

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



LILIAN DE FREITAS AGUIAR

ANÁLISE COMPARATIVA DOS MICROAMBIENTES FORMADOS NA CULTURA
DE PRÉ-EMBRIÕES NO DISPOSITIVO INVOCELL™ E NA TÉCNICA DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* CONVENCIONAL

RIO DE JANEIRO

2018

LÍLIAN DE FREITAS AGUIAR

**ANÁLISE COMPARATIVA DOS MICROAMBIENTES FORMADOS NA CULTURA
DE PRÉ-EMBRIÕES NO DISPOSITIVO INVOCELL™ E NA TÉCNICA DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* CONVENCIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação - *stricto sensu* - Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica.

Orientador: Tânia Maria Ruffoni Ortiga
Co-orientador: Francisco A. Colucci Coelho

RIO DE JANEIRO

2018

LÍLIAN DE FREITAS AGUIAR

ANÁLISE COMPARATIVA DOS MICROAMBIENTES FORMADOS NA CULTURA
DE PRÉ-EMBRIÕES NO DISPOSITIVO INVOCELL™ E NA TÉCNICA DE
FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* CONVENCIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação - *stricto sensu* - Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Formação para a Pesquisa Biomédica.

Aprovado em

Tânia Maria Ruffoni Ortiga

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Cremilda e Salvador, grandes exemplos de perseverança, a minha irmã e amiga para a vida toda, Lívia ao meu esposo Guto, meu maior incentivador e a minha filha Laura, meu amor mais puro.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer em primeiramente a Deus, pela sua constante companhia, por me capacitar a cada dia na busca pelo conhecimento e em especial por me permitir participar do milagre da vida. A Ele minha eterna gratidão. Ao meu pai e minha mãe, pelas palavras de incentivo e orações. A minha irmã Lívia por me apoiar de diferentes formas a seguir em frente. Ao meu marido, que sempre esteve ao meu lado trazendo motivação e suporte para não desistir. A minha filha Laura, minha alegria de viver, meu maior motivo por buscar sempre ir mais longe. Aos meus amigos, pelo apoio incondicional.

Também quero agradecer aos que estiveram diretamente envolvidos nesse trabalho: minha orientadora Dra. Tânia Ortiga e o co-orientador Dr. Francisco Colucci, obrigada por todo tempo despendido, pela paciência e por acreditarem em mim, de igual forma agradeço Dra. Flávia Bloise.

Agradeço ao Dr. Elkin Lucena, por compartilhar comigo seus conhecimentos científicos.

Em especial agradeço aos Diretores do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF, por me permitirem realizar toda a pesquisa em seu laboratório e pelo apoio financeiro durante todo o mestrado. Agradeço também as minhas colegas de trabalho, em especial a Gisele, por todo auxílio no período de pesquisa e escrita dessa Dissertação.

A todos meus sinceros agradecimentos.

Tu criaste o íntimo do meu ser e me teceste no ventre de minha mãe. Eu te louvo porque me fizeste de modo especial e admirável. Tuas obras são maravilhosas! Disso tenho plena certeza. Meus ossos não estavam escondidos de ti quando em secreto fui formado e entretecido como nas profundezas da terra. Os teus olhos viram o meu embrião; todos os dias determinados para mim foram escritos no teu livro antes de qualquer deles existir. Como são preciosos para mim os teus pensamentos, ó Deus!

Salmos 139:13-17

RESUMO

AGUIAR, Lílian de Freitas Aguiar. **Análise comparativa dos microambientes formados na cultura de pré-embriões no dispositivo INVOCell™ na técnica de fertilização *in vitro* convencional.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertação (Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica) – Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Introdução: As técnicas de cultivo estendido embrionário têm sido empregadas nos laboratórios de reprodução assistida, como uma das formas de selecionar o melhor pré-embrião. Um cultivo eficiente está associado a um custo mais elevado das técnicas. Para um alcance maior pela população menos privilegiada de recursos, um sistema de cultivo eficiente e financeiramente mais barato deve ser implantado. **Objetivo:** A presente dissertação foi desenvolvida objetivando comparar a técnica de cultura intravaginal INVO, através do dispositivo INVOCell™ com a técnica de FIV convencional, quando a quantidade e qualidade dos pré-embriões produzidos por ambas as técnicas, assim como o pH do meio de cultura dentro do dispositivo e a sua capacidade de manter o meio sem contaminação. **Métodos:** Os participantes foram divididos em 2 grupos, cada um com 8 casais, grupo G1 cultivo por 3 dias e o grupo G2 cultivo estendido por 5 dias. Cada casal teve 6 oócitos recuperados e foram divididos entre as técnicas. A comparação do número de oócitos fertilizados, desenvolvimento e qualidade dos blastocistos quanto à massa celular interna e o trofoectoderma foram utilizados para avaliar a eficiência das técnicas. A média do pH e a microbiologia foi realizada no grupo G2. Os pré-embriões em estágio de clivagem foram analisados quanto à taxa de fertilização, número de blastômeros e grau de fragmentação. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Teste t foi aplicado sendo consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. **Resultados:** No G2 foi obtida uma taxa de fertilização 79,16% e 75%, com 46,67% e 40% de formação de blastocistos, nas técnicas de INVO e FIV convencional respectivamente. No G1 a fertilização foi de 68,18% e 52,38%, para INVO e FIV respectivamente, e a taxa de clivagem ideal foi de 46,66% e 54,54%. **Conclusão:** A técnica de cultivo intravaginal utilizando o dispositivo INVOCell™ por 5 dias, foi implantada no Serviço de Medicina Reprodutiva do Hospital Escola Álvaro Alvin/Cinf-NF, uma vez que apresentou resultados semelhantes a técnica de FIV convencional.

