelamento embrionário, chamada de vitrificação, as taxas de sobrevivência embrionária após o descongelamento são superiores a 90% e as taxas de gravidez semelhantes à da transferência a fresco, especialmente em casos de alta resposta à indução da ovulação. A fim de se evitar ou minimizar esses efeitos adversos inerentes à transferência de embriões a fresco, todos os embriões podem ser congelados após a indução da ovulação para descongelamento e transferência *a posteriori*, estratégia conhecida como *freeze-all*. **Objetivo:** Comparar a taxa de gestação clínica de ciclos de fertilização *in vitro* em pacientes com resposta normal à indução da ovulação (4 a 15 óvulos maduros captados por ciclo) que realizaram transferência a fresco ou *freeze-all*. **Métodos:** Estudo de coorte retrospectivo, no qual foram analisados prontuários e banco de dados de centros privados de reprodução humana entre os anos de 2013 e 2017 envolvendo mulheres submetidas a tratamentos de fertilização *in vitro* com resposta normal à estimulação ovariana. Os grupos foram pareados pelo método de escore de propensão e balanceados para idade e número de óvulos. **Resultados:** Foram analisados 3679 ciclos de fertilização *in vitro*, sendo 3208 ciclos com transferência fresco e 471 ciclos com *freeze-all*. A média etária geral foi de 35,26 anos e o número médio de óvulos foi de 7,53. As pacientes que foram submetidas a estratégia de *freeze-all* eram mais jovens e tiveram mais óvulos maduros coletados. Quando pareados para idade da mulher e número de óvulos maduros pelo método de escore de propensão, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação à taxa de gestação clínica, tendo sido de 32,5% para o Grupo a Fresco e 32,3% para o Grupo *Freeze-all* ($p=0,936$), independente do estágio de desenvolvimento do embriões transferidos. **Conclusão:** Quando ajustado para idade da mulher e número de óvulos obtidos, não houve diferença estatisticamente

significante para as taxas de gravidez clínica entre as pacientes que realizaram transferência a fresco e as que utilizaram a estratégia de *freeze-all*.

Descritores: Fertilização in vitro; Transferência embrionária; Criopreservação; Indução da ovulação; Síndrome de hiperestimulação ovariana

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fertilização *in vitro*: número de óvulos e chances de gravidez

O termo fertilização *in vitro* foi introduzido na Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos no ano de 1979. É uma técnica de reprodução assistida que consiste na manipulação de óvulos e espermatozoides em laboratório com o intuito de fertilização.⁽¹⁾ O primeiro nascimento de fertilização *in vitro* em humanos aconteceu em 1978, na Inglaterra. Desde então mais de sete milhões de bebês já nasceram com o uso dessa técnica.^(2,3)

A partir da década de 80, teve início a utilização de drogas para estimulação ovariana, visando a obtenção de múltiplos óvulos e embriões. O objetivo é aumentar as chances de gravidez por ciclo e também as chances cumulativas de gravidez, isto é, somando-se as chances acumuladas em várias transferências utilizando-se embriões oriundos de uma mesma indução de ovulação.^(4,5)

Recente estudo multicêntrico retrospectivo de Polyzos et al. incluiu dados de quase 15 mil mulheres realizando ciclos de fertilização *in vitro*. Os autores demonstraram que a taxa de nascido-vivo aumenta gradativamente de acordo o número de óvulos obtidos com a estimulação. Acima de 20 óvulos, embora a chance de se conseguir um nascido-vivo com a transferência embrionária a fresco comece a cair, a taxa cumulativa continua a subir.⁽⁶⁾

1.2 Congelamento de embriões: a técnica de vitrificação

Para que se possa fazer uso dos embriões excedentes e aumentar a taxa de gravidez cumulativa é necessário um bom resultado com o congelamento de embriões. O primeiro nascimento com embriões descongelados foi em 1983, na Austrália. Durante os 25 anos que se seguiram, a técnica utilizada foi o congelamento lento, que consistia em utilizar crio protetores em baixa concentração e redução lenta da temperatura. O processo envolvia várias etapas, levava horas e demandava uso de ampla estrutura e equipamentos, como congeladores especificamente programados para isso.^(7,8)

Atualmente a técnica de congelamento embrionário mais utilizada é a vitrificação. Ela consiste no uso de crio-protetores em alta concentração e na redução ultrarrápida da temperatura do material biológico a ser preservado. Desse modo, forma-se um material espesso que lembra um vidro. É um processo que demanda poucos materiais e infraestrutura, sendo por isso mais simples do que o congelamento lento.^(9,10)

A taxa de sobrevivência embrionária por essa técnica nos dias atuais é superior a 90%. A taxa de gravidez é semelhante à da transferência a fresco, por volta de 50% por transferência embrionária, em casos de bom prognóstico reprodutivo e com boa resposta à indução da ovulação.⁽¹¹⁻¹⁷⁾

Os excelentes resultados clínicos da vitrificação são explicados pela menor formação de cristais de gelo intracelulares quando comparado ao congelamento lento: os cristais de gelo danificam a célula, especialmente o fuso mitótico, sendo os embriões em estágio de blastocisto e os óvulos, por terem mais água em sua composição, os maiores beneficiados por essa técnica.⁽¹⁸⁾

Os bons resultados da vitrificação levaram ao aumento do número de transferências de embriões descongelados. Pesquisa *online* realizada com especialistas de vários países mostrou que 85,2% das clínicas oferecem transferência de embriões descongelados rotineiramente aos seus pacientes.⁽¹⁹⁾

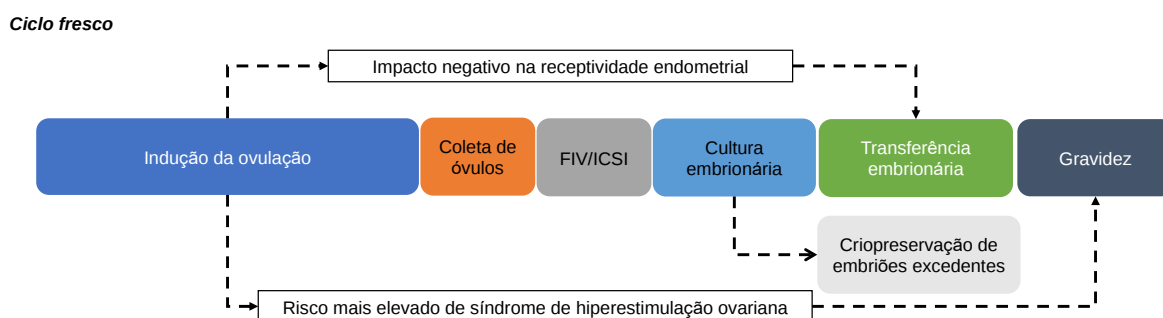
Nos Estados Unidos, por exemplo, o número de ciclos realizados para congelar todos os óvulos ou embriões sem transferência a fresco aumentou de menos de 10 mil casos em 2007 para 65.840 em 2016, o que representou cerca de 25% total de 262.643 ciclos de estimulação com coleta de óvulos.⁽²⁰⁾

1.3 Ciclo fresco *versus* congelamento de todos os embriões (*freeze-all*)

Embora os resultados de sobrevivência ao descongelamento e de gravidez com o uso de embriões descongelados sejam satisfatórios, a prática clínica corrente na América Latina, Europa e Estados Unidos, como se pode observar nos respectivos reportes nacionais, ainda é transferir embriões a fresco, ou seja, no mesmo ciclo em que ocorre a estimulação ovariana.⁽²⁰⁻²²⁾

A indução da ovulação dura em média 10 dias. Em geral são realizados cinco exames de ultrassonografia para controle da ovulação. Os óvulos são

coletados 36 horas após, em ambiente cirúrgico, com anestesia geral endovenosa. No mesmo dia da coleta os óvulos são fertilizados, por fertilização *in vitro* clássica (FIV) ou por injeção intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI). Os embriões formados são cultivados entre dois e sete dias. A transferência embrionária para o útero é feita por via vaginal, em ambiente ambulatorial e guiada por ultrassonografia. De nove a 14 dias depois já é possível saber se o ciclo resultou ou não em gravidez. Os embriões excedentes são congelados para o futuro. Nessa estratégia, a proximidade temporal entre os efeitos da indução da ovulação com a transferência embrionária pode trazer impacto negativo na receptividade endometrial e aumentar o risco de síndrome de hiperestimulação ovariana, caso ocorra gravidez. A figura 1 ilustra como essas etapas estão concatenadas no ciclo fresco e quais seriam as desvantagens dessa estratégia.



As caixas de texto brancas citam as desvantagens da indução da ovulação sobre a transferência embrionária a fresco e sobre eventual futura gestação.

Figura 1. Ciclo de fertilização *in vitro* com transferência de embriões a fresco

A realização da transferência a fresco pode elevar o risco de síndrome de hiperestimulação ovariana. Essa síndrome é deflagrada pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) oriunda de fonte exógena e aplicada ao final da estimulação ovariana. Pode ser perpetuada pelo hCG endógena, produzida pelo tecido trofoblástico da eventual gestação que irá ocorrer no mesmo ciclo caso se transfira os embriões a fresco. A síndrome de hiperestimulação ovariana é uma complicação potencialmente grave, caracterizada pela redistribuição de líquido do espaço intravascular para o extra vascular, podendo levar a ascite, derrame pleural e pericárdico, insuficiência renal, respiratória e cardíaca, eventos tromboembólicos e óbito. Embora essa síndrome possa acometer qualquer paciente, é mais comum nas mulheres até 35 anos, na presença de ovários com morfologia policística, em ciclos nos quais se utilizou doses de gonadotrofinas exógenas superiores a 150UI por dia

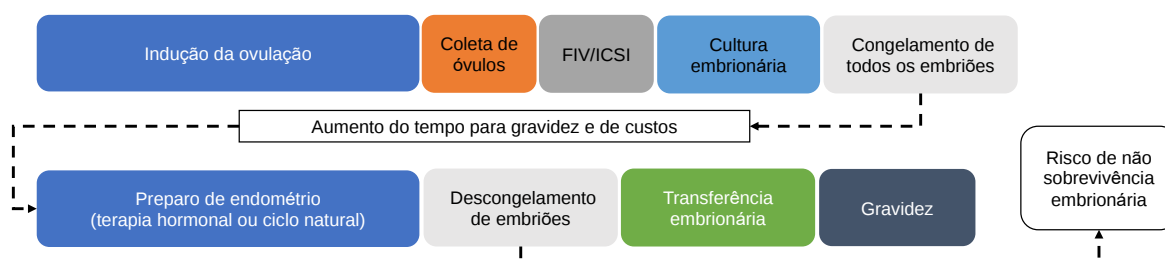
para indução da ovulação e naqueles em se observam mais de 15 folículos dominantes (diâmetro médio superior a 10mm na ultrassonografia pélvica) durante a estimulação ovariana.^(23,24)

Quando a transferência é feita a fresco, além do risco de hiperestimulação ovariana, a elevação dos níveis de estrogênicos associado ao uso de indutores da ovulação também pode prejudicar a receptividade endometrial e as taxas de implantação embrionária.^(25,26)

Portanto, outra vantagem de não se transferir embriões a fresco seria um possível aumento nas chances de gravidez, por permitir a transferência de embriões em ciclo subsequente em endométrio com melhor receptividade.^(27,28)

A fim de se evitar ou minimizar esses efeitos adversos da estimulação ovariana, todos os embriões podem ser congelados para descongelamento e transferência *a posteriori*, estratégia conhecida como “freeze-all”. As etapas iniciais até a formação dos embriões seguem como no ciclo a fresco, porém todos os embriões são congelados. Essa estratégia agrega duas etapas ao tratamento (preparo de endométrio e descongelamento de embriões). No ciclo de transferência de embriões descongelados, o preparo de endométrio dura em média 15 dias. Em geral são realizados dois exames de ultrassonografia. Quando o endométrio está pronto, os embriões são descongelados e avaliados quanto à sobrevivência. A transferência embrionária para o útero é feita por via vaginal, em ambiente ambulatorial e guiada por ultrassonografia, como nos casos de transferência a fresco. Nessa estratégia, por haver necessidade de um novo ciclo de preparo do útero para receber os embriões, pode haver aumento do tempo para se chegar à gravidez. Além disso, por agregar uma etapa de descongelamento, os custos aumentam e há eventual risco de não sobrevivência embrionária após esse procedimento (Figura 2).^(29,30)

Ciclo freeze-all



As caixas de texto em branco citam as desvantagens do congelamento e descongelamento de embriões.

Figura 2. Ciclo de fertilização *in vitro* com congelamento de todos os embriões (*freeze-all*)

1.4 *Freeze-all* em pacientes com resposta alta à indução da ovulação

O uso da estratégia de *freeze-all* em pacientes com alta resposta à indução de ovulação (mais de 15 óvulos coletados) já é recomendação corrente na literatura médica e tem sido utilizado amplamente. O objetivo primário é a prevenção da síndrome de hiperestimulação ovariana.⁽³¹⁻³⁴⁾

Em 1999, Ferraretti et al. publicaram um estudo prospectivo randomizado no qual avaliaram os resultados clínicos de 58 pacientes em ciclos com *freeze-all*, nos quais todos os embriões foram congelados em estágio de pró-núcleo (um dia após a fertilização) em comparação a 67 pacientes com ciclos frescos. Todas as pacientes nesse estudo tinham alta resposta: nível sérico de estradiol no final da estimulação superior a 1500pg/mL e mais de 15 óvulos coletados. Os embriões em ambos os grupos foram transferidos no estágio de clivagem. As taxas de gravidez e de nascido-vivo por paciente foram 48,3% e 39,6% no para os ciclos com *freeze-all* e 46,3% e 38,8% para o ciclo fresco. Em relação às taxas de implantação, 19,3% no ciclo fresco e 15% no ciclo com *freeze-all*. Nos casos de transferência de embriões descongelados não houve síndrome de hiperestimulação ovariana enquanto no grupo que fez transferência a fresco quatro pacientes desenvolveram a síndrome. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esses resultados permitiram aos autores concluir que congelar todos os embriões em ciclos com alta resposta à estimulação ovariana era uma estratégia eficaz em termos de chance de gravidez e mais segura na prevenção da síndrome de hiperestimulação ovariana.⁽³⁵⁾

Vyjayanthi et al. publicaram em 2006 uma base de dados retrospectiva com 5536 pacientes com ciclo fresco e 150 pacientes que congelaram todos os embriões em estágio de pró-núcleo por risco de síndrome de hiperestimulação ovariana. Os resultados de gravidez cumulativa por paciente não diferiram entre os grupos. Nesse estudo, ao contrário dos achados de Ferraretti et al. as taxas de gravidez clínica no Grupo *freeze-all* foram significativamente menores do que no grupo fresco, considerando-se apenas a primeira transferência: 31,5% versus 41,9% (p=0,001). Os ciclos incluídos nesse estudo foram realizados entre 1997 e 2001, mesmo período do estudo supracitado de Ferraretti et al. e, por se tratar de uma coorte com um número de pacientes muito maior, os resultados de Vyjayanthi et al. devem refletir melhor a realidade do final da década de 90, quando a técnica de

criopreservação por congelamento lento era a regra, e os resultados de gravidez inferiores aos obtidos com transferências a fresco. Outra diferença entre os trabalhos é que no de Vyjayanthi et al. o grupo controle foi constituído de todos os ciclos frescos realizados no período enquanto que o estudo de Ferraretti et al. incluía apenas pacientes com alta resposta à indução. Os autores do estudo concluíram que apesar da menor taxa de gestação na primeira transferência, as taxas cumulativas de gravidez não diferiram entre os grupos e que, portanto, a opção pelo *freeze-all* deveria permanecer para as pacientes com alta resposta devido aos riscos relacionados a síndrome de hiperestimulação ovariana.^(35,36)