Palavras-chave: Cultivo estendido, cultura intravaginal, dispositivo INVOCell, blastocisto, custos

Abstract

AGUIAR, Lílian de Freitas Aguiar. **Comparative analysis of microenvironments formed in pre-embryo culture in invocell™ device and in conventional *in vitro* fertilization technique.** Rio de Janeiro, 2018. Dissertation (professional master's in training for biomedical research) - Biophysics Institute Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Introduction: The embrionic extended cultivate techniques have been employed in assisted reproduction laboratories, as one of the ways to select the best pre-embryo. Efficient cultivation is associated with a higher cost of the techniques. For a greater reach by the less privileged population of resources, an efficient and financially cheaper cultivation system must be implemented. **Objective:** The present dissertation was developed to compare the INVO intravaginal culture technique, through the INVOCell™ device with the conventional IVF, regarding the quantity and quality of the pre-embryos produced by both techniques, as well as the pH of the culture medium inside of the device and its ability to maintain the medium without contamination. **Methods:** Participants were divided into 2 groups, each consisting of 8 couples, group G1 cultivation for three days and group G2 cultivation extended for five days. Each couple had 6 oocytes recovered and were divided between the techniques. Comparison of the number of fertilized oocytes, development and quality of the blastocysts regarding internal cell mass and trofoectoderm were used to evaluate the efficiency of the techniques performed. The mean pH and microbiology was performed in the G2 group. The pre-embryos in the cleavage stage were analyzed for the rate of fertilization, number of blastomeres and degree of fragmentation. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. Test t was applied and considered significant differences when $p < 0.05$. **Results:** In G2, 79.16% and 75% fertilization rate was obtained, with 46.67% and 40% blastocyst formation, in the INVO and conventional IVF techniques, respectively. In G1 fertilization was 68.18%, 52.38%, for INVO and IVF respectively, and the ideal cleavage rate was 46.66% and 54.54%. **Conclusion:** The intravaginal culture technique using the INVOCell™ device for 5 days was implanted in the Reproductive Medicine Service of the School Hospital Álvaro Alvin/Cinf-NF, since it presented results similar to conventional IVF technique.

Keywords: extented cultivation, intravaginal culture, INVOCell device, blastocyst, costs.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASRM	– Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva
BCTG	– Banco de Células e Tecidos Germinativos
CE	– Conformidade Européia
CFM	– Conselho Federal de Medicina
Cinf-NF	– Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense
COC	– Complexo Cúmulos oóforos
ESHRE	– Sociedade Europeia de Reprodução Humana e Embriologia
FDA	– Administração de Alimentos e Medicamentos
FIV	– Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	– Hormônio folículo estimulante
GnRH	– Hormônio liberador de gonadotrofina
hMG	- Gonadotrofina menopáusicas humana
HTF	– Fluido da tuba humana
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICM	– Massa celular interna
ICSI	– Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides
IMC	– Índice de massa corpórea
INVO	– Sistema de cultivo intravaginal
ISCA	– Infertilidade sem causa aparente
ISO	- Organização Internacional para Padronização

LH	– Hormônio luteinizante
MI	– Metáfase I
MII	– Metáfase II
OHSS	– Síndrome de hiperestímulo ovariano
OMS	– Organização Mundial de Saúde
ONU	– Organização das Nações Unidas
RA	– Reprodução Assistida
RDC	– Resolução da diretoria colegiada
SBRA	– Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida
SBRH	– Sociedade Brasileira de Reprodução Humana
Sisembrio	– Sistema nacional de produção de embriões
SUS	– Sistema único de saúde
TCLE	– Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	– Trofoectoderma
VISA	– Vigilância Sanitária Estadual