Zhou et al., em 2009, publicaram estudo retrospectivo comparando 179 ciclos com embriões em estágio de clivagem congelados pela técnica de congelamento lento com 1306 ciclos frescos, entre os anos de 2006 e 2008, na China. O grupo *freeze-all* era composto por pacientes mais jovens ($30,6 \pm 4,1$ anos *versus* $32,1 \pm 4,2$ anos, não significante – NS) e com maior número de óvulos coletados ($21 \pm 1,0$ *versus* $10,6 \pm 5,7$, $p < 0,01$), e resultou em taxas de gestação clínica e de implantação mais altas ($63,1\%$ *versus* 47% e $43,9\%$ *versus* $26,7\%$, respectivamente, $p < 0,01$). A taxa de sobrevivência foi de $89,8\%$, considerada alta para a técnica de congelamento lento pelos próprios autores do estudo. Após a regressão logística múltipla para idade e número de óvulos, as diferenças se mantiveram, favorecendo o grupo *freeze-all*. A conclusão dos autores foi que a estratégia de *freeze-all* aumenta as chances de implantação e gravidez clínica para pacientes com alta resposta.⁽³⁷⁾

Braga et al. publicaram em 2016 estudo retrospectivo de dados de um programa de doação de óvulos comparando três grupos: ciclos nos quais as pacientes doadoras utilizavam seus próprios óvulos a fresco e realizavam a transferência de embriões a fresco, ciclos nos quais as receptoras utilizavam óvulos doados a fresco e realizavam a transferência de embriões descongelados e um terceiro grupo, que recebia óvulos congelados (banco de óvulos) e realizavam a transferência a fresco. As taxas de implantação foram $37,2 \pm 41,1\%$, $67,3 \pm 38,4\%$ e $43,0 \pm 41,0\%$ ($p < 0,001$), respectivamente para os três grupos. As taxas de gravidez foram $39,8\%$, $71,4\%$ e $49,6\%$ ($p < 0,001$), respectivamente para os três grupos. Os autores concluíram que o resultado clínico de óvulos a fresco foi superior ao de óvulos vitrificados e que a estratégia de *freeze-all* nas receptoras teve melhor resultado clínico do que a transferência a fresco em doadoras de óvulos, corroborando com estudos prévios que

demonstram impacto negativo da estimulação ovariana sobre a receptividade e consequentemente sobre as taxas de implantação em pacientes de alta resposta.⁽³⁸⁾

Em 2016, Borges et al. publicaram um estudo de caso-controle comparando os resultados de 123 ciclos com *freeze-all* com 153 ciclos frescos em pacientes de alta resposta à estimulação ovariana (20 ou mais óvulos). Todos os embriões foram congelados em estágio de clivagem pela técnica de vitrificação e transferidos em estágio de blastocisto após o descongelamento. As taxas de implantação e de gravidez clínica foram de 38,6% *versus* 24,8% ($p=0,028$) e 47,9% *versus* 41,1% ($p=0,004$) para os ciclos com *freeze-all* e frescos, respectivamente. Os autores concluíram que a estratégia de *freeze-all* melhora as taxas de implantação e de gravidez clínica em pacientes de alta resposta à indução da ovulação.⁽³⁹⁾

Em 2017 Wong et al. publicaram revisão sistemática de literatura na Biblioteca Cochrane sobre a estratégia de *freeze-all* em fertilização *in vitro*. Foram incluídos quatro estudos prospectivos randomizados nos quais as pacientes foram acompanhadas até que conseguissem a gestação ou até que todos os embriões oriundos do ciclo índice fossem transferidos. O total de ciclos incluídos na meta-análise foi de 1892, sendo 934 na estratégia de *freeze-all* e 958 na estratégia de transferência a fresco. Foram incluídos três estudos de pacientes com resposta alta à estimulação ovariana (síndrome dos ovários policísticos ou alto risco de síndrome de hiperestimulação ovariana) e um estudo em pacientes com resposta normal à indução da ovulação. O desfecho primário de efetividade foi taxa de nascido-vivo cumulativa e o de segurança foi incidência de síndrome de hiperestimulação ovariana. Houve 562 nascidos-vivos em 934 ciclos de *freeze-all* (60,17%) e 555 nascidos-vivos em 958 ciclos frescos (57,93%), o que resultou numa razão de chances de 1,09 (IC 95% 0,91 – 1,31, $p=0,67$). Essa ausência de diferença de efetividade se manteve após se estratificar os resultados para transferências em estágio de clivagem ou blastocisto. Houve 10 casos de síndrome de hiperestimulação em 804 ciclos de *freeze-all* (1,24%) e 58 em 829 ciclos frescos (6,99%), resultando numa razão de chances de 0,24 (IC 95% 0,15 – 0,38, $p<0,00001$) para proteção contra síndrome de hiperestimulação ovariana nos ciclos de *freeze-all*. Em relação aos desfechos secundários, houve menos abortamentos após transferências de descongelados em comparação a de frescos, sendo respectivamente: 123/934 (13,16%) *versus* 176/958 (18,37%), o que resultou numa razão de chances de 0,67 (IC 95% 0,52 – 0,86, $p=0,002$).⁽⁴⁰⁾

Em 2019, Roque et al. publicaram revisão sistemática incluindo os quatro estudos previamente incluídos na revisão sistemática de Wong et al. já citada e mais sete estudos publicados entre 2017 e 2019. Em relação às taxas de nascido-vivo cumulativa não houve diferença entre as duas estratégias, achados similares ao da meta-análise anterior: 56,83% no grupo *freeze-all* e 54,85% no fresco, para uma razão de chances de 1,04 (IC 95% 0,97 – 1,11, $p=0,99$). O risco de síndrome de hiperestimulação ovariana foi menor no grupo *freeze-all*: razão de risco de 0,42 (IC 95% 0,19 – 0,96, $p=0,04$). A conclusão dos autores é a de que não existem dados que suportem o uso indiscriminado do congelamento eletivo de todos os embriões para a população geral submetida a fertilização *in vitro* e que essa estratégia deve ser reservada para casos de alta resposta à estimulação ovariana, alto risco de síndrome de hiperestimulação ovariana e pacientes que irão realizar teste genético pré-implantacional.⁽⁴¹⁾

Como se pode ver, a estratégia de *freeze-all* está bem sedimentada na prática clínica e na literatura médica para casos de resposta alta à indução da ovulação com o intuito de prevenir a síndrome de hiperestimulação ovariana sem prejudicar as taxas de gestação, ou, eventualmente, até as melhorando.

1.5 *Freeze-all* em pacientes com resposta normal à indução da ovulação

Nas pacientes sem alta resposta à estimulação ovariana, quando reduzir o risco de síndrome de hiperestimulação ovariana não é uma questão premente, o foco da estratégia de *freeze-all* passa a ser o de melhorar a receptividade endometrial e, conseqüentemente, conseguir taxas de implantação e gravidez mais elevadas.^(24,42,43)

Em 2011, Shapiro et al. publicaram um estudo clínico prospectivo randomizado envolvendo 103 pacientes com resposta normal, sendo 53 com transferência de blastocistos a fresco e 50 com criopreservação de todos os embriões pela técnica de congelamento lento e posterior transferência em blastocisto. A taxa de sobrevivência foi de 90,5%. As taxas de implantação (70,8% *versus* 38,9%, $p<0,001$) e de gravidez clínica (84% *versus* 54,7%, $p=0,0013$) foram melhores no grupo *freeze-all*.⁽⁴⁴⁾

Em 2015, Chen et al. publicaram estudo retrospectivo envolvendo 1567 transferências a fresco com o intuito de avaliar taxas de gravidez por ciclo e taxas de gravidez cumulativa de acordo com o número de óvulos recuperados, a saber: quatro a seis, sete a nove, 10 a 12, 13 a 15 e 16 ou mais. Os resultados encontrados foram que quanto maior o número de óvulos coletados maior a chance cumulativa de gravidez. Porém, quando considerado apenas o ciclo de transferência a fresco, a maior taxa de gravidez foi obtida pelo grupo que teve entre 10 e 12 óvulos maduros. Os autores consideram que essa diferença entre as taxas de gravidez por transferência a fresco e as taxas cumulativas pode ser devido ao prejuízo a receptividade endometrial provocado pela alta resposta à estimulação ovariana. Para ajudar a explicar essa teoria, dentro desse mesmo estudo fizeram uma comparação dos resultados apenas das primeiras transferências do grupo fresco e *freeze-all*, de acordo com o número de óvulos. O resultado foi que não havia diferença nas taxas de gestação entre os dois grupos, fresco e *freeze-all*, quando a paciente tinha resposta normal à indução da ovulação (até 15 óvulos).⁽⁴⁵⁾

Em 2017, Bourdon et al. publicaram estudo retrospectivo comparando ciclo fresco e *freeze-all* com pareamento para idade e número de falhas de tratamento prévias. Todos os casos transferiram em estágio clivagem de segundo dia. Os protocolos de estimulação, os picos de níveis séricos de estradiol e progesterona e o número de óvulos obtidos não foram pareados. A média etária foi de 35 anos e a média de óvulos maduros foi de 5,43 no ciclo fresco e 6,20 no *freeze-all*. Foram 325 casos de transferência de embriões a fresco e 325 com transferência de embriões vitrificados descongelados com os seguintes resultados, respectivamente: taxa de implantação de 20% *versus* 17%, taxa de gravidez clínica de 30,15% *versus* 26,15% e taxa de abortamento de 27,55% *versus* 26,15%. Nenhum desses resultados teve diferença estatisticamente significativa. Na análise de regressão logística múltipla, as variáveis independentes que tiveram associação com o resultado foram idade da mulher, índice de massa corpórea, número de embriões formados e transferência de ao menos um embrião de boa qualidade. Os autores concluíram que para embriões clivados de segundo dia em pacientes com resposta normal à estimulação ovariana não houve benefício em se adotar a estratégia de *freeze-all*.⁽⁴⁶⁾

Chang et al., em 2017, publicaram estudo retrospectivo comparando ciclos nos quais se vitrificou embriões em clivagem ou blastocistos (n=84) com ciclos cuja primeira transferência foi a fresco, entre os anos de 2012 e 2014. A taxa de

gravidez cumulativa foi de 64,3% para o ciclo com *freeze-all* e 45,8% para o ciclo fresco ($p=0,042$). Embora não houvesse diferença de idade entre os grupos (média etária de 35 anos), as pacientes no grupo *freeze-all* tiveram mais óvulos maduros ($12,3\pm 9,3$ versus $8,1\pm 5,9$, $p<0,001$). Os autores subdividiram a análise em três subgrupos: até quatro óvulos maduros (baixa resposta), de quatro a 15 óvulos (resposta normal) e mais de 15 óvulos (alta resposta). Nesse cenário, apenas no grupo de resposta normal (foram 36 ciclos com *freeze-all* e 399 ciclos frescos) manteve-se a diferença estatisticamente significativa. Os autores concluem que para pacientes com resposta normal à estimulação ovariana a estratégia de *freeze-all* estaria bem indicada.⁽⁴⁷⁾

Em 2017, foi publicado por Roque et al. estudo de coorte prospectivo com 938 ciclos de pacientes com resposta normal à estimulação ovariana (quatro a 15 óvulos), realizados entre 2012 e 2015. Os autores dividiram as pacientes com resposta normal nos subgrupos de resposta normal não ótima (quatro a nove óvulos) e ótima (10 a 15 óvulos). No primeiro grupo, não houve diferença estatisticamente significativa entre as taxas de implantação e gravidez clínica para os ciclos fresco ($n=380$) e *freeze-all* ($n=243$): 17,9% versus 20,5% ($p=0,261$) e 35% versus 39% ($p=0,334$), respectivamente. Já nos casos com resposta ótima, o ciclo fresco teve taxas de implantação e gravidez clínica significativamente mais baixas: 22,1% versus 30,1% ($p=0,028$) e 38% versus 52% ($p=0,018$). O número necessário para tratar foi de 47 no grupo de quatro a nove óvulos e de oito no grupo de 10 a 15 óvulos. Os autores concluíram que o benefício da estratégia de congelamento de todos os embriões para pacientes com resposta normal à estimulação ovariana depende do número de óvulos obtidos e que a individualização precisaria ser ainda mais específica dentro desse grupo.⁽⁴⁸⁾

Acharya et al. publicaram em 2018 estudo retrospectivo utilizando o banco de dados dos anos de 2014 e 2015 da SART: foram 69.102 ciclos frescos e 13.833 ciclos com *freeze-all*. Foram comparados os resultados da primeira transferência. Os ciclos que fizeram *freeze-all* para teste genético foram excluídos, pois não haveria número de ciclos com teste genético e transferência a fresco para comparação. Na análise dos resultados entre ciclos frescos e *freeze-all*, as pacientes foram divididas em subgrupos de acordo com o número de óvulos obtidos com a estimulação ovariana. A taxa de nascido-vivo para os grupos fresco e *freeze-all*, foram, respectivamente: 25,9% versus 11,5% para aquelas com até 5 óvulos ($p<0,001$), 41,2%

versus 35,3% para pacientes com seis a 14 óvulos ($p<0,001$) e 48,9 *versus* 52% para pacientes que obtiveram mais de 15 óvulos ($p<0,001$). Em relação ao peso ao nascer, a incidência de baixo peso ao nascer foi significativamente maior no grupo com transferência a fresco, independente do número de óvulos: 4,3% *versus* 1,9% ($p<0,001$), 7,9% *versus* 6,1% ($p<0,001$) e 9,8% *versus* 8,8% ($p=0,01$) para os grupos descongelado e fresco com até 5 óvulos, de seis a 14 e 15 ou mais óvulos, respectivamente. Os autores concluíram com esses robustos dados populacionais norte-americanos que a estratégia de *freeze-all* resulta em menor incidência de baixo peso ao nascer independentemente do número de óvulos recuperados. O mesmo não aconteceu para taxa de nascido-vivo, que se comportou de maneira diferente de acordo com a resposta à estimulação: pacientes de alta resposta (≥ 15 óvulos) tiveram melhor resultado com *freeze-all* enquanto pacientes com resposta normal ou baixa tiveram melhor resultado com transferência a fresco.⁽²⁷⁾

Em 2018, Shi et al. publicaram um estudo prospectivo randomizado multicêntrico realizado na China envolvendo 2157 pacientes com resposta normal (média de 12 óvulos) que realizaram o primeiro ciclo de fertilização *in vitro* em 2015 e foram acompanhadas até o ano de 2017, para o desfecho primário nascido-vivo. As pacientes transferiram até 2 embriões, em mais de 90% das vezes em D3, frescos ou descongelados. O estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos que realizaram o ciclo fresco ou de *freeze-all*, com 50,2% e 48,7% de taxa de nascido-vivo respectivamente nos dois grupos. Houve menor incidência de síndrome de hiperestimulação ovariana no ciclo com *freeze-all* comparado ao fresco: 0,6% *versus* 2%, razão de chances de 0,32 (IC 95% 0,14 – 0,74, $p=0,005$).⁽⁴⁹⁾

Em 2018, Vuong et al. publicaram estudo prospectivo randomizado, realizado no Vietnã, incluindo 391 ciclos com *freeze-all* e 391 ciclos frescos. A média etária das mulheres foi de 32 anos, o nível sérico de estradiol no dia do *trigger* da ovulação foi de cerca de 2000pg/mL, o número médio de óvulos maduros foi de 10 e só foram incluídas pacientes sem síndrome dos ovários policísticos. Nesse estudo clínico, os autores transferiram apenas embriões em estágio de clivagem e de boa qualidade. Não foram encontradas diferenças em relação a taxa de gravidez clínica, nascido-vivo, abortamento e síndrome de hiperestimulação ovariana moderada ou grave: 44,2% *versus* 41,7%, 33,8% *versus* 31,5%, 6,4% *versus* 3,8% e 0,8% e 1% respectivamente nos grupos que fizeram ciclo com *freeze-all* e fresco. Os autores encontraram diferenças estatisticamente significativas apenas em relação à incidência de pequeno

para idade gestacional e ao peso dos bebês nascidos: 0,8% *versus* 3,6% (razão de chances de 0,21 com IC 95% 0,06 – 0,74, $p=0,01$) e $3253\pm413,8\text{g}$ *versus* $3011\pm443,9\text{g}$ ($p<0,001$), respectivamente no grupo que transferiu embriões congelados em comparação ao grupo que transferiu embriões a fresco. Os autores concluíram que em relação às chances de engravidar as estratégias não tiveram diferenças, porém o tempo para gravidez foi 1,4 mês mais longo no grupo *freeze-all*. Isso poderia implicar maiores custos diretos e indiretos, ponto explorado pelo mesmo grupo em outra publicação.^(49,50)