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura 1.</u> Concentração de O ² no trato reprodutivo feminino.....	4
<u>Figura 2.</u> Esquema do protótipo inicial.....	8
<u>Figura 3.</u> Partes componentes do dispositivo INVOCeIl™.....	9
<u>Figura 4.</u> Câmara do dispositivo INVOCeIl™.....	10
<u>Figura 5.</u> Dispositivo INVOCeIl™.....	10
<u>Figura 6.</u> Cápsula externa rígida.....	11
<u>Figura 7.</u> Diafragma.....	12
<u>Figura 8.</u> Ciclo Ovariano	14
<u>Figura 9.</u> Blastocistos produzidos pela técnica INVO.....	31
<u>Figura 10.</u> Blastocistos produzidos pela técnica FIV Convencional.....	32
<u>Figura 11.</u> Amostra dos pré-embriões produzidos pela técnica FIV Convencional por 3 dias(68±1 horas após fertilização).....	34
<u>Figura 12.</u> Amostras dos pré-embriões produzidos pela técnica INVOCeIl por 3 dias (68±1 horas após fertilização)	35

LISTA DE QUADROS

<u>Quadro 1.</u> Desenvolvimento esperado conforme horas após a fertilização.....	21
<u>Quadro 2.</u> Critérios de avaliação morfológica de pré-embriões em estágio de clivagem.....	21
<u>Quadro 3.</u> Critérios de avaliação do desenvolvimento de pré-embriões em estágio de blastocisto.....	22
<u>Quadro 4.</u> Critérios de avaliação do desenvolvimento da massa celular interna do blastocisto.....	23
<u>Quadro 5.</u> Critérios de avaliação do desenvolvimento do trofoectoderma do blastocisto.....	24

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela 1.</u> Dados clínicos dos casais participantes selecionados.....	27
<u>Tabela 2.</u> Classificação qualitativa, quantitativa e taxa de fertilização dos oócitos recuperados do G2.....	27
<u>Tabela 3.</u> Classificação qualitativa, quantitativa e taxa de fertilização dos oócitos recuperados do G1.....	28
<u>Tabela 4.</u> Número de blastocistos formados após cultivo prolongado por 5 dias utilizando as técnicas INVO e FIV Convencional.....	29
<u>Tabela 5.</u> Desenvolvimento dos blastocistos recuperados no Dia+5 com as técnicas INVO e FIV convencional.....	30
<u>Tabela 6.</u> Pré-embriões recuperados após cultivo por 3 dias com as técnicas de INVO e FIV convencional.....	33
<u>Tabela 7.</u> Classificação geral dos pré-embriões recuperados no Dia+3 nas técnicas de INVO e FIV convencional.....	36
<u>Tabela 8.</u> Valor médio do pH no cultivo utilizando o dispositivo INVOCe TM com cultura de 5 e 3 dias.....	37
<u>Tabela 9.</u> Custo operacional mensal para um laboratório de acordo com as exigências da Vigilância Sanitária (VISA).....	39
<u>Tabela 10.</u> Custo operacional da técnica FIV Convencional (5 dias).....	41
<u>Tabela 11.</u> Custo operacional da técnica INVOCe TM (5 dias).....	42

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Meios de Cultura	3
1.2 Concentração de Oxigênio	3
1.3 Temperatura de Incubadora	5
1.4 Controle de pH	5
1.5 Impacto do Ambiente de Cultura Sobre o Desenvolvimento Embrionário	6
1.6 Clínicas de Reprodução Assistida	6
1.7 Cultura Intravaginal	7
1.7.1 História	7
1.7.2 Protótipo	8
1.7.3 O dispositivo INVOCeII™	8
1.8 Ciclo Ovariano e Estimulação Ovariana	13
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	16
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
5. MATERIAIS E MÉTODOS	17
5.1 Desenho de Estudo	17
5.2 Protocolo de Estímulo/Captação de Óocitos	18

5.3 Técnicas de Cultivo	19
5.3.1 Coleta, Análise e Processamento Seminal	19
5.3.2 Cultura Intravaginal (dispositivo INVOCe TM)	19
5.3.3 FIV Convencional em Poço Único	20
5.3.4 Classificação Embrionária	21
5.4 Transferências dos Pré-Embriões	24
5.5 Técnicas Empregadas para Análise do Meio de Cultura	25
5.5.1 Análise Microbiológica	25
5.5.2 Aferição de pH	25
5.5.3 Comparação do Custo Operacional das Técnicas INVO e FIV	25
5.6 Estatística	26
6. RESULTADOS	26
6.1 Comparação entre as Técnicas INVO e FIV Convencional com Cultivo Prolongado (5 dias)	28
6.1.1 Classificação dos Pré-embriões Obtidos com Cultivo por 5 dias.....	29
6.2 Avaliação das Técnicas INVO e FIV Convencional com Cultivo de 3 dias	32
6.2.1 Classificação dos Pré-embriões Obtidos com Cultivo por 3 dias	34
6.3 Aferição de pH	36
6.4 Análise Microbiológica	37
6.5 Levantamento de Custo Operacional Associado as Técnicas de INVO e FIV convencional	38
7. DISCUSSÃO	40
7.1 Sistema de Cultivo com o Dispositivo INVOCe TM x FIV Convencional (5 Dias)..	43
7.2 Sistema de Cultivo com o Dispositivo INVOCe TM x FIV Convencional (3 Dias)..	45

7.3 Custo Operacional Associado às Técnicas INVOCell™ e FIV Convencional	45
8. CONCLUSÃO	47
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	47
10.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS.....	55

1. INTRODUÇÃO

A incapacidade de conceber após pelo menos um ano de coito desprotegido, é a definição atribuída a infertilidade conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS). Atualmente, a infertilidade representa fenômeno mundial que afeta entre 50 e 80 milhões de pessoas em idade reprodutiva com incidência crescente (World Health Organization, 2002). No Brasil, esse número chega a cerca de oito milhões (SBRA, 2017). Alguns fatores são apontados como responsáveis por esses valores como a idade do casal, em especial da mulher, que adia a maternidade motivada por convicções pessoais e profissionais. Esses fatores aumentam o risco de surgimento de ginecopatias além da diminuição da reserva ovariana. Nos homens, a piora da qualidade seminal pode estar associada ao consumo de álcool, tabagismo, exposição a fatores ambientais, sedentarismo e obesidade (TSO e FILHO, 2011).

Os fatores causais da infertilidade podem ser divididos em fator masculino (35%), tuboperitoneal/endometriose (35%), ovariano (15%), infertilidade sem causa aparente – ISCA (10%) e outras (5%). Em muitos dos casos ocorre associação de vários fatores que irá refletir diretamente nos resultados (TSO e FILHO, 2011).

A infertilidade é uma doença complexa com importantes implicações médicas, psicossociais, demográficas e econômicas. Ela reduz a qualidade de vida, especialmente através de consequências psicossociais negativas. As alterações psicossociais variam de medo e depressão até a estigmatização e a sensação da perda de dignidade. As consequências negativas da falta de filhos são mais frequentes e mais severas nos países em desenvolvimento. Ausência de tratamento de infertilidade é uma barreira relevante para o acesso universal à saúde reprodutiva. A OMS considera a infertilidade como um problema de saúde pública, e em 2000 declarou que é imperativo garantir a todos os indivíduos acesso a serviços de saúde reprodutiva de qualidade (ALLAHBADIA, 2013).

No Brasil, a taxa de fecundidade apresenta queda progressiva nos últimos 15 anos (IBGE, 2013). Em 2018 a fecundidade total é de 1,77 filhos por mulher. A projeção é de que em 2060, o número médio de filhos por mulher seja 1,66 (IBGE 2018). Paralelamente, o número de ciclos de fertilização *in vitro* teve um aumento considerável nos últimos anos segundo levantamento dos relatórios publicados pelo Sisembrio (ANVISA, 2015). De acordo com o 11º Relatório do Sistema Nacional de

Produção de Embriões (SisEmbrio) 2018, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA,2018), somente em 2017, 36.307 mil ciclos de fertilização *in vitro* foram realizados no Brasil. Nos relatórios de 2014 e 2012 os número de ciclos foram 27.871mil e 21.074 mil, respectivamente (ANVISA, 2015 e 2013).

Apesar das técnicas de reprodução assistida estarem disponíveis por mais de quatro décadas, seu alto custo as torna indisponível ou inacessível para a maioria dos moradores de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (ALLAHBADIA, 2013). O investimento financeiro com os custos do tratamento de reprodução assistida (RA) são um dos limitadores para a realização por muitos casais. O custo elevado deve-se não só ao valor das medicações necessárias para o estímulo ovariano mas também ao custo para se manter um laboratório. No Brasil, para o funcionamento de um laboratório de RA é necessário a licença por parte dos órgãos fiscalizadores (VISA). A atual resolução em vigor é a RDC n° 23/2011 que dita toda a regulamentação para a manutenção dos laboratórios de reprodução assistida.