Em 2019, Wei et al. estudaram uma população chinesa de 1650 pacientes jovens, sem distúrbios de ovulação que foram randomizadas no terceiro dia após a coleta de óvulos para transferir blastocistos a fresco ou congelar todos os embriões para uso em ciclo subsequente. Para serem incluídas, as pacientes precisavam ter ao menos quatro embriões de boa qualidade no dia da randomização. A média etária das pacientes foi de 28 anos e o número médio de óvulos foi de 14. O desfecho primário considerado, taxa nascido-vivo único por mulher, foi maior no grupo *freeze-all* (50,4% *versus* 39,9%), com uma razão de chances 1,26 (IC 95% 1,14 – 1,41, $p<0,0001$). Não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de síndrome de hiperestimulação ovariana, que foi baixa em ambos os grupos (0,5% no ciclo *freeze-all* e 1,1% no grupo fresco). Os recém-nascidos do grupo *freeze-all* tiveram maior peso ao nascer e a incidência de pré-eclâmpsia foi maior, embora essas tenham sido análises *post-hoc*. Os autores concluíram que em pacientes de bom prognóstico nas quais se planeja transferir apenas um blastocisto, a estratégia de *freeze-all* obtém melhores resultados do que a transferência a fresco.⁽⁵¹⁾

Bousdou et al. publicaram em fevereiro de 2019 uma revisão sistemática de literatura incluindo os apenas os resultados da primeira transferência de embriões em pacientes que realizaram ciclo com *freeze-all* *versus* ciclo fresco. A meta-análise foi subdividida em 2 subgrupos: pacientes com alta resposta ($n=4$ estudos ou 3255 pacientes) e pacientes com resposta normal ($n=4$ estudos ou 2010 pacientes). Para o grupo com resposta normal à estimulação ovariana não houve diferença para taxa de nascido-vivo: razão de chances de 1,12 (IC 95% 0,90 – 1,41). Para incidência de síndrome de hiperestimulação ovariana, a razão de chances foi de 0,39 (IC 95% 0,19 – 0,80), sendo o *freeze-all* um fator de proteção. Os autores concluíram que para pacientes com resposta normal à estimulação ovariana, a estratégia de *freeze-all* pode

ser escolhida visando maior segurança contra a síndrome de hiperestimulação ovariana sem interferir nas taxas de nascido-vivo.⁽⁵²⁾

1.6 Freeze-all em pacientes com resposta baixa à indução da ovulação

As dúvidas sobre a superioridade dos ciclos com *freeze-all* se estendem também para as pacientes de baixa resposta (menos de quatro óvulos): esse grupo foi estudado por Roque et al. em publicação de resultados de uma coorte retrospectiva em 2018. As pacientes tinham média etária de 39 anos, em média tiveram 2,5 óvulos e transferiram 1 ou 2 embriões. Nessa coorte, 277 pacientes transferiram a fresco e 156 congelaram todos os embriões. As taxas de implantação e gravidez foram 9,6% *versus* 9,8% (razão de chances de 0,99, IC 95% 0,61 – 1,60, p=0,82) e 14,1% *versus* 13,7% (razão de chances de 1,03, IC 95% 0,63 – 1,67, p=0,91) para os grupos *freeze-all* e transferência a fresco, respectivamente.⁽⁵³⁾

Xue et al. analisaram 195 ciclos frescos e 234 ciclos de *freeze-all* realizados em pacientes de baixa resposta, na China entre 2012 e 2014. Todos os embriões foram congelados e transferidos em estágio de clivagem de terceiro dia. Os resultados de gravidez clínica e de nascido-vivo por transferência foram: 22,6% *versus* 26,1% (p=0,401) e 15,9% *versus* 20,9% (p=0,182) para os grupos transferência a fresco e *freeze-all*, respectivamente. Os autores concluíram que a estratégia *freeze-all* pode ser usada com segurança em pacientes de baixa resposta à indução, mas que são necessárias mais evidências para usá-la de rotina em todos os ciclos.⁽⁵⁴⁾

Como se pode ver nessa revisão de literatura, o uso da estratégia de *freeze-all* vem desde a década de 90. Sua indicação primária inicialmente era apenas aumentar a segurança do tratamento, reduzindo a incidência da síndrome de hiperestimulação ovariana em pacientes de alta resposta à indução da ovulação. Com o advento da técnica de vitrificação na segunda metade da década de 2000 houve melhora dos resultados clínicos dos ciclos com transferência de embriões descongelados. Esse ganho de eficácia dos ciclos de transferência de descongelados provavelmente ocorre porque se evita a transferência de embriões em um endométrio com alterações de receptividade causadas por níveis hormonais supra fisiológicos observados em ciclos de indução da ovulação. É natural, portanto, que se teste o

freeze-all em outras situações clínicas, além dos ciclos de alta resposta, com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento.

O grupo de pacientes com resposta normal à indução de ovulação, por ser o mais prevalente, desperta grande interesse na prática clínica. Conforme já descrito, existem trabalhos retrospectivos e estudos prospectivos randomizados na literatura estudando o uso do *freeze-all* para esse grupo de pacientes, porém a sua indicação como rotina para todas as pacientes ainda não foi estabelecida.

Dessa forma, acreditamos que, por se tratar de uma coorte numerosa de ciclos, esse estudo trará informações importantes para a decisão terapêutica, principalmente em dois pontos: para qual perfil de pacientes com resposta normal à indução da ovulação o *freeze-all* tem sido indicado na prática clínica e quais as características dessas pacientes e desses ciclos que se associam com os melhores resultados. Isso poderá ajudar na escolha entre realizar o ciclo com *freeze-all* ou transferir os embriões a fresco.

As taxas de gravidez clínica dos ciclos de fertilização *in vitro* com congelamento de todos os embriões em mulheres com resposta ovariana normal (4 a 15 óvulos captados por ciclo) é superior ao dos ciclos com transferência embrionária a fresco.

1.7 Objetivo

1. Comparar os resultados de ciclos de fertilização *in vitro* em pacientes com resposta normal à indução da ovulação (4 a 15 óvulos) com transferência a fresco *versus* os ciclos em que se transferiram embriões descongelados após congelamento de todos os embriões (*freeze-all*) em relação à: média etária feminina; fatores de infertilidade; drogas utilizadas para estimulação ovariana; qualidade dos embriões transferidos; taxa de gravidez bioquímica; taxa de gravidez clínica; taxa de gravidez evolutiva; taxa de abortamento; taxa de gravidez múltipla; taxa de implantação embrionária.

2 MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo e local de realização da pesquisa

Trata-se de estudo de coorte retrospectivo realizado no Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein. Foram analisados prontuários e banco de dados de ciclos de fertilização *in vitro* realizados em dois centros privados de reprodução humana localizados na cidade de São Paulo: Projeto ALFA e Clínica VidaBemVinda. O universo da pesquisa corresponde a mulheres com resposta normal à estimulação ovariana (4 a 15 óvulos maduros captados por ciclo), submetidas a tratamentos de fertilização *in vitro* entre os anos de 2013 e 2017.

2.2 Aspectos e procedimentos éticos envolvidos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (número CAAE: 79213617.1.3001.5670), tendo sido solicitada a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, por se tratar de estudo retrospectivo de análise de banco de dados e prontuários, dados estes que fizeram parte do atendimento habitual das pacientes. No momento do levantamento de dados, foi mantida a confidencialidade e a integridade dos mesmos e a identidade dos pacientes foi preservada.

2.3 Dinâmica do estudo

Selecionamos todas as pacientes que fizeram ciclos de fertilização *in vitro* com os próprios óvulos e que não fizeram teste genético pré-implantacional (PGT – *Preimplantation genetic testing*) nos embriões, entre os anos 2013 e 2017. Excluiu-se os ciclos com PGT pois, nesses casos, obrigatoriamente congelaram-se todos os embriões, de acordo com o protocolo das clínicas envolvidas e não haveria casos com transferência a fresco para comparação. Para os cálculos das taxas de gravidez, implantação e abortamento foi incluída apenas a primeira transferência

realizada dentro do período de estudo resultante do ciclo de fertilização *in vitro* das pacientes que obtiveram entre 4 e 15 óvulos maduros (resposta normal).

Os critérios de exclusão foram: casos que coletaram óvulos e não realizaram a transferência no período; pacientes com informações incompletas ou inconsistentes no banco de dados em relação às variáveis observadas; e casos que transferiram embriões oriundos de diferentes coletas de óvulos.

Assim, as pacientes foram divididas em dois grupos:

A. Ciclo com *freeze-all*: Estimulação ovariana controlada, fertilização *in vitro*, congelamento de todos os embriões e transferência dos embriões descongelados em um ciclo subsequente;

B. Ciclo fresco: Estimulação ovariana controlada, fertilização *in vitro* e transferência de embriões a fresco.

As comparações das variáveis entre os grupos foram realizadas apenas entre o primeiro ciclo de transferência a fresco ou descongelado.

2.4 Cálculo amostral

O tamanho amostral foi estimado com o objetivo de avaliar se a taxa de gravidez clínica no grupo que congelou todos os embriões e depois transferiu os embriões descongelados (ciclo com *freeze-all*) é superior à taxa do grupo que recebeu embriões frescos (ciclo fresco). Considerando relevante uma diferença de no mínimo 9%, nível de significância unilateral de 2,5% e que no grupo de referência (transferência a fresco) a taxa de gravidez clínica seria de 35,8%, tal como estudo prévio de Roque et al. precisaríamos de 472 ciclos com transferência, por grupo, para alcançar um poder de 80%.⁽⁴⁸⁾

2.5 Descrição das variáveis observadas

As variáveis observadas foram:

1. Idade materna;
2. Idade paterna;

3. Fator(es) de infertilidade de acordo com a classificação da SART;⁽²⁰⁾ a saber: endometriose, disfunção da ovulação, reserva ovariana diminuída, fator tubário, fator uterino, múltiplos fatores femininos, fator masculino, fator masculino e feminino, causa desconhecida de infertilidade, outros fatores;

4. Medicamentos utilizados para estimulação ovariana controlada: indutores da ovulação por via oral, gonadotrofinas injetáveis (estimulação e disparo da ovulação), análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) injetáveis (agonistas e antagonistas);

5. Número total de óvulos coletados: foram incluídos apenas ciclos com 4 a 15 óvulos maduros;

6. Tipo de fertilização: convencional ou ICSI;

7. Taxa de fertilização: número de óvulos contendo 2 pró-núcleos (masculino e feminino), dividido pelo número total de óvulos fertilizados;

8. Número total de embriões formados: número de embriões com duas ou mais células;

9. Estágio de desenvolvimento alcançado pelos embriões: clivagem (embriões com 2 a 14 células entre segundo e o terceiro dia de desenvolvimento) ou blastocisto (embriões com 5 a 7 dias de desenvolvimento que apresentam massa celular interna, trofoectoderme e blastocelo);⁽⁵⁵⁾

10. Qualidade morfológica dos embriões transferidos a fresco: clivagem (número de células, simetria e grau de fragmentação) e blastocisto (grau de expansão) baseado na classificação simplificada da SART;⁽⁵⁶⁾

11. Qualidade morfológica dos embriões descongelados transferidos (idem à variável 9, acima);

12. Taxa de crio-sobrevivência: número total de embriões viáveis após descongelamento dividido pelo número total de embriões descongelados (calculado apenas para o grupo *freeze-all*)

13. Número de embriões transferidos: de um a quatro, de acordo com a decisão da equipe e do casal, respeitando a Resolução nº 1.957/2010 do Conselho Federal de Medicina;⁽⁵⁷⁾

14. Taxa de gravidez clínica por transferência: número de casos com saco gestacional visualizado em exame de ultrassonografia realizado entre duas e três semanas após o beta-hCG sérico positivo dividido pelo total de transferências;

15. Taxa de gravidez evolutiva: número de casos com atividade cardíaca embrionária detectada em exame de ultrassonografia realizado entre três e quatro semanas após o beta-hCG sérico positivo dividido pelo total de transferências;

16. Taxa de gestação múltipla: número de casos com mais de um saco gestacional ou mais um embrião com atividade cardíaca visualizado em quaisquer dos exames de ultrassonografia descritos acima dividido pelo número total de gestações;

17. Taxa de implantação: número total de sacos gestacionais em relação ao número total de embriões transferidos;

18. Taxa de abortamento: Número de casos em que não se visualizou embrião com batimento cardíaco após já ter sido visualizado saco gestacional.

2.6 Análise estatística

2.6.1 Análise descritiva das variáveis

Inicialmente, verificou-se a normalidade das variáveis contínuas (e algumas variáveis de contagem quantitativas discretas) com uso dos histogramas, *box plot* e gráficos quantil-quantil para avaliar o uso da medida resumo mais adequada às variáveis. Realizou-se uma análise descritiva de todos os dados segundo o tipo de transferência: descongelado ou fresco. No caso das variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal, apresentaram-se as médias, desvios padrão (DP) e o teste t-Student para comparação das médias. Caso contrário, apresentaram-se a mediana, os 1º e 3º quartis (IIQ) e o teste de Mann Whitney. Para as variáveis qualitativas, apresentaram-se o número e as proporções das observações em cada categoria juntamente com o teste do qui-quadrado ou Fisher.

2.6.2 Análises de associação: modelos de regressão logística

Para avaliar o efeito do grupo nos desfechos de interesse, controlando pelas demais variáveis, utilizaram-se modelos lineares generalizados da família binomial com ligação logito (modelos de regressão logística).

Ajustamos o modelo múltiplo para o desfecho primário gravidez clínica considerando conjuntamente a idade da mulher no momento da estimulação, se era do grupo fresco ou *freeze-all*, o número de óvulos maduros, o estágio de desenvolvimento embrionário na transferência e as interações entre grupo e idade, grupo e número de óvulos e grupo e tipo de transferência. O modelo considerou a dependência entre diferentes procedimentos de uma mesma mulher e também a dependência entre as pacientes de um mesmo centro e os resultados são apresentados por razões de chances estimadas, intervalos de confiança e valores-p.

2.6.3 Análises de associação: modelo de pareamento por escore de propensão

A proposta de pareamento considerava duas variáveis:

1. Número de óvulos maduros;
2. Idade materna.

Elas foram selecionadas com base nos resultados da regressão logística simples. Os resultados foram analisados separadamente para transferências em estágio de clivagem e de blastocisto (covariáveis).

2.6.3.1 Análise preliminar

Antes do início do pareamento, avaliamos o balanceamento das amostras de casos e controles quanto às variáveis de interesse anteriormente citadas. Isso foi feito por meio de cálculo de diferenças padronizadas e teste de qui-quadrado de Omnibus, proposto por Hansen e Bowers, para verificar desbalanceamento. Para concluir que não há desbalanceamentos importantes, precisamos não rejeitar a hipótese nula.

Calculamos as diferenças padronizadas com o banco de dados completo, considerando as covariáveis de interesse e os grupos formados por tratamento. Após a exclusão dos casos sem transferência, ficamos com 467 transferências de embriões congelados e 3208 transferências a fresco.

As diferenças padronizadas calculadas para as variáveis de interesse no banco total mostram valores de 0,933 para número de óvulos maduros e

de 0,233 para idade materna. Apesar de não existir um critério claro para considerar grupos como balanceados ou não a partir das diferenças médias padronizadas, há uma regra geral que diz que no caso de diferenças padronizadas maiores ou iguais a 0,250 devemos procurar por um pareamento com melhor balanceamento. Assim, houve necessidade de se buscar melhor balanceamento para a variável número de óvulos maduros.

O teste de qui-quadrado apresentou valor- $p < 0,001$, ou seja, temos evidências de que a amostra estava desbalanceada quanto a este conjunto de covariáveis. Foram então utilizados instrumentos estatísticos para balancear a amostra.