As técnicas já consagradas de fertilização *in vitro* convencional (FIV) e microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) consistem na união dos gametas masculino e feminino. O cultivo é realizado em ambiente laboratorial, de forma próxima do evento da fertilização *in vivo*, objetivando alcançar pré-embriões de boa qualidade que serão transferidos, para a cavidade uterina. Para que a fertilização aconteça é necessário um sistema de cultivo extremamente controlado e profissionais capacitados (MORENO, 2005).

Ao longo dos anos, melhorias tem sido obtidas para aperfeiçoar o sistema de cultivo utilizado nas técnicas de fertilização *in vitro*. Não só a qualidade dos gametas impacta o desenvolvimento embrionário, como também as condições de cultivo. Variáveis no sistema de cultivo são monitoradas e melhoradas a cada dia (SWAIN *et al*, 2016).

Apesar das técnicas de FIV serem usadas com sucesso em todo mundo, é importante ressaltar que os protocolos de cultura *in vitro* requerem manipulação intensa tanto dos gametas como dos pré-embriões. Essa manipulação intensa é feita para as avaliações diárias e trocas de meio de cultura o que causam o aumento a exposição a luz, variações de temperatura, pH e tensões de O². Todos esses

fatores podem ser considerados estressantes podendo diminuir a viabilidade do pré-embrião e conseqüentemente as chances de gestação (BLOISE *et al.*, 2014).

1.1 Meios de cultura

O meio de cultura é uma das variáveis do sistema passível de melhorias devido sua influencia nas vias metabólicas e bioquímicas do pré-embrião (SWAIN *et al.*, 2016). As trompas de falópio é o ambiente natural para a fertilização oocitária e para os primeiros desenvolvimentos embrionários. O meio de cultura deve reproduzir esse ambiente (DIEAMANT, 2017). Os meios de cultura de pré-embriões para fertilização *in vitro* podem ser meios únicos ou sequenciais. O meio sequencial foi projetado para imitar as condições *in vivo* (DIEAMANT, 2017) dessa forma a cada fase há uma necessidade e assim um meio de cultura que ofereça ao pré-embrião o que é necessário naquele momento. De forma geral é apresentado em três meios de cultura: um meio para a fase de fertilização, um meio para a fase de clivagem e um para a fase de blastocisto. Enquanto que o meio único contem todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento da fertilização ao estágio de blastocisto.

Atualmente, na maioria dos laboratórios de RA, os meios de cultura utilizados possibilitam o cultivo prolongado de pré-embriões até o 5º dia de desenvolvimento, período em que pré-embriões competentes atingem o estágio de blastocisto. Esse estágio está associado a melhores taxas de sucesso, por ser considerado um tempo mais fisiologicamente adequado, uma vez que está mais próximo do tempo de implantação natural e pode melhorar a sincronia entre endométrio e o estagio embrionário (GLUJOVSKY, 2016).

1.2 Concentração de Oxigênio

A figura 1 mostra a concentração de oxigênio no trato reprodutor feminino varia entre 2 a 8%.

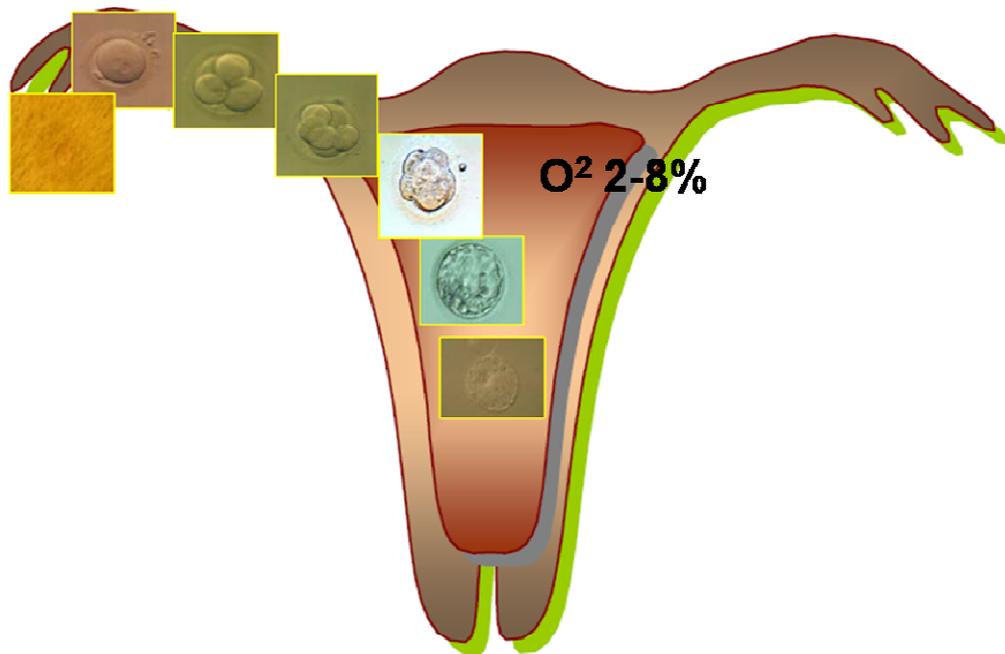


Figura 1: Concentração de O² no trato reprodutivo feminino (Moreno, 2005)

Em 2015, Wale e Gardner, em uma revisão, relataram que em 1970, Edwards e colaboradores, comprovaram os efeitos da concentração de oxigênio na taxa de clivagem, que se mostrava melhor quando os pré-embriões eram expostos a concentrações de 5% de oxigênio em comparação com exposição a 20% (WALE e GARDNER, 2015). Esses dados foram confirmados posteriormente por Steptoe e colaboradores em 1971. Após esses estudos, um ambiente padrão foi introduzido com cultura em 5% de O₂ (STEPTOE e EDWARDS, 1978). Por três décadas as técnicas foram realizadas com oxigênio nas concentrações de 5% a 7% (THOMPSON *et al*, 1990). Entretanto, a manutenção do ambiente a 5% de oxigênio era dispendiosa e trabalhosa para as clínicas. Para se obter um ambiente de 5% de oxigênio, cilindros de dissecadores eram utilizados. Esses materiais ocupavam um espaço grande nas incubadoras e nos laboratórios dificultando a ampliação do atendimento. Com o crescimento da reprodução humana, uma mudança foi adotada ignorando-se os achados de Edwards e Steptoe e os laboratórios em todo mundo adotaram o uso de oxigênio atmosférico, 20% (WALE e GARDNER, 2015).

Embora pré-embriões sejam capazes de alcançar a fase de blastocisto

quando cultivados a 20% de oxigênio, os seus padrões de expressões gênicas se mantêm mais próximo do padrão quando cultivados em tensão baixa de oxigênio. Acredita-se que, usando oxigênio a 5% haja menor formação de espécimes reativas de oxigênio, um dos principais indutores de mudança epigenética (WALE e GARDNER, 2015).

Nos últimos anos novos modelos de incubadoras foram desenvolvidas com capacidade de manter a concentração mais baixa de oxigênio sem interferir no espaço físico, auxiliando para um sistema de cultivo eficiente e capaz de até mesmo realizar microscopia em time lapse (WALE e GARDNER, 2015). Vale ressaltar que este equipamento é extremamente oneroso para as clínicas.

1.3 Temperatura da incubadora

A temperatura nas incubadoras segue o que é feito e relatado na literatura desde o início das pesquisas com FIV clínica (HONG, 2014). Na qual descrevia que o ideal para se cultivar células humanas era em temperatura de 37 °C, baseado na temperatura corpórea. Em muitas espécies de mamíferos a temperatura na trompa de Falópio é mais baixa que no restante do corpo, porém não está claro se ocorre nos seres humanos (SIMOPOULOU, 2018). A estabilidade do fuso meiótico sofre influência direta da temperatura, e a manipulação usual nos laboratórios dos gametas e pré-embriões, interferem na estabilidade, pois para as avaliações é necessário a retirada dos pré-embriões das incubadoras, expondo-os a ambiente com uma menor temperatura. A melhor prática em um sistema de cultivo é evitar aberturas repetidas da incubadora, assim como ter um número suficiente em relação ao volume de trabalho.

1.4 Controle de pH

A variável pH do meio de cultura é determinado pela concentração de bicarbonato no meio utilizado e pela concentração de gás carbônico na incubadora. Os meios de cultura oferecem informações pelos fabricantes, como o valor ideal de pH para o cultivo, e estão preparados para apresentar mudança de coloração em

caso de alterações de pH. As mudanças de pH podem ter um efeito prejudicial na fisiologia e desenvolvimento de oócitos e pré-embriões, mesmo que por exposição transitória como nos momentos de avaliações diárias, podem trazer um desequilíbrio no meio e tornar-lo acidificado. Embora os pré-embriões possuam mecanismos intracelulares para regular o pH interno, deve-se cuidar para minimizar as flutuações de pH (WALE e GARDNER, 2015). Mesmo sendo difícil sua análise de forma isolada, não se deve o excluir de um controle rígido, pois suas alterações afetam o metabolismo do pré-embrião.