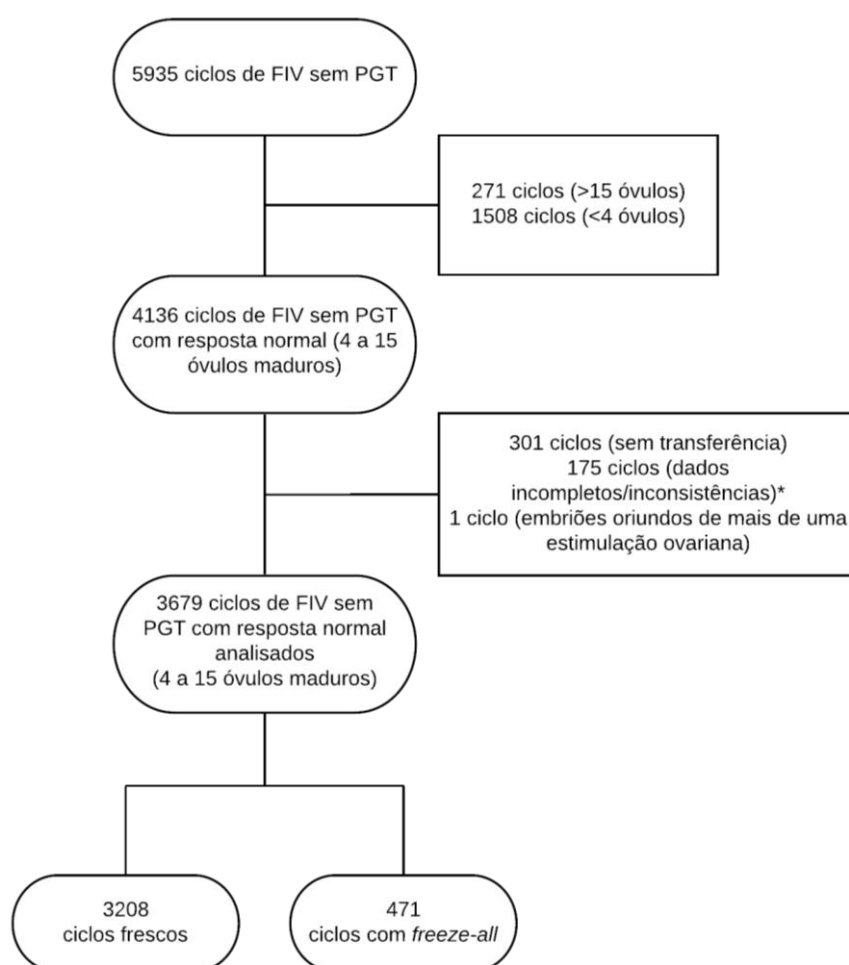
O próximo passo foi a estimação dos escores de propensão, que foi feita por meio de um modelo de regressão logística incluindo as duas covariáveis de interesse e também a interação de primeira ordem entre elas. Após o cálculo dos escores, avaliamos a sua distribuição nos grupos fresco e congelado. Observamos que, apesar de termos a mesma região de suporte nos dois grupos, a distribuição foi distinta, com valores do escore mais altos no grupo congelado, o que é esperado, já que o escore de propensão é a probabilidade estimada de uma determinada transferência ser do grupo congelado, dadas as informações de idade materna e número de óvulos maduros.

Considerando o escore de propensão baseado na idade materna e no número de óvulos maduros, o melhor pareamento sem exclusão de nenhum caso foi obtido pelo método do vizinho mais próximo sem calibração. Neste pareamento, as diferenças padronizadas estimadas ficaram menores que 0,155, demonstrando haver um bom pareamento, razoavelmente balanceado entre os grupos. No pareamento utilizado, ficamos com 467 congelados e 934 frescos, ou seja, uma razão de 1:2.

3 RESULTADOS

3.1 Descrição dos dados

Entre os anos de 2013 e 2017 foram encontrados 5935 registros de ciclos de fertilização *in vitro*, nos quais não houve uso de diagnóstico genético embrionário pré-implantacional. Desses, 3679 casos foram analisados. A figura 3 traz o número de casos excluídos da nossa análise, bem como o motivo para tal.



* Os dados incompletos referem-se a ciclos nos quais não havia informações referentes ao fator de infertilidade, droga utilizada para indução da ovulação ou ao desfecho do ciclo. As inconsistências referem-se a casos com números de óvulos e embriões inconsistentes entre si. FIV: Fertilização *in vitro*. PGT: Teste genético pré-implantacional.

Figura 3. Número de casos analisados e os motivos para exclusão

Esses 3679 ciclos foram realizados por 3153 mulheres, assim distribuídas: 2270 (86,27%) realizaram um ciclo; 368 (11,67%) realizaram dois ciclos; 43 (1,36%) realizaram três ciclos; 17 (0,54%) realizaram quatro ciclos; quatro (0,13%) realizaram cinco ciclos e uma (0,03%) realizou seis ciclos no período.

A análise descritiva das características clínicas antes e durante o ciclo de estimulação ovariana controlada para fertilização *in vitro* encontra-se na tabela 1. O número de registros do grupo *freeze-all* com tentativa de transferência embrionária (n=471) representou 12,8% do total da amostra analisada enquanto os frescos (n=3208), 87,2% do total.

Tabela 1. Análise descritiva das características clínicas segundo os grupos

Variáveis	Total	Freeze-all	Fresco	Valor-p
Idade da mulher no momento da estimulação (anos)				
Média (DP)	35,26 (4,30)	34,37 (4,31)	35,40 (4,28)	<0,001
[Mínimo – Máximo]	[18,0-48,9]	[22,0-48,0]	[18,0-46,0]	
Procedimento para fertilização dos óvulos - n(%)				
FIV	193(5,2)	31(6,6)	162(5,0)	0,180
ICSI	3404(92,5)	426(90,4)	2978(92,8)	
FIV+ICSI	82(2,2)	14(3,0)	68(2,1)	
Protocolos de medicamentos utilizados nos ciclos de estimulação ovariana, n (%)				
Gonadotrofina + Antagonista	3444(93,6)	454(96,4)	2990(93,2)	0,007
Gonadotrofina + Agonista	204(5,5)	12(2,5)	192(6,0)	
Gonadotrofina + Letrozol + Antagonista	29(0,8)	5(1,1)	24(0,7)	
Gonadotrofina + Clomifeno + Antagonista	2(0,1)	0(0,0)	2(0,1)	
Diagnóstico(s) que levaram à realização do tratamento, n (%)				
Infertilidade sem causa aparente	553(15,0)	67(14,2)	486(15,1)	<0,001
Baixa reserva ovariana	125(3,03)	30(6,3)	95(3,0)	
Fator ovulatório	222(6,0)	37(7,8)	185(5,7)	
Endometriose	261(7,1)	37(7,8)	224(7,0)	
Fator tubáreo	690(18,8)	64(13,5)	626(19,5)	
Masculino	1095(29,8)	119(25,2)	976(30,5)	
Múltiplos femininos	197(5,4)	22(4,8)	175(5,5)	
Feminino + Masculino	385(10,5)	80(16,9)	305(11,0)	
Outros*	151(4,1)	15(3,1)	136(4,2)	

* Inclui fator uterino, cervical, homoafetivos, doenças infecciosas. DP: Desvio padrão.

As mulheres que realizaram ciclo com *freeze-all* eram mais jovens e apresentaram com mais frequência os diagnósticos de baixa reserva ovariana e associação de fatores femininos e masculinos quando comparadas ao grupo que fez o ciclo convencional. O uso de gonadotrofinas para estimulação ovariana e o uso de ICSI

para fertilização dos óvulos não diferiu entre os grupos. Porém, no Grupo *Freeze-all* foi mais comum o uso de bloqueio da hipófise utilizando-se antagonistas do GnRH.

A idade do homem estava disponível para 3533 casos (indisponível em 146 dos 178 casos com uso de banco de sêmen) e foi de 37,64 anos ($\pm 6,23$ anos) no Grupo *Freeze-all* e de 37,99 anos ($\pm 6,56$ anos) no Fresco, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,160$).

A tabela 2 apresenta a análise descritiva das variáveis relacionadas ao laboratório de fertilização *in vitro*. Nota-se que o Grupo *Freeze-all* apresentou número médio mais elevado de óvulos maduros: $10,05 \pm 3,43$ versus $7,16 \pm 2,81$. Isso levou a um maior número de embriões formados nesse grupo, embora o número de embriões transferidos tenha sido menor.

Tabela 2. Análise descritiva das características no laboratório de fertilização *in vitro* segundo os grupos

Variáveis	Total	Freeze-all	Fresco	Valor-p
Número médio de óvulos maduros, DP	7,53 (3,05)	10,05 (3,43)	7,16 (2,81)	<0,001
Distribuição das pacientes segundo o número de óvulos maduros, n (%)				<0,001
4 a 9	2738 (74,4)	194 (41,2)	2544 (79,3)	
10 a 5	941 (25,6)	277 (58,8)	664 (20,7)	
Taxa de fertilização média, % (DP)	65,55 (24,78)	70,46 (22,72)	64,83 (25,0)	<0,001
Número médio de óvulos fertilizados com 2 pró-núcleos (DP)	4,81 (2,64)	6,97 (3,19)	4,54 (2,39)	<0,001
Número médio de embriões clivados (DP)	4,83 (2,66)	6,82 (3,22)	4,50 (2,44)	<0,001
[Mínimo – Máximo]	[1 – 15]	[1 – 14]	[1 – 15]	
Estágio da transferência de embrião (%)				<0,001
Blastocisto	9,2	40,9	4,6	
Clivagem	90,8	59,1	95,4	
Transferência apenas de embriões de moderada e boa qualidade em estágio de clivagem ou de blastocistos (%)	59,7	82,4	56,2	<0,001
Número médio de embriões clivados transferidos (DP)	2,36 (0,75)	2,23 (0,60)	2,37 (0,73)	<0,001
Número médio de blastocistos (DP)	1,69 (0,65)	1,54 (0,54)	1,89 (0,72)	<0,001

DP: desvio padrão.

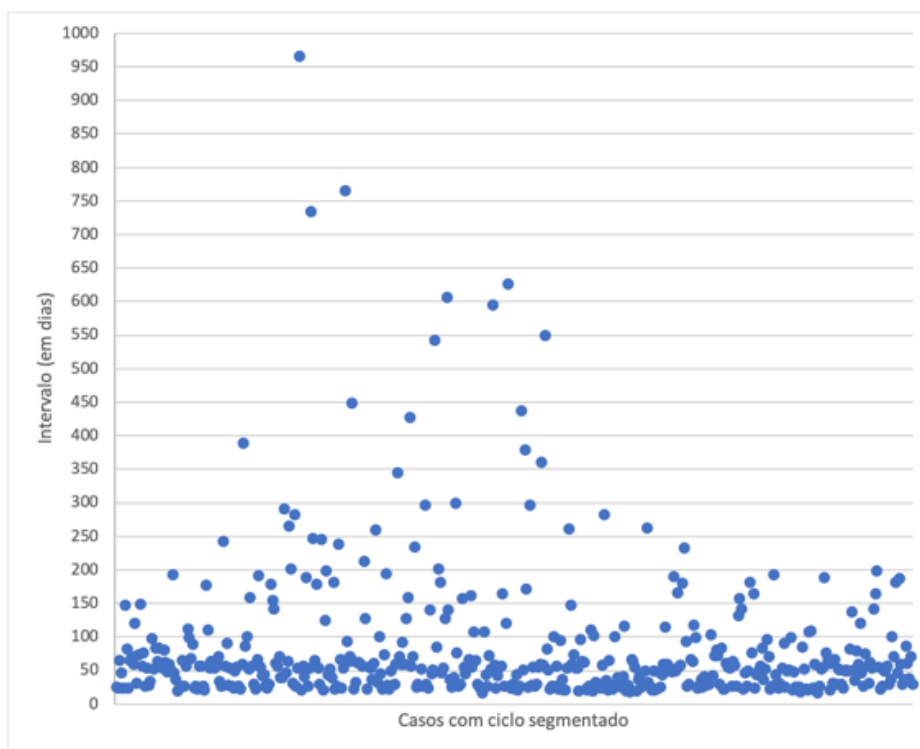
A tabela 3 traz os dados de descongelamento do Grupo *Freeze-all*. Em média foram descongelados $2,3 \pm 1,2$ embriões e a taxa de sobrevivência foi de 97,2%, considerando todos os estágios. Em quatro casos (0,85%), nenhum embrião sobreviveu ao descongelamento e, por isso, a transferência foi cancelada.

Tabela 3. Dados relativos ao congelamento e descongelamento dos ciclos no grupo *freeze-all*

Variáveis	Número
Número de embriões clivados congelados	
Média (DP)	3,4 (3,5)
[Mínimo – Máximo]	[0 – 14]
Número de blastocistos congelados	
Média (DP)	2,4 (1,6)
[Mínimo – Máximo]	[0 – 11]
Número de embriões descongelados	
Média (DP)	2,3 (1,2)
[Mínimo – Máximo]	[1 – 12]
Número de embriões que sobreviveram	
Média (DP)	2,2 (1,1)
[Mínimo – Máximo]	[0 – 10]
Taxa de sobrevivência	
Média (DP)	97,2 (14,5)

DP: desvio padrão.

A figura 4 traz 471 casos distribuídos em relação ao tempo decorrido entre o congelamento dos embriões e a tentativa de transferência dos embriões. O tempo médio foi de $83,45 \pm 105$ dias. A mediana foi de 54 dias, variando o tempo mínimo entre 17 e 966 dias.

**Figura 4.** Intervalo de tempo entre o congelamento e a transferência de embriões no grupo *freeze-all*

A tabela 4 traz os desfechos clínicos. A taxa de gravidez clínica foi maior no Grupo *Freeze-all*. Não houve diferença em relação às taxas de implantação, gestação múltipla e abortamento clínico.

Tabela 4. Descrição dos dados de transferência embrionária e desfechos clínicos, segundo os grupos

Variáveis	Total	<i>Freeze-all</i> (n=467)	Fresco (n=3208)	Valor-p
Taxa de gravidez clínica por transferência, %(n)	30,0 (1104/3675)	32,5 (152/467)	29,7 (952/3208)	<0,001
Taxa de gravidez evolutiva por transferência, %(n)	27,5 (1009/3675)	29,3 (137/467)	27,2 (872/3208)	0,358
Taxa de gravidez múltipla (para todos os casos com gravidez clínica), %(n)	27,2 (300/1104)	25,7 (39/152)	27,4 (261/952)	0,723
Taxa de implantação de embriões em clivagem (%)	17,41	17,03	17,44	0,593
Taxa de implantação de blastocistos (%)	27,2	31,0	24,23	0,227
Abortamento clínico, %(n)	8,5 (95/1104)	9,9 (15/152)	8,4 (80/952)	0,658

A tabela 5 traz a associação entre diferentes categorias de idade feminina e as variáveis: número de óvulos maduros, número de embriões formados e proporção de embriões de boa qualidade. Como se pode notar, o número de óvulos e o percentual de embriões clivados de boa qualidade diminuem significativamente com o aumento da idade feminina.

Tabela 5. Associação entre idade da mulher e o número de óvulos maduros, número de embriões formados e proporção de embriões e boa qualidade

Idade da mulher na coleta de óvulos	≤35 anos (n=1882)	36–39 anos (n=1174)	≥40 anos (n=623)	Total (N=3679)	Valor-p
Número médio de óvulos maduros (DP)	8,0 (3,2)	7,2 (2,9)	6,6 (2,7)	7,5 (3,1)	<0,001
Número médio de embriões formados (DP)	4,8 (2,8)	4,9 (2,5)	4,6 (2,3)	4,8 (2,7)	0,019
Embriões clivados de boa qualidade, % (DP)	17,4 (24,9)	15,9 (22,6)	14,0 (21,1)	16,3 (23,6)	0,004

DP: desvio padrão.

3.2 Regressão logística: variáveis associadas ao desfecho primário

Na tabela 6, em relação à idade no momento da coleta de óvulos, tomando-se como referências as mulheres com até 35 anos de idade, as mulheres entre 36 e 39 anos tiveram 20% menos chance de engravidar e as com 40 anos ou

mais 60% menos chances de engravidar, ambas as diferenças estatisticamente significantes.