1.5 Impacto do ambiente de cultura sobre o desenvolvimento embrionário

Um ambiente de cultura estável é vantajoso, porque se minimiza as perturbações ambientais que podem alterar diretamente o desenvolvimento embrionário (SWAIN *et al*, 2016). O sistema de cultura deve oferecer a cada pré-embrião a maior oportunidade de alcançar seu próprio potencial apesar das limitações impostas pela qualidade dos gametas (HONG *et al*, 2014) .

Para um bom sistema de cultivo também é necessário a capacitação de embriologistas, acompanhando toda a modernização que a cada dia surge nos laboratórios de RA. Tornando as técnicas de fertilização *in vitro* ainda mais dispendiosas, constituindo uma grande barreira para casais que estão tentando engravidar (COLLINS, 2001).

1.6 Clínicas de Reprodução Assistida

No Brasil, existem cerca de 110 clínicas de tratamento de fertilidade cadastradas no Sisembrio/Anvisa, das quais apenas 8 são habilitadas a realizar procedimentos de reprodução humana assistida pelo Sistema Único de Saúde-SUS (ANVISA, 2015). Esse número demonstra que o acesso ao tratamento, é influenciado pelo alto custo que é incomparável com as possibilidades financeiras da maioria da população. Além disso os programas de assistência pública nem sempre cobrem todos os custos dos cuidados da reprodução assistida (TAVARES, 2016)

Em 2015 um tratamento de reprodução assistida (FIV/ICSI), sem a inclusão

de análise genética, teve um custo médio de 15-20 salários mínimos. Estes valores altos. Contribuem para que o tratamento de reprodução assistida seja considerado elitizado, indo contra ao que foi declarado pela ONU. Segundo a ONU deve ser garantido, a todos os indivíduos, acesso a serviços de saúde reprodutiva de qualidade. É válido ressaltar que isso não é um problema exclusivo do Brasil (ALLAHBADIA, 2013).

1.7 Cultura Intravaginal (INVO)

O sistema de cultura intravaginal (INVO) é um dispositivo prescrito com a intenção de proporcionar aos gametas feminino e masculino um ambiente equilibrado durante o processo de fertilização *in vitro*. E manter os pré-embriões no período de seu desenvolvimento inicial, utilizando as condições do ambiente do próprio corpo da mulher.

1.7.1 História

O procedimento INVO foi criado pensando na simplificação dos processos de fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (RANOUX, 2012).

Idealizado por volta de 1985, a princípio para manter o equilíbrio da temperatura e pH do meio, uma vez que as incubadoras apresentavam oscilações. Gametas de camundongos foram colocados em incubadoras dentro de tubos com meio de cultura e fechados de forma hermeticamente. Foi observado que houve a passagem do gás carbônico através do tubo diminuindo os picos do mesmo gás e reduzindo a variação de pH. A cavidade vaginal foi então utilizada para fornecer CO₂ e O₂, e assim permanecia por um período de três dias na cavidade vaginal da mulher.

No princípio havia uma preocupação de possíveis lesões no colo uterino, sendo descartado por testes que demonstraram ausência de lesões (RANOUX, 2012).

1.7.2 O protótipo

Inicialmente um tubo de ensaio simples foi utilizado como protótipo. O tubo era preenchido com meio de cultura e em seguida colocado os gametas femininos e masculinos (Figura 2). Devia ser evitada a presença de bolhas, pois as mesmas poderiam interferir no pH do meio de cultura.

A primeira dificuldade na utilização do tubo foi que ele só poderia ser aberto e fechado uma única vez, pois possuía uma abertura muito grande e necessitava de um volume de 3 mL de meio de cultura, o que dificultava na busca aos pré-embriões formados. Também foram relatados incidentes com o uso do protótipo, como a abertura acidental na cavidade vaginal, perda de pré-embriões e aumento no risco de infecções vaginais (FRIDMAN E RANOUX, 2008)