O número de óvulos maduros esteve associado às chances de gravidez clínica. As chances de gravidez clínica aumentaram em 3,9% para cada óvulo maduro a mais obtido. Estar no grupo que obteve de 10 a 15 óvulos (resposta normal alta) esteve associado a 23% mais chances de gravidez clínica quando comparado a estar no grupo de 4 a 9 óvulos (resposta normal baixa). Todas essas diferenças foram estatisticamente significantes.

Em relação ao estágio embrionário na transferência, o grupo transferência de blastocisto teve 24% mais gestações clínicas em relação ao grupo clivagem, sem significância estatística.

Tabela 6. Regressão logística simples para as variáveis explicativas em relação ao desfecho primário “gestação clínica”

Variáveis explicativas	Razão de chances	IC 95%	Valor-p
Categorização pela idade feminina (anos)			
≤35	1 (Ref.)		
36 – 39	0,808	0,689;0,949	0,009
≥40	0,399	0,316;0,505	<0,001
Número de óvulos maduros	1,039	1,01;1,064	0,001
Categorização do número de óvulos maduros			
4 – 9 óvulos	1 (Ref.)		
10 – 15 óvulos	1,236	1,050;1,453	0,011
Estágio embrionário			
Clivagem	1 (Ref.)		
Blastocistos	1,242	0,849;1,817	0,265

A tabela 7 traz os resultados de regressão logística múltipla, dividida para os grupos *freeze-all* e fresco. Percebemos nesse modelo, que há uma interferência negativa do aumento da idade sobre a probabilidade de gestação clínica dentro do grupo fresco, com uma diferença significativa dos pontos de vista clínico e estatístico. Essa interferência, porém, se suaviza e perde significância estatística no Grupo *Freeze-all*. Isso se reflete na comparação entre os grupos: para as mulheres acima de 40 anos, houve estatisticamente mais gestações no Grupo *Freeze-all* do que no Grupo Fresco.

Em relação à categorização pelo número de óvulos, percebe-se que a maior probabilidade de gestação clínica observada no modelo de regressão simples (Tabela 6) se mantém nesse modelo de regressão múltipla, porém sem significância

estatística, tanto na comparação entre os grupos de estudo quanto na comparação dentro de cada grupo para cada categoria de quantidade de óvulos.

Na análise em relação ao estágio de transferência embrionária, o grupo que transferiu blastocistos descongelados teve maior probabilidade de gestação clínica, de maneira estatisticamente significativa. Essa diferença clínica estatística ocorre tanto na comparação com o grupo que transferiu blastocistos a fresco como na comparação com o grupo que transferiu embriões descongelados em estágio de clivagem.

Tabela 7. Regressão logística múltipla para probabilidade estimada de ocorrência do desfecho primário “gestação clínica” dividido para os grupos freeze-all e fresco

Variáveis explicativas	Freeze-all (n=471)	Fresco (n=3208)	Razão de chances [IC 95%]	Valor-p
Idade da mulher (anos)				
≥40	n=54	n=569		0,044
Média % [IC 95%]	29,3 [18,4;43,1]	15,8 [12,4;19,9]	1,931[1,030;3,623]	
36 – 39	n=138	n=1036		0,810
Média % [IC 95%]	29,6 [22,4;38,1]	28,5 [24,2;33,3]	0,976[0,659;1,445]	
≤35	n=279	n=1603		0,430
Média % [IC 95%]	35,8 [30,1;42,0]	32,8 [28,4;37,4]	1,038[0,794;1,357]	
Valor-p (dentro do grupo)				
≤35 versus ≥40 anos	0,355	<0,001		
≤35 versus 36 – 39 anos	0,222	0,020		
Número de óvulos maduros				
10 – 15	n=277	n=664		
Média % [IC 95%]	32,6 [26,2;39,7]	25,9 [21,6;30,8]	1,110[0,826;1,492]	0,109
4 – 9	n=194	n=2544		
Média % [IC 95%]	30,4 [23,5;38,3]	23,9 [20,5;27,8]	1,004[0,726;1,388]	0,123
Valor-p (dentro do grupo)				
	0,636	0,277		
Estágio embrionário				
Clivagem	n=279	n=3062		
Média % [IC 95%]	26,1 [20,4;32,6]	22,9 [17,0;30,2]	0,894[0,678;1,179]	0,777
Blastocistos	n=192	n=146		
Média % [IC 95%]	37,7 [30,0;45,7]	26,7 [24,8;29,3]	1,948[1,219;3,114]	0,005
Valor-p (dentro do grupo)				
	0,012	0,242		

3.3 Pareamento dos grupos: método pelo escore de propensão

Como observado nas variáveis descritivas e nos modelos de associação com regressão logística simples, as variáveis “idade feminina” e “número

de óvulos maduros” estiveram associadas ao desfecho “gravidez clínica”. Essas variáveis foram utilizadas para o pareamento pelo escore de propensão.

O banco de dados, após o pareamento, ficou composto por 1401 transferências, sendo 467 transferências realizadas no Grupo *Freeze-all* e 934 transferências de embriões no Grupo Fresco. As 1401 transferências foram feitas por 1302 mulheres. O número de transferências por mulher variou entre um e quatro, sendo 1212 mulheres com uma transferência, 83 com duas transferências, cinco com três transferências e duas com quatro transferências.

A média e a mediana de idades, bem como a distribuição por faixas etárias ficou balanceada entre os grupos *freeze-all* e fresco. O mesmo ocorreu com o número médio de óvulos maduros. Quando se analisa o estágio em que foi realizada a transferência, nota-se um desequilíbrio entre os grupos, sendo a transferência em estágio de clivagem muito mais comum no grupo fresco do que no Grupo *Freeze-all* (92,4% *versus* 52,1%). O número médio de blastocistos transferidos também foi maior no grupo convencional. Esses resultados estão contidos na tabela 8.

Tabela 8. Descrição das características dos grupos após pareamento

Variáveis explicativas	<i>Freeze-all</i>	Fresco
Idade da mulher (anos)		
Média (DP)	34,4 (4,3)	34,4 (4,2)
Mediana [IIQ]	34 [32;37]	35 [32;37]
n	467	934
Estratificação por idade da mulher n (%)		
≤35 anos	276 (59,1)	543 (58,1)
36 a 39 anos	137 (29,3)	281 (30,1)
≥40 anos	54 (11,6)	110 (11,8)
Total	467 (100,0)	934 (100,0)
Número de óvulos maduros		
Mediana [IIQ]	11 [7;13]	10 [7;12]
n	467	934
Estratificação por número de óvulos maduros n(%)		
4 a 9	190 (40,7)	382 (40,9)
10 a 15	277 (59,3)	552 (59,1)
Total	467 (100,0)	934 (100,0)
Estágio embrionário na transferência n(%)		
Transferência de blastocistos	191 (40,9)	71 (7,6)
Transferência de embrião em clivagem	276 (59,1)	863 (92,4)
Número médio de embriões transferidos – n (DP)	1,95 (0,67)	2,26 (0,69)
Clivagem	2,23 (0,60)	2,33 (0,72)
Blastocisto	1,54 (0,54)	1,89 (0,66)
Total de embriões em clivagem transferidos n(%)		

continua...

...continuação

1	15 (5,4)	58 (6,7)
2	191 (69,2)	544 (63,0)
3	60 (21,7)	212 (24,6)
4	10 (3,6)	49 (5,7)
Total	276 (100,0)	863 (100,0)
Total de blastocistos transferidos, n (%)		
1	92 (48,2)	18 (25,4)
2	94 (49,2)	46 (64,8)
3	5 (2,6)	4 (5,6)
4	0 (0,0)	3 (4,2)
Total	191 (100,0)	71 (100,0)

DP: desvio padrão; IIQ: Intervalo interquartil.

A tabela 9 traz os resultados sem distinção pelo estágio que o embrião foi transferido. Como se pode ver, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 9. Desfechos na amostra pareada por grupos, sem distinção do estágio em que foi realizada transferência embrionária

Desfechos	<i>Freeze-all</i> (n=467)	Fresco (n=934)	Valor-p*
Taxa de gravidez clínica			
Média % [IC 95%]	32,5 [28,4;36,9]	32,3 [29,4;35,4]	0,936
Taxa de gravidez evolutiva			
Média % [IC 95%]	29,3 [25,4;33,6]	30,2 [27,3;33,2]	0,741
Taxa de gravidez múltipla			
Média % [IC 95%]	25,7[19,3;33,2]	29,8 [24,9;35,2]	0,356
Taxa de abortamento clínico			
Média % [IC 95%]	9,9 [6,0;15,7]	6,6 [4,3;10,0]	0,224

* Valores-p obtidos pelo ajuste de modelos de equações de estimação generalizada, considerando a dependência entre os pares formados pelo escore de propensão e também a dependência entre as transferências de uma mesma mulher.

No pareamento apresentado, o teste de qui-quadrado para o desbalanceamento apresentou valor-p menor 0,001, indicando que ainda houve evidências de desbalanceamento da amostra, com diferenças padronizadas maiores para estágio de transferência de embriões (clivagem ou blastocistos) e número de blastocistos transferidos. Por isso, após o pareamento, estas variáveis foram incluídas nas análises dos desfechos junto com o escore de propensão, como variáveis de controle na comparação entre transferências a fresco e de embriões descongelados.

As tabelas 10 e 11 trazem os desfechos na amostra pareada por grupos, de acordo com o estágio em que foi realizada a transferência embrionária: clivagem ou blastocisto. Como se pode ver, a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos se manteve.

Tabela 10. Desfechos na amostra pareada por grupos, para embriões em estágio de clivagem

Desfechos	<i>Freeze-all</i> (n=276)	Fresco (n=863)	Valor-p*
Taxa de gravidez clínica			
Média % [IC 95%]	27,5 [22,6;33,1]	32,3 [29,3;35,5]	0,125
Taxa de gravidez evolutiva			
Média % [IC 95%]	24,3 [19,6;29,7]	30,1 [27,2;33,3]	0,052
Taxa de gravidez múltipla			
Média % [IC 95%]	31,6 [22,2;42,8]	30,5 [25,3;36,1]	0,853
Taxa de abortamento clínico			
Média % [IC 95%]	11,8 [6,3;21,2]	6,8 [4,4;10,4]	0,209

*Valores-p obtidos pelo ajuste de modelos de equações de estimação generalizada, considerando a dependência entre os pares formados pelo escore de propensão e também a dependência entre as transferências de uma mesma mulher

Tabela 11. Desfechos na amostra pareada por grupos, para embriões em estágio de blastocistos

Desfechos	<i>Freeze-all</i> (n=191)	Fresco (n=71)	Valor-p*
Taxa de gravidez clínica			
Média % [IC 95%]	39,8 [33,1;46,9]	32,4 [22,6;44,1]	0,262
Taxa de gravidez evolutiva			
Média % [IC 95%]	36,6 [30,1;43,7]	31,0 [21,4;42,6]	0,384
Taxa de gravidez múltipla			
Média % [IC 95%]	19,7 [12,3;30,2]	21,7 [9,3;42,8]	0,837
Taxa de abortamento clínico			
Média % [IC 95%]	7,9 [3,6;16,5]	4,3 [0,6;25,2]	0,500

*Valores-p obtidos pelo ajuste de modelos de equações de estimação generalizada, considerando a dependência entre os pares formados pelo escore de propensão e também a dependência entre as transferências de uma mesma mulher

4 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou retrospectivamente uma coorte de pacientes que obtiveram entre quatro e 15 óvulos maduros, resposta considerada normal à estimulação ovariana e que realizaram ciclos de fertilização *in vitro* e transferiram embriões durante o período estudado. O grupo de pacientes com resposta normal à estimulação representou 70% do total de ciclos da nossa coorte de quase seis mil ciclos. Optamos por não incluir os casos que realizaram teste genético pré-implantacional nos embriões, pois esses ciclos sabidamente têm maiores taxas de gravidez por ciclo e nas clínicas onde o estudo foi realizado todos os embriões submetidos ao teste são congelados, o que impossibilitaria a comparação com o grupo fresco.⁽⁵⁸⁾

O objetivo do estudo foi comparar as características clínicas e os desfechos relacionados à gravidez dos ciclos nos quais se optou por congelar todos os embriões para transferência a posteriori (*freeze-all*) com aqueles nos quais optou-se pela transferência de embriões a fresco (ciclo fresco).

Em nosso estudo, as pacientes nas quais a estratégia de *freeze-all* foi indicada pelo médico foram as de melhor prognóstico reprodutivo: eram mais jovens, com mais óvulos maduros e tiveram mais embriões clivados de boa qualidade e blastocistos disponíveis para transferência ou congelamento. Dois fatos podem ajudar a explicar esse fenômeno: primeiro, a equipe médica pode ter identificado maior risco de síndrome de hiperestimulação nesse grupo, no qual a resposta normal alta (10 a 15 óvulos) foi mais prevalente. Segundo, pode ter havido receio em relação aos resultados reprodutivos serem prejudicados por uma eventual não sobrevivência embrionária ao descongelamento caso se tivesse optado pela estratégia de *freeze-all* no grupo com resposta normal baixa (quatro a nove óvulos). Isso ajudaria a explicar porque ciclos frescos foram mais prevalentes nesse grupo.

Sabe-se que quanto mais os ciclos de tratamento precisam ser repetidos, pior o prognóstico reprodutivo do casal, sendo três tentativas o limite mais aceito como falha de implantação.⁽⁵⁹⁾

Em nossa coorte, embora uma mesma paciente possa ter realizado mais do que um ciclo no período estudado, menos de 1% das pacientes com resposta normal à estimulação ovariana incluídas na análise haviam feito mais de três ciclos no

período. Essa informação foi considerada na análise estatística dos dados e é importante do ponto de vista clínico. Estudos prévios têm demonstrado vantagens do *freeze-all* em casos de falha de implantação recorrente.^(60,61)

Uma eventual alta prevalência dessa situação em nossa população, algo que não ocorreu, poderia fazer com que os resultados favorecessem a estratégia de *freeze-all* em relação a transferência a fresco.

No presente estudo, a taxa de sobrevivência de embriões foi superior a 97%, o que demonstra a segurança e eficácia de vitrificação em nosso meio. Esse resultado está em concordância com dados da literatura.⁽¹⁷⁾

No entanto, cabe ressaltar que em quatro pacientes (0,85%) nenhum embrião sobreviveu, não havendo transferência embrionária. Essa é uma importante limitação que deve ser levada em consideração no momento da análise de resultados, considerando intenção de tratar. Por isso, quando se opta pelo *freeze-all* de forma indiscriminada, especialmente em pacientes com poucos óvulos e embriões, deve-se ter em mente que um contingente de pacientes, mesmo provavelmente pequeno, não terá nenhum embrião sobrevivente para transferência.

Analisando os dados crus, sem ajuste, nota-se que a taxa de gravidez clínica no grupo que realizou *freeze-all* foi 2,8% mais alta, diferença estatisticamente significativa. Após a regressão logística, duas variáveis explicativas, idade da mulher e número de óvulos, funcionaram como variáveis de confusão na análise: estavam associadas entre si, ao desfecho primário (gestação clínica), e também à opção de se congelar todos os embriões. Para as variáveis diagnóstico da infertilidade e drogas utilizadas para estimulação ovariana, embora tenha havido diferença de distribuição entre os grupos *freeze-all* e fresco, elas não se relacionaram com os desfechos clínicos nessa população.

Nossos achados em relação ao impacto da idade e o número de óvulos sobre as chances de gravidez são corroborados por outros artigos científicos e por reportes de dados nacionais da América Latina, Europa e Estados Unidos.^(6,20,22)

Em 2018, Zhu et al. publicaram estudo descritivo envolvendo 20687 mulheres que realizaram ciclos entre 2007 e 2016 na China e utilizaram a estratégia de *freeze-all*. A idade da mulher e o número de óvulos foram as duas variáveis que estiveram estatisticamente associadas ao desfecho taxa cumulativa de nascido-vivo na análise de regressão logística multivariada. Embora seja um estudo retrospectivo, sem grupo controle, os autores chamam atenção para a importância dessas duas variáveis

independentes (idade e número de óvulos) quando se toma a decisão por ciclos de *freeze-all*.⁽⁶²⁾

Em nosso estudo, no modelo de regressão logística múltipla, encontramos uma interferência da idade em relação às taxas de gravidez clínica: para pacientes com 40 anos ou mais, o *freeze-all* esteve associado a maior taxa de gestação clínica, de maneira estatisticamente significativa. Esse benefício da estratégia de *freeze-all* para pacientes com mais idade já havia sido demonstrado por Wang et al. que estudaram uma coorte de quase três mil pacientes em 2017 e observaram que no grupo acima de 35 anos o *freeze-all* obtinha melhores resultados do que em pacientes mais jovens. Possíveis explicações para esse fenômeno seriam uma maior seleção embrionária imposta pelo estresse do congelamento e descongelamento (essa seleção seria mais importante clinicamente nas pacientes com mais idade, por terem embriões com menor potencial de gravidez) e uma maior frequência de elevação precoce de progesterona que prejudicaria a transferência a fresco (essa elevação também seria mais comum e significativa nas pacientes com mais idade).⁽⁶³⁾

Outra associação encontrada no modelo de regressão logística múltipla, foi entre transferir blastocisto descongelado e maior taxa de gestação clínica, quando comparado a transferir blastocistos a fresco ou embriões em clivagem descongelados, sinalizando que esse seria o melhor grupo para se indicar o *freeze-all*.

Esses achados estão em concordância com a literatura médica.

Shapiro et al., publicado em 2015, em um estudo clínico prospectivo randomizado comparou dois grupos de pacientes com alta resposta à estimulação ovariana: 71 ciclos com criopreservação de todos os embriões em estágio de dois pró-núcleos e 69 ciclos com criopreservação de todos os embriões em blastocisto, ambos os grupos utilizando a técnica de congelamento lento. Não houve diferença em relação às taxas de gravidez evolutiva entre os grupos (67,75% *versus* 69,1%, $p=1,0000$). A taxa de formação de blastocisto por óvulo fertilizado (28,7% *versus* 41,1%, $p=0,0010$) foi menor no grupo que fez o congelamento no estágio de dois pró-núcleos e o número de blastocistos supranumerários após a primeira transferência para uso futuro também foi menor nesse grupo (1,9 $\pm$ 2,3 *versus* 3,1 $\pm$ 4,1, $p=0.352$). Embora a conclusão dos autores seja a de que não há diferença em relação às taxas de gravidez na primeira transferência entre as duas estratégias, os mesmos consideraram que ter mais blastocistos formados e mais blastocistos supranumerários congelados para uso futuro

pode representar um ganho em termos de taxas de gravidez cumulativa e que portanto congelamento de blastocistos deveria ser a rotina nos casos de *freeze-all*.⁽⁶⁴⁾

He et al. fizeram um estudo retrospectivo comparativo de embriões congelados por vitrificação em estágio de clivagem ou de blastocisto (um ou dois embriões) em pacientes jovens (média etária de 29 anos) e de alta resposta (média de 20 óvulos recuperados), em ciclos realizados na China entre 2010 e 2012. O estudo foi publicado em 2016. As taxas de implantação foram significativamente maiores nos grupos que transferiram blastocistos em comparação com as transferências em estágio de clivagem: 59,49% (um blastocisto), 64,49% (dois blastocistos) e 45,01% (dois em clivagem) ($p=0,001$). Embora a cultura estendida até blastocisto tenha resultado em menor número de embriões excedentes congelados nos dois grupos que transferiram blastocistos em comparação ao grupo que transferiu embriões em clivagem ($4,07\pm2,53$ versus $3,85\pm2,46$ versus $7,72\pm3,91$, $p=0,001$), as taxas de gravidez cumulativa (somando-se todas as transferências possíveis) não diferiram entre os grupos que transferiram um ou dois blastocistos ou embriões em estágio de clivagem e foram respectivamente: 61,43%, 73,58% e 62,06% ($p=0,058$). Como era de se esperar, no grupo de pacientes que transferiu apenas um blastocisto houve menor taxa de gestação múltipla quando comparado ao grupo que transferiu dois (1,21% versus 48,72%, $p=0,001$). Diante desses resultados, os autores concluíram que em pacientes jovens com muitos óvulos e embriões em estágio de clivagem, a estratégia de cultura estendida, *freeze-all* e transferência de um blastocisto descongelado oferece taxas de gravidez cumulativas satisfatórias e reduz o risco de gestação múltipla.⁽⁶⁵⁾

Zaca et al. realizaram estudo retrospectivo multicêntrico entre 2012 e 2016 em cinco centros italianos, publicado em 2018. A ideia dos autores foi avaliar a taxa de nascido-vivo cumulativa em pacientes que tiveram entre 12 e 18 óvulos coletados, comparando os grupos que optaram por ciclo fresco ($n=435$) e *freeze-all* ($n=129$). As transferências foram realizadas em estágio de clivagem ou blastocisto e as pacientes foram acompanhadas até terem um nascido-vivo ou até transferirem todos os embriões. A média de idade não diferiu entre os grupos e foi de 34 anos ($p=1$). O número de embriões viáveis foi de $3,9\pm2,1$ versus $4,5\pm2,2$ ($p<0,01$) e o número de embriões transferidos foi de $1,7\pm0,9$ versus $1,9\pm1,1$ ($p=0,04$) para os ciclos fresco e de *freeze-all*, respectivamente. A taxa de gravidez cumulativa foi de 45,5% no grupo com a estratégia de primeira transferência a fresco versus 53,5% no grupo em que todas as transferências foram de embriões descongelados ($p=0,11$). Quando analisado apenas

o grupo que transferiu embrião em estágio de blastocisto, a taxa de gravidez cumulativa foi de 45,3% no Grupo Fresco (n=161) e 66,7% no Grupo *Freeze-all* (n=45), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$). Os autores concluíram que o uso do *freeze-all* é seguro em relação ao convencional em pacientes com boa resposta à estimulação ovariana e que pode ser superior em casos em que se combina essa estratégia a criopreservação no estágio de blastocisto.⁽⁶⁶⁾

Em nosso estudo, as variáveis de confusão idade da mulher e número de óvulos foram estatisticamente diferentes entre os grupos *freeze-all* e fresco, o que fez com que utilizássemos uma técnica de pareamento conhecida com escore de propensão. Por essa técnica, calcula-se um escore para cada paciente: esse escore indica a probabilidade de ela fazer parte do Grupo *Freeze-all* baseado nas características idade da mulher e número de óvulos obtidos. Dessa forma conseguimos comparar os resultados clínicos de uma paciente que congelou todos os embriões com duas outras com características muito parecidas com ela para essas duas variáveis, mas que transferiram a fresco. Assim mimetizamos características de um ensaio clínico prospectivo randomizado, desenho ideal para comparar intervenções terapêuticas, dentro de um estudo observacional não randomizado, como o nosso, ao tornar os dois grupos o mais balanceados possível.⁽⁶⁷⁾

Embora haja perda de casos ao se fazer o pareamento por esse método, essa foi a razão pela qual optamos por essa técnica estatística em detrimento dos modelos de regressão logística múltipla, mais comuns em estudos retrospectivos.

Quando se fez a análise no formato de caso-controle, pareado 1:2, utilizando-se o método do escore de propensão ajustado para essas duas variáveis (idade da mulher e número de óvulos), as diferenças estatisticamente significantes descritas na análise de regressão logística simples desapareceram. A diferença absoluta entre os grupos para taxa de gestação clínica que era de 2,8% passou a ser de 0,3% a favor do *freeze-all*, sem diferença estatisticamente significativa.

Outra variável que consideramos relevante, o estágio em que se faz a transferência, não pode ser ajustada no modelo de escore de propensão por estar muito desequilibrada entre os grupos: não houve casos suficientes de transferências de blastocistos a fresco para fazer o balanceamento 1:2. Acreditamos que esse desequilíbrio tenha duas explicações: a primeira é que, na prática clínica, ainda é muito comum optar-se pela transferência dos melhores embriões no terceiro dia de vida (clivagem) e cultivar os excedentes até blastocisto. Esse costume de querer “garantir”

que ocorra pelo menos uma transferência a fresco em ciclos de fertilização *in vitro* é muito comum entre os casais, médicos e até entre órgãos reguladores, especialmente em casos de resposta baixa ou normal baixa. Em alguns países europeus, por exemplo, só existe reembolso dos custos de tratamento se houve transferência embrionária no ciclo, pois ela é, no limite, o que efetivamente possibilita a paciente obter a gestação.⁽⁶⁸⁾

A segunda explicação é que o grupo no qual se optou por congelamento de todos os embriões era formado por pacientes mais jovens, com mais óvulos e mais embriões. Para esse perfil, no qual há maior grau de certeza de que haverá a transferência, é comum na prática clínica estender o cultivo embrionário até o estágio de blastocisto: a intenção é selecionar melhor os embriões a serem transferidos, permitir que se transfira menos embriões mantendo a chance de gravidez e reduzir o contingente de embriões a serem congelados, já que nem todos os embriões aparentemente viáveis no terceiro dia continuarão se desenvolvendo até o quinto ou sexto dia de vida na cultura estendida *in vitro*.

A prática observada em nossa coorte, de se congelar preferencialmente blastocistos quando se opta pelo *freeze-all*, tem suporte na literatura corrente que aponta melhores resultados com essa estratégia. Surrey et al. estudaram retrospectivamente 56 pacientes que tiveram todos os embriões congelados em estágio de pró-núcleo e 31 casos em estágio de blastocisto, ambos os grupos pela técnica de congelamento lento, entre 2004 e 2007. As pacientes que congelaram blastocistos, quando comparadas ao grupo que congelou em estágio de pró-núcleo, eram mais jovens e tiveram mais óvulos assim como as pacientes do nosso estudo. As taxas de sobrevivência ao descongelamento foram de 85% no grupo que congelou em estágio de pró-núcleo e 70% no grupo que congelou blastocistos, com risco relativo para não sobrevivência de 1,350 (IC 95% 1,114 – 1,636, $p=0,003$). Embora mais embriões sobrevivessem no grupo que congelou em estágio de pró-núcleo, as taxas de implantação (21,5% versus 40,8%, RR 0,729 [IC 95% 0,580 – 0,916], $p=0,002$) e as taxas de nascido-vivo cumulativas (43,8% versus 67,6%, RR 0,726 [IC 95% 0,553 – 0,952], $p=0,026$) foram significativamente menores no grupo que congelou no estágio de dois pró-núcleos. Surrey et al., em 2010, sugeriram que o congelamento de todos os embriões com o intuito de se prevenir síndrome de hiperestimulação em pacientes com alta resposta deveria ser feito no estágio de blastocisto, por permitir maiores taxas de gravidez cumulativa.⁽²⁹⁾

Em 2015, Chen et al. estudaram uma corte retrospectiva de 162 mulheres que não realizaram transferência a fresco devido ao risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestimulação ovariana. Eram pacientes jovens (média etária de 29 anos), e para análise, foram divididas em dois grupos: pacientes que tiveram seus embriões vitrificados para posteriormente serem descongelados e transferidos em estágio de clivagem (n=70) ou blastocisto (n=92). O grupo que transferiu blastocistos, transferiu menos embriões (2,11 *versus* 2,37, $p=0,02$) e teve taxas de implantação (31,44% *versus* 18,67%, $p<0,05$) e gestação clínica mais altas (47,83 *versus* 31,43, $p<0,05$). Apesar de não ter havido diferenças nas taxas de gestação múltipla (34,09% *versus* 36,36%, valor-p não significativo), os autores concluíram que em pacientes com risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestimulação ovariana a criopreservação de blastocistos é mais interessante, pois permite a transferência de menos embriões com as mesmas taxas de gravidez quando comparado a embriões em estágio de clivagem, o que torna o tratamento mais seguro.⁽⁶⁹⁾

Para compensar essa diferença de nossa coorte em relação ao estágio embrionário na transferência que se manteve entre os grupos mesmo após a aplicação do escore de propensão, optamos por analisar dois subgrupos: transferência em estágio de clivagem e de blastocisto. Houve uma diferença absoluta a favor do *freeze-all* para os casos em que se transferiu blastocistos em relação às taxas de gestação clínica: 39,8% *versus* 32,4%. Em relação às taxas de gravidez clínica após transferências em estágio de clivagem fenômeno oposto: 32,3% no ciclo fresco *versus* 27,5% no ciclo *com freeze-all*. Essas diferenças têm importância clínica, mas não alcançaram significância estatística, provavelmente devido à perda de tamanho amostral ao se optar pelo pareamento 1:2 da coorte para o método do escore de propensão e pela análise de subgrupos de acordo com estágio de transferência embrionária.

Nosso estudo tem algumas limitações inerentes ao seu desenho. Na coorte analisada de ciclos com resposta normal à indução da ovulação, 175 casos tinham dados incompletos e inconsistências. Dados incompletos e inconsistências são esperados em estudos retrospectivos envolvendo banco de dados e revisão de prontuários médicos e acreditamos que a quantidade que tivemos (4,21%) não comprometeu a análise dos dados, por isso não aplicamos ferramentas estatísticas para esse fim como previamente descrito na literatura.⁽⁷⁰⁾

Outra limitação a se considerar é que as razões pelas quais se optou pelo *freeze-all* não estavam explícitas no banco de dados e nem se teve acesso aos níveis séricos de progesterona no dia da deflagração da ovulação (*trigger*). Esse último ponto tem importância clínica e é bastante discutido na literatura médica.

Roque et al., no ano de 2015, publicaram um estudo observacional com uma corte de pacientes com resposta normal à indução da ovulação: ciclo fresco (n=351) e o ciclo com *freeze-all* (n=179). Após análise de regressão logística múltipla, encontrou-se uma razão de chances de 1,73 (IC 95% 1,16 – 2,58, p=0,008) favorecendo o *freeze-all* para gestação evolutiva. Como o estudo envolveu apenas pacientes com resposta normal à estimulação ovariana e níveis séricos de progesterona no dia do *trigger* $\leq 1,5\text{ng/dL}$, os autores concluíram que os resultados clínicos dos tratamentos de fertilização *in vitro* poderiam ser melhorados pelo emprego do *freeze-all* também nesse grupo de pacientes.⁽⁷¹⁾

Em 2016, Healy et al. publicaram os resultados de uma análise de uma coorte retrospectiva na qual comparavam o efeito da elevação da progesterona no dia do *trigger* (níveis séricos acima de 2ng/dL) sobre a qualidade embrionária e endometrial e sobre as taxas de implantação e gravidez. Houve comparações entre três grupos diferentes: a mesma paciente após dois ciclos de transferência, sendo primeira a fresco e segunda descongelada (n=608); pacientes diferentes com transferência a fresco (n=3269) ou de descongelado (n=834) independente da qualidade embrionária e pacientes diferentes que só transferiram blastocistos de boa qualidade a fresco (n=1437) ou descongelados (n=595). Os autores não observaram interferência da qualidade embrionária nos resultados. Entretanto, quando compararam as taxas de nascido-vivo por transferência em pacientes com progesterona elevada que transferiam embriões a fresco e descongelados, os resultados foram: 10% *versus* 47% (p=0,02) no grupo pareado para a mesma paciente, 15% *versus* 51% (p=0,001) na comparação entre pacientes diferentes transferindo a fresco ou descongelado e 28% *versus* 51% (p=0,03) na comparação entre pacientes diferentes que transferiram embriões de boa qualidade. Os autores concluíram que o congelamento de todos os embriões para ciclos nos quais a progesterona se eleva acima de 2ng/dL é recomendável, e que essa elevação não teria efeito negativo sobre a qualidade embrionária.⁽⁷²⁾

Aghahosseini et al. em 2017 publicaram estudo prospectivo randomizado envolvendo 72 mulheres com nível sérico elevado de progesterona no dia

do *trigger* (acima de 1,8ng/dL). As pacientes tinham bom prognóstico reprodutivo: média etária de 31 anos e número médio de óvulos maduros de 10. Elas foram divididas em dois grupos: 36 fizeram ciclo fresco e 36 ciclos com *freeze-all*. Ambos os grupos transferiram em estágio de blastocisto, um ou dois embriões. A taxa de nascido-vivo foi de 41,66% (15/36) para ambos os grupos. Os autores concluíram que para esse grupo de pacientes com níveis de progesterona sérica elevada no dia do *trigger* o congelamento de todos os embriões não resultou em melhores resultados reprodutivos comparado à transferência a fresco.⁽⁷³⁾

Wang et al. em 2017 publicaram estudo retrospectivo multicêntrico realizado nos Estados Unidos envolvendo 13791 ciclos, dos quais foram extraídos 1455 ciclos com *freeze-all* e 1455 frescos, que foram pareados 1:1 para idade, índice de massa corpórea, diagnóstico, testes de reserva ovariana, número de óvulos e de embriões disponíveis e transferidos. A média etária após o pareamento foi de 34 anos e o número médio de óvulos foi de 21, ou seja, eram pacientes de alta resposta à estimulação ovariana e de alto risco para síndrome de hiperestimulação ovariana. Comparando-se os grupos fresco e *freeze-all* os resultados foram: taxa de implantação de 42% *versus* 46,8% ($p < 0,01$) e taxa de gravidez evolutiva de 45,3% *versus* 52% ($p < 0,001$). A razão de chances para gravidez evolutiva foi 1,31 (IC 95% 1,13 – 1,51, $p < 0,001$) favorecendo o grupo com transferência de descongelados. Nesse estudo, os autores ainda fizeram uma análise secundária de acordo com o nível sérico de progesterona no dia do *trigger* da ovulação. Para os casos com nível abaixo de 1ng/dL, não houve diferença entre o grupo fresco e *freeze-all*. Para os casos com nível sérico de progesterona no dia do *trigger* da ovulação acima de 1ng/dL, houve mais gestações evolutivas no grupo que transferiu embriões descongelados. Isso foi mais evidente nas pacientes acima de 35 anos: 35,2% em 374 ciclos *versus* 48,4% em 395 ciclos, com razão de chances de 1,73 (IC 95% 1,34 – 2,24, $p < 0,0001$). Os autores concluíram que a estratégia de *freeze-all* para pacientes de alta resposta à estimulação resulta em melhores taxas de implantação e gravidez evolutiva do que a transferência a fresco. Os autores destacam que isso ocorre possivelmente por um efeito deletério da estimulação ovariana sobre o endométrio e que esse efeito parece ser ainda mais pronunciado em casos de elevação prematura de progesterona e em pacientes com mais de 35 anos.⁽⁶³⁾

Como se pode ver, embora haja uma preocupação em torno dos níveis séricos de progesterona no dia do *trigger* da ovulação, não existe um consenso

sobre o valor de corte a ser adotado como limite para se indicar o *freeze-all*. Uma questão importante quando se consideram os níveis séricos de progesterona é sua relação com os níveis de estradiol. Alguns autores sugerem utilizar a relação progesterona/estradiol elevada (valor de corte superior a 1) como forma de diferenciar os casos em que a elevação teria maior impacto negativo sobre a implantação.⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾

Outra limitação do presente estudo é não ter tido acesso aos dados perinatais dos ciclos estudados. Estudos recentes têm demonstrado diferenças entre os ciclos com transferência a fresco e de embriões descongelados também para desfechos obstétricos e perinatais: restrição de crescimento fetal e baixo peso ao nascer, por exemplo, estão mais associados a transferências a fresco enquanto pré-eclâmpsia esteve mais associada a ciclos de transferência de descongelados. Transferências de embriões descongelados também estão menos associadas à morbidade perinatal.⁽⁷⁷⁻⁸⁰⁾

Em nosso estudo, o intervalo médio de tempo entre o congelamento de todos os embriões e a transferência foi de 83 dias. Houve 13 casos em que esse intervalo foi superior a um ano (sendo o valor máximo de 966 dias). As informações obtidas no banco de dados e em prontuário não permitiram dizer porque os intervalos foram tão longos nesses casos, mas é provável que a intenção dos casais desde do início era de preservação da fertilidade a fim de postergar a gestação. Por isso, para se ter uma estimativa mais próxima de qual o intervalo de tempo entre o congelamento e a primeira transferência para casos onde a intenção não era preservação de fertilidade, optamos por analisar a mediana de tempo, que foi de 54 dias.

A importância clínica desse intervalo de tempo é bastante discutida na literatura. Estudo retrospectivo de Higgins et al. avaliou 4994 pacientes que transferiram embriões descongelados entre 2000 e 2014 na Austrália e Nova Zelândia. As pacientes foram divididas em dois grupos: transferiram embriões entre 25 a 35 dias ou de 50 a 70 dias após a coleta de óvulos. Os autores encontraram menor taxa de nascido-vivo para o grupo com maior intervalo de tempo: 21,5% *versus* 27,6%, com razão de chances ajustada de 1,36 (IC 95% 1,07 – 1,74, p=0,013). O trabalho envolvia apenas 13,7% de casos de *freeze-all* no grupo de 50 a 70 dias de intervalo e 30,6% no de 25 a 35 dias de intervalo. Os demais casos eram de pacientes que haviam transferido a fresco e estavam fazendo uma segunda transferência de embriões descongelados. Mesmo após parear a coorte para essa e outras variáveis, as diferenças permaneceram em favor do grupo com menor intervalo: 22,1% *versus*

27,6%, com razão de chances de 1,31 (1,02 – 1,67, $p=0,032$). Os autores concluíram que a estratégia de aguardar mais de um ciclo menstrual para transferir os embriões congelados depois da estimulação não se justificou.⁽⁸¹⁾

Kaye et al. publicaram em 2018 estudo retrospectivo envolvendo pacientes que fizeram transferência de embriões descongelados de ciclos de fertilização realizados entre 2013 e 2016. A ideia central foi avaliar se o tipo de droga utilizada para o *trigger* ao final da estimulação ovariana (hCG ou agonistas do GnRH) e o tempo decorrido entre essa estimulação e a transferência de embriões (ciclo imediato ou ciclos subsequentes até 120 dias) poderiam impactar sobre as taxas de gravidez evolutiva. O intervalo de tempo médio para o grupo imediato foi de 37 dias (23-78 dias) e para o grupo de ciclos subsequentes até 120 dias foi de 69 dias (variando de 51 a 120 dias). No primeiro grupo, 59 dos 80 ciclos (73,8%) eram ciclos de *freeze-all* enquanto que no segundo 167 de 264 ciclos (63,3%) o eram. A razão de chances para gravidez evolutiva ajustada para o tipo de *trigger* no grupo transferência tardia em comparação com transferência imediata foi de 1,48 ($p=0,17$). Os autores concluíram que há uma tendência de que transferir embriões descongelados mais tardiamente seria melhor em comparação a transferir no primeiro ciclo após a coleta de óvulos, independente do tipo de *trigger* da ovulação utilizado.⁽⁸²⁾

Ozgur et al. analisaram dados retrospectivos de 1191 ciclos de transferência de embriões vitrificados estratificados para os seguintes intervalos: 32 a 46 dias, 47 a 61 dias, 62 a 76 dias, 77 a 91 dias e 92 dias ou mais. Após ajuste para número de embriões transferidos, tipo de droga utilizada no *trigger*, número de óvulos obtidos e idade materna, os autores não encontraram qualquer associação da variável estudada em relação ao desfecho nascido-vivo. Concluíram que não há razão para se postergar a transferência de embrião em mais de um ciclo quando se opta pelo *freeze-all*.⁽⁸³⁾

Lattes et al. compararam 263 pacientes que transferiram embriões no primeiro ciclo menstrual com pacientes que esperaram dois ou mais ciclos (tempo médio de $24,8 \pm 3,99$ dias *versus* $76,5 \pm 37,6$ dias, $p < 0,001$). Na análise multivariada, não houve diferença em relação a taxa de nascido-vivo entre os dois grupos, com razão de chances de 0,727 (IC 95% 0,489 – 1,080, $p=0,115$). Os autores concluíram que em ciclos com *freeze-all*, iniciar o ciclo de preparo para transferência de descongelados logo depois da coleta de óvulos, quando a paciente menstruava, não impactou de maneira negativa sobre os resultados de gravidez.⁽⁸⁴⁾

Em 2018, Bourdon et al. publicaram estudo observacional retrospectivo sobre ciclos de *freeze-all* realizados na França entre 2012 e 2015. A média etária das pacientes era de 33 anos e o número médio de óvulos recuperados de 15. A principal indicação para o congelamento de todos os embriões foi o risco de síndrome de hiperestimulação ovariana. O objetivo dos autores foi avaliar se o tempo decorrido entre o congelamento e a transferência faria diferença em relação à taxa de gestação e resultados perinatais. As mulheres foram divididas em dois grupos: transferiram no primeiro ciclo pós-fertilização (n=188) ou esperaram dois ou mais ciclos (n=265). As taxas de nascido-vivo foram de 31,38% *versus* 29,72% (p=0,696), a incidência de prematuridade foi de 6,78% *versus* 8,24% (p=0,505) e de baixo peso ao nascer foi 3,39% *versus* 7,32% (p=0,271) para a transferência imediata e retardada, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A conclusão dos autores foi que retardar a transferência de embriões em casos de *freeze-all* por mais de um ciclo em comparação a retardar por apenas um ciclo não traz benefícios em termos de maior chance de nascido-vivo e de resultados perinatais.⁽⁸⁵⁾

Nota-se, portanto, que há um consenso na literatura de que o intervalo de tempo entre o congelamento dos embriões e a transferência após o descongelamento tem pouco ou nenhum impacto sobre os resultados clínicos obtidos com a transferência. Embora não tenhamos avaliado essa associação em nosso estudo, a consideramos de pouca importância clínica frente ao que já se tem na literatura médica. Fato indiscutível, porém, é que a estratégia de *freeze-all* aumenta o tempo para se realizar a transferência, que no limite é o que permitirá a paciente engravidar. Além disso, aumenta custos porque gera congelamentos e descongelamentos obrigatórios que não necessariamente ocorreriam ao se optar pelo ciclo fresco. Não há unanimidade em relação a sua custo-efetividade, havendo resultados favoráveis, neutros e desfavoráveis em relação ao *freeze-all*.^(43,86,87)

Em nosso estudo, observamos que o *freeze-all* para pacientes com resposta normal à indução da ovulação apresentou taxas equivalentes de gravidez clínica quando comparado ao ciclo fresco. Esses achados dão segurança para aplicação do *freeze-all* na prática clínica em nosso meio. Seu uso para todas as pacientes, como rotineiramente se faz para pacientes de alta resposta à indução da ovulação, entretanto, não se sustenta à luz dos nossos resultados e das evidências atuais.

5 CONCLUSÕES

1. O *freeze-all* para pacientes com resposta normal à indução da ovulação apresentou taxas equivalentes de gravidez clínica quando comparado ao ciclo fresco;

2. As pacientes do grupo *freeze-all* eram mais jovens, apresentavam diferente distribuição das causas de infertilidade, com mais frequência utilizaram gonadotrofinas com antagonistas do GnRH para estimulação ovariana e tiveram mais óvulos e melhor qualidade embrionária do que aquelas que transferiam a fresco;

3. A idade e o número de óvulos estiveram associados ao desfecho primário gestação clínica;

4. Quando ajustado para idade da mulher e número de óvulos obtidos, não houve diferença estatisticamente significativa entre as pacientes que transferiram embriões a fresco e as que transferiram embriões descongelados em relação às taxas de gravidez (clínica, evolutiva e múltipla), à taxa de implantação e à taxa de abortamento;

5. A transferência de blastocistos descongelados esteve associada a maior probabilidade de gestação clínica, quando comparada à transferência de blastocistos frescos e quando comparada à transferência de embriões em estágio de clivagem descongelados;

6. A estratégia de *freeze-all* esteve associada a maior probabilidade de gestação clínica para mulheres a partir dos 40 anos.

6 REFERÊNCIAS

1. Fertilization in vitro [Internet]. Bethesda MD: United States National Library of Medicine; 1979 [cited 2019 Mar 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=fertilization+in+vitro>
2. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366.
3. Dyer S, Chambers GM, de Mouzon J, Nygren KG, Zegers-Hochschild F, Mansour R, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology 2008, 2009 and 2010. *Hum Reprod*. 2016;31(7):1588–609.
4. Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC, Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev*. 2006;27(2):170–207.
5. Wong KM, Mastenbroek S, Repping S. Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertil Steril*. 2014;102(1):19–26.
6. Polyzos NP, Drakopoulos P, Parra J, Pellicer A, Santos-Ribeiro S, Tournaye H, et al. Cumulative live birth rates according to the number of oocytes retrieved after the first ovarian stimulation for in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a multicenter multinational analysis including ~15,000 women. *Fertil Steril*. 2018;110(4):661–70.
7. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305(5936):707–9.
8. Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril*. 1988;49(5):743–64.
9. Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskői B, Cseh S. Cryopreservation of embryos and oocytes in human assisted reproduction. *Biomed Res Int*. 2014;2014:307268.
10. Simopoulou M, Asimakopoulos B, Bakas P, Boyadjiev N, Tzanakaki D, Creatsas G. Oocyte and embryo vitrification in the IVF laboratory: a comprehensive review. *Folia Med (Plovdiv)*. 2014;56(3):161–9.
11. Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, et al. Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum Reprod Update*. 2017;23(2):139–55.
12. Levron J, Leibovitz O, Brengauz M, Gitman H, Yerushalmi GM, Katorza E, et al. Cryopreservation of day 2-3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing. *Gynecol Endocrinol*. 2014;30(3):202–4.
13. Li Z, Wang YA, Ledger W, Edgar DH, Sullivan EA. Clinical outcomes following cryopreservation of blastocysts by vitrification or slow freezing: a population-based cohort study. *Hum Reprod*. 2014;29(12):2794–801.
14. Selman H, Brusco GF, Fiorini F, Barnocchi N, Mariani M, El-Danasouri I. Vitrification is a highly efficient method to cryopreserve human embryos in in vitro fertilization patients at high risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *Fertil Steril*. 2009;91(4 Suppl):1611–3.

15. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. High ongoing pregnancy rates after deferred transfer through bipronuclear oocyte cryopreservation and post-thaw extended culture. *Fertil Steril*. 2009;92(5):1594–9.
16. Griesinger G, Schultz L, Bauer T, Broessner A, Frambach T, Kissler S. Ovarian hyperstimulation syndrome prevention by gonadotropin-releasing hormone agonist triggering of final oocyte maturation in a gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in combination with a "freeze-all" strategy: a prospective multicentric study. *Fertil Steril*. 2011;95(6):2029-33, 2033.e1.
17. Xie X, Zou L, Shen Y, Xiong F, Chen J. Vitrification technology in whole embryo freezing. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2010;35(7):673–8.
18. Fuller B, Paynter S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(6):680–91.
19. de Ziegler D, Shoham Z. Survey results: triggering of ovulation with GnRH-a in ART: Worldwide feedback on an emerging new option with great potential [Internet]. [S.l.]: IVF WorldWide; c2008 [cited 2019 Mar 17]. Available from: <https://ivf-worldwide.com/survey/vitrification,-gnrh-trigger-and-differed-et/results-vitrification,-gnrh-trigger-and-differed-et.html>.
20. Centers for Disease Control and Prevention. American Society for Reproductive Medicine. Society for Assisted Reproductive Technology. 2016 Assisted Reproductive Technology National Summary Report. Atlanta (GA): US Dept of Health and Human Services; 2018.
21. Calhaz-Jorge C, De Geyter C, Kupka MS, de Mouzon J, Erb K, Mocanu E, et al.; European IVF-monitoring Consortium (EIM); European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2013: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2017;32(10):1957–73.
22. Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby J, Musri C, Urbina MT; Latin American Network of Assisted Reproduction (REDLARA). Assisted reproductive techniques in Latin America: the Latin American Registry, 2015. *Reprod Biomed Online*. 2018;37(6):685–92.
23. Boothroyd C, Karia S, Andreadis N, Rombauts L, Johnson N, Chapman M; Australasian CREI Consensus Expert Panel on Trial evidence (ACCEPT) group. Consensus statement on prevention and detection of ovarian hyperstimulation syndrome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2015;55(6):523-34.
24. Tarlatzi TB, Venetis CA, Devreker F, Englert Y, Delbaere A. What is the best predictor of severe ovarian hyperstimulation syndrome in IVF? A cohort study. *J Assist Reprod Genet*. 2017;34(10):1341–51.
25. Horcujadas JA, Riesewijk A, Polman J, van Os R, Pellicer A, Mosselman S, et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(3):195–205.
26. Haouzi D, Assou S, Dechanet C, Anahory T, Dechaud H, De Vos J, et al. Controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization alters endometrial receptivity in humans: protocol effects. *Biol Reprod*. 2010;82(4):679–86.
27. Acharya KS, Acharya CR, Bishop K, Harris B, Raburn D, Muasher SJ. Freezing of all embryos in in vitro fertilization is beneficial in high responders, but not intermediate and low

responders: an analysis of 82,935 cycles from the Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertil Steril*. 2018;110(5):880–7.

28. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfers in high responders. *Fertil Steril*. 2011;96(2):516–8.

29. Surrey E, Keller J, Stevens J, Gustofson R, Minjarez D, Schoolcraft W. Freeze-all: enhanced outcomes with cryopreservation at the blastocyst stage versus pronuclear stage using slow-freeze techniques. *Reprod Biomed Online*. 2010;21(3):411–7.

30. Coutifaris C. "Freeze Only"--An evolving standard in clinical in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2016;375(6):577-9.

31. D'Angelo A, Amso N. Embryo freezing for preventing ovarian hyperstimulation syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007;(3):CD002806.

32. Sills ES, McLoughlin LJ, Genton MG, Walsh DJ, Coull GD, Walsh AP. Ovarian hyperstimulation syndrome and prophylactic human embryo cryopreservation: analysis of reproductive outcome following thawed embryo transfer. *J Ovarian Res*. 2008;1(1):7.

33. Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. *Hum Reprod*. 2011;26(10):2593–7.

34. Mourad S, Brown J, Farquhar C. Interventions for the prevention of OHSS in ART cycles: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1:CD012103.

35. Ferraretti AP, Gianaroli L, Magli C, Fortini D, Selman HA, Feliciani E. Elective cryopreservation of all pronucleate embryos in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome: efficiency and safety. *Hum Reprod*. 1999;14(6):1457–60.

36. Vyjayanthi S, Tang T, Fattah A, Deivanayagam M, Bardis N, Balen AH. Elective cryopreservation of embryos at the pronucleate stage in women at risk of ovarian hyperstimulation syndrome may affect the overall pregnancy rate. *Fertil Steril*. 2006;86(6):1773–5.

37. Zhou F, Lin XN, Tong XM, Li C, Liu L, Jin XY, et al. A frozen-thawed embryo transfer program improves the embryo utilization rate. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(17):1974–8.

38. Braga DP, Setti AS, Figueira RC, Azevedo MC, Iaconelli A Jr, Lo Turco EG, et al. Freeze-all, oocyte vitrification, or fresh embryo transfer? Lessons from an egg-sharing donation program. *Fertil Steril*. 2016;106(3):615–22.

39. Borges E Jr, Braga DP, Setti AS, Vingris LS, Figueira RC, Iaconelli A Jr. Strategies for the management of OHSS: results from freezing-all cycles. *JBRA Assist Reprod*. 2016;20(1):8–12.

40. Wong KM, van Wely M, Mol F, Repping S, Mastenbroek S. Fresh versus frozen embryo transfers in assisted reproduction. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;3:CD011184.

41. Roque M, Haahr T, Geber S, Esteves SC, Humaidan P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in IVF/ICSI cycles: a systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update*. 2019;25(1):2–14.

42. Fasano G, Fontenelle N, Vannin AS, Biramane J, Devreker F, Englert Y, et al. A randomized controlled trial comparing two vitrification methods versus slow-freezing for cryopreservation of human cleavage stage embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31(2):241–7.
43. Le KD, Vuong LN, Ho TM, Dang VQ, Pham TD, Pham CT, et al. A cost-effectiveness analysis of freeze-only or fresh embryo transfer in IVF of non-PCOS women. *Hum Reprod.* 2018;33(10):1907–14.
44. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril.* 2011;96(2):344–8.
45. Chen YH, Xu XH, Wang Q, Zhang SD, Jiang LL, Zhang CL, et al. Optimum oocyte retrieved and transfer strategy in young women with normal ovarian reserve undergoing a long treatment protocol: a retrospective cohort study. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(10):1459–67.
46. Bourdon M, Santulli P, Gayet V, Maignien C, Marcellin L, Pocate-Cheriet K, et al. Assisted reproduction technique outcomes for fresh versus deferred cryopreserved day-2 embryo transfer: a retrospective matched cohort study. *Reprod Biomed Online.* 2017;34(3):248-57.
47. Chang JC, Chen MJ, Guu HF, Chen YF, Yi YC, Kung HF, et al. Does the "freeze-all" policy allow for a better outcome in assisted reproductive techniques than the use of fresh embryo transfers? A retrospective study on cumulative live birth rates. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2017;56 (6):775-80.
48. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all cycle for all normal responders? *J Assist Reprod Genet.* 2017;34(2):179–85.
49. Shi Y, Sun Y, Hao C, Zhang H, Wei D, Zhang Y, et al. Transfer of fresh versus frozen embryos in ovulatory women. *N Engl J Med.* 2018;378(2):126–36.
50. Vuong LN, Dang VQ, Ho TM, Huynh BG, Ha DT, Pham TD, et al. IVF Transfer of fresh or frozen embryos in women without polycystic ovaries. *N Engl J Med.* 2018;378(2):137–47.
51. Wei D, Liu JY, Sun Y, Shi Y, Zhang B, Liu JQ, et al. Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2019;393(10178):1310–8.
52. Bosdou JK, Venetis CA, Tarlatzis BC, Grimbizis GF, Kolibianakis EM. Higher probability of live-birth in high, but not normal, responders after first frozen-embryo transfer in a freeze-only cycle strategy compared to fresh-embryo transfer: a meta-analysis. *Hum Reprod.* 2019;34(3):491–505.
53. Roque M, Valle M, Sampaio M, Geber S. Does freeze-all policy affect IVF outcome in poor ovarian responders? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2018;52(4):530–4.
54. Xue Y, Tong X, Zhu H, Li K, Zhang S. Freeze-all embryo strategy in poor ovarian responders undergoing ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Gynecol Endocrinol.* 2018;34(8):680–3.
55. 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. *Hum Reprod.* 2017;32(9):1786–801.

56. Racowsky C, Vernon M, Mayer J, Ball GD, Behr B, Pomeroy KO, et al. Standardization of grading embryo morphology. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(8):437–9.
57. Conselho Federal de Medicina. Resolução n. 1957, de 2010. Normas éticas para a utilização das técnicas de reprodução assistida [Internet]. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil (DF)*; 2011 [citado 2019 Mar 17]. Disponível em: http://www.portalmedico.org.br/resolucoes/CFM/2010/1957_2010.htm.
58. Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology; Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertil Steril.* 2018;109(3):429-36.
59. Bashiri A, Halper KI, Orvieto R. Recurrent Implantation Failure-update overview on etiology, diagnosis, treatment and future directions. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018;16(1):121.
60. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reprod Biomed Online.* 2014;29(3):286–90.
61. Magdi Y, El-Damen A, Fathi AM, Abdelaziz AM, Abd-Elfatah Youssef M, Abd-Allah AA, et al. Revisiting the management of recurrent implantation failure through freeze-all policy. *Fertil Steril.* 2017;108(1):72–7.
62. Zhu Q, Chen Q, Wang L, Lu X, Lyu Q, Wang Y, et al. Live birth rates in the first complete IVF cycle among 20 687 women using a freeze-all strategy. *Hum Reprod.* 2018;33(5):924–9.
63. Wang A, Santistevan A, Hunter Cohn K, Copperman A, Nulsen J, Miller BT, et al. Freeze-only versus fresh embryo transfer in a multicenter matched cohort study: contribution of progesterone and maternal age to success rates. *Fertil Steril.* 2017;108(2):254–61.e4.
64. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Freeze-all at the blastocyst or bipronuclear stage: a randomized clinical trial. *Fertil Steril.* 2015;104(5):1138–44.
65. He QH, Wang L, Liang LL, Zhang HL, Zhang CL, Li HS, et al. Clinical outcomes of frozen-thawed single blastocyst transfer in patients requiring whole embryo freezing. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(2):133–8.
66. Zacà C, Bazzocchi A, Pennetta F, Bonu MA, Coticchio G, Borini A. Cumulative live birth rate in freeze-all cycles is comparable to that of a conventional embryo transfer policy at the cleavage stage but superior at the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2018;110(4):703–9.
67. Austin PC. An introduction to propensity score methods for reducing the effects of confounding in observational studies. *Multivariate Behav Res.* 2011;46(3):399–424.
68. Vrtacnik U, Vrtacnik Bokal E, Devjak R. Cumulative delivery rate after providing full reimbursement in vitro fertilization programme: a 6-years survey. *Biomed Res Int.* 2014;2014:850478.
69. Chen H, Lv JQ, Wu XM, Xiao Y, Xi HT, Zhu CF, et al. Blastocyst-stage versus cleavage-stage embryo transfer in the first frozen cycles of OHSS-risk patients who deferred from fresh embryo transfer. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(9):698–701.

70. Pedersen AB, Mikkelsen EM, Cronin-Fenton D, Kristensen NR, Pham TM, Pedersen L, et al. Missing data and multiple imputation in clinical epidemiological research. *Clin Epidemiol*. 2017;9:157–66.
71. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Freeze-all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril*. 2015;103(5):1190–3.
72. Healy MW, Patounakis G, Connell MT, Devine K, DeCherney AH, Levy MJ, et al. Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles? *Fertil Steril*. 2016;105(1):93–9.e1.
73. Aghahosseini M, Aleyasin A, Sarfjoo FS, Mahdavi A, Yaraghi M, Saeedabadi H. In vitro fertilization outcome in frozen versus fresh embryo transfer in women with elevated progesterone level on the day of HCG injection: an RCT. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*. 2017;15(12):757–62.
74. Younis JS, Matilsky M, Radin O, Ben-Ami M. Increased progesterone/estradiol ratio in the late follicular phase could be related to low ovarian reserve in in vitro fertilization-embryo transfer cycles with a long gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril*. 2001;76(2):294–9.
75. Ozçakir HT, Levi R, Tavmergen E, Göker EN. Premature luteinization defined as progesterone estradiol ratio >1 on hCG administration day seems to adversely affect clinical outcome in long gonadotropin-releasing hormone agonist cycles. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30(2):100–4.
76. Ou YC, Lan KC, Chang SY, Kung FT, Huang FJ. Increased progesterone/estradiol ratio on the day of HCG administration adversely affects success of in vitro fertilization-embryo transfer in patients stimulated with gonadotropin-releasing hormone agonist and recombinant follicle-stimulating hormone. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2008;47(2):168–74.
77. Kansal Kalra S, Ratcliffe SJ, Milman L, Gracia CR, Coutifaris C, Barnhart KT. Perinatal morbidity after in vitro fertilization is lower with frozen embryo transfer. *Fertil Steril*. 2011;95(2):548–53.
78. Bhattacharya S. Maternal and perinatal outcomes after fresh versus frozen embryo transfer-what is the risk-benefit ratio? *Fertil Steril*. 2016;106(2):241–3.
79. Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2012;98(2):368-77.e1-9.
80. Chen ZJ, Shi Y, Sun Y, Zhang B, Liang X, Cao Y, et al. Fresh versus frozen embryos for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*. 2016;375(6):523–33.
81. Higgins C, Healey M, Jatkar S, Vollenhoven B. Interval between IVF stimulation cycle and frozen embryo transfer: is there a benefit to a delay between cycles? *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2018;58(2):217–21.
82. Kaye L, Marsidi A, Rai P, Thorne J, Nulsen J, Engmann L, et al. Frozen blastocyst transfer outcomes in immediate versus delayed subsequent cycles following GnRH agonist or hCG triggers. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(4):669–75.

83. Ozgur K, Bulut H, Berkkanoglu M, Humaidan P, Coetzee K. Frozen embryo transfer can be performed in the cycle immediately following the freeze-all cycle. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(1):135–42.
84. Lattes K, Checa MA, Vassena R, Brassesco M, Vernaev V. There is no evidence that the time from egg retrieval to embryo transfer affects live birth rates in a freeze-all strategy. *Hum Reprod.* 2017;32(2):368–74.
85. Bourdon M, Santulli P, Maignien C, Pocate-Cheriet K, Alwohaibi A, Marcellin L, et al. The interval between oocyte retrieval and frozen-thawed blastocyst transfer does not affect the live birth rate and obstetrical outcomes. *PLoS One.* 2018;13(10):e0206067.
86. Roque M, Valle M, Guimarães F, Sampaio M, Geber S. Cost-effectiveness of the freeze-all policy. *JBRA Assist Reprod.* 2015;19(3):125–30.
87. Papaleo E, Pagliardini L, Vanni VS, Delprato D, Rubino P, Candiani M, et al. A direct healthcare cost analysis of the cryopreserved versus fresh transfer policy at the blastocyst stage. *Reprod Biomed Online.* 2017;34(1):19–26.

Abstract

Introduction: The most common clinical practice in IVF cycles is fresh embryo transfer in the same cycle of the ovulation induction. This strategy increases the risk of ovarian hyperstimulation syndrome and unfavorable obstetric and perinatal outcomes such as fetal growth restriction and low birth weight. It may also alter endometrial receptivity and negatively impact embryonic implantation rates. With the current embryonic freezing technique called vitrification, embryonic survival rates after thawing are higher than 90% and pregnancy rates similar to fresh transfer, especially in cases of high response to ovulation induction. In order to prevent or minimize these adverse effects of fresh embryo transfer, all embryos can be frozen after ovulation induction for deferred transfer, a strategy known as freeze-all. **Purpose:** To compare the clinical pregnancy rate of in vitro fertilization cycles in patients with normal response to ovulation induction (4 to 15 mature eggs retrieved) who performed a fresh transfer or freeze-all strategy. **Methods:** A retrospective cohort study was carried out to analyze the medical records and database of private human reproduction centers between 2013 and 2017 involving women submitted to in vitro fertilization treatments with a normal response to ovarian stimulation. The groups were paired by the propensity score method and balanced for age and number of eggs. **Results:** A total of 3679 cycles of in vitro fertilization were analyzed, with 3208 conventional cycles and 471 segmented cycles. The mean age was 35.26 years and the mean number of eggs was 7.53. The patients who underwent segmented cycle were younger and had more mature eggs collected. When paired for both variables by the propensity score method, there was no statistically significant difference between the groups in relation to the clinical pregnancy rate: 32.5% for the segmented cycle and 32.3% for the conventional cycle ($p=0.936$), regardless the development stage of the transferred embryos. **Conclusion:** When adjusted for the age of the woman and the number of eggs obtained, there was no statistically significant difference in clinical pregnancy rates between the patients who underwent fresh transfer and those who had frozen all the embryos.

Keywords: Fertilization in vitro; Embryo transfer; Cryopreservation; Ovulation induction; Ovarian hyperstimulation syndrome

Bibliografia consultada

1. Agresti A. Categorical data analysis. 2nd ed. Danvers: Wiley Interscience; 2002.
2. Pinheiro JC, Bates DM. Mixed-effects models in S and S-Plus. New York: Springer-Verlag; 2000.
3. Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall/CRC; 1991.
4. Rosenbaum PR, Rubin DB. Constructing a control group using multivariate matched sampling methods that incorporate the propensity score. *Am Stat.* 1985;39(1):33–8.
5. Liang KY, Zeger SL. Longitudinal data analysis using generalized linear models. *Biometrika.* 1986;73(1):13–22.
6. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2015.
7. Corp IB. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk (NY): IBM Corp; 2016.
8. Bowers J, Fredrickson M. Package 'Rltools': randomization inference Tools, 2018.
9. Hansen BB, Bowers J. Covariate balance in simple, stratified and clustered comparative studies. *Stat Sci.* 2008;23(2):219–36.
10. Ho DE, Kosuke I, King G, Stuart EA. Matching as nonparametric preprocessing for reducing model dependence in parametric causal inference. *Polit Anal.* 2007;15(3):199–236.