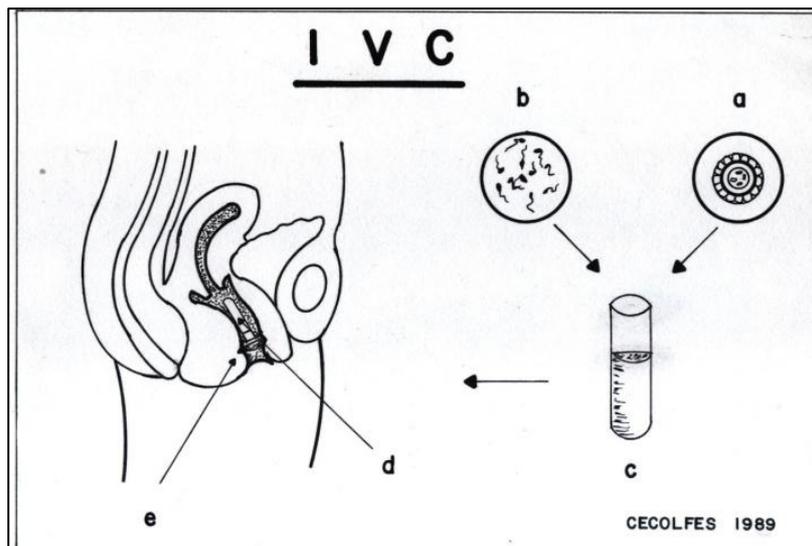


Figura 2. Esquema do protótipo inicial (Centro Colombiano de Fertilidade, 1989)

1.7.3 O dispositivo INVOCell™

Após o aperfeiçoamento tecnológico e a evolução dos materiais básicos para o desenvolvimento do dispositivo, chegaram ao INVOCell™, que foi projetado pensando em superar as desvantagens apresentadas pelo protótipo inicial (FRIDMAN E RANOUX, 2008). Ele é composto por duas partes uma câmara interna e uma cápsula externa rígida, junto ao dispositivo é utilizado um diafragma para

melhor retenção (Figura 3).

O dispositivo INVOCell™ tem sido apresentado como uma técnica alternativa aparentemente menos custosa nos países testados. Este dispositivo se opõe as técnicas convencionais uma vez que usa o próprio corpo da paciente como incubadora. Além disso, a forma de fertilização é semelhante no da FIV convencional, diferenciando apenas nos restos celulares que ficarão em contato com os pré-embriões formados no dispositivo, durante o seu desenvolvimento inicial. Desta forma, é formado um microambiente diferenciado daquele das placas de cultivo dentro dos laboratórios (MITRI *et al*, 2015).



Figura 3. Partes componentes do dispositivo INVOCell™. (A) Câmara interna e externa; (B) dispositivo INVOCell™ e diafragma (Adaptado de Ranoux, 2012)

a) Câmara interna

Local onde abriga os gametas e o meio de cultura (Figura 4). Possui uma válvula rotativa que permite várias aberturas e fechamentos. Ela possui um pequeno orifício de tamanho suficiente para a passagem de uma pipeta de Pasteur ou uma ponteira de stripper. Evitando assim o extravaso de meio de cultura, variação de temperatura e pH.

O volume do meio de cultura foi reduzido de 3 mL para 1,08 mL. Na parte inferior da câmara interna, foi desenvolvida uma microcâmara para o alojamento dos

pré-embriões após a incubação, o que facilita a localização dos pré-embriões formados pelo embriologista (Figura 5). O carregamento do catéter de transferência com os pré-embriões pode ser feito diretamente da microcâmara (RANOUX, 2012).

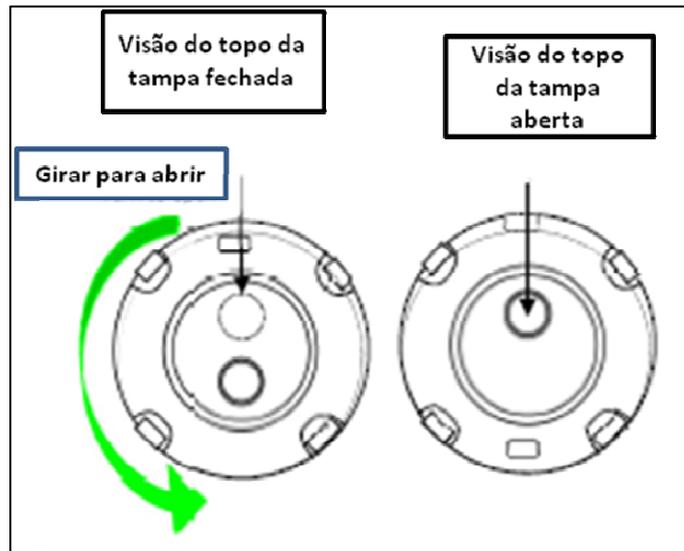


Figura 4. Câmara do dispositivo INVOCell™. Visão do topo da tampa com o orifício fechado e aberto (Adaptado The INVOcell™ Intravaginal Culture System. USA. INVO Bioscience. Rev 14. Bula do dispositivo INVOCell™)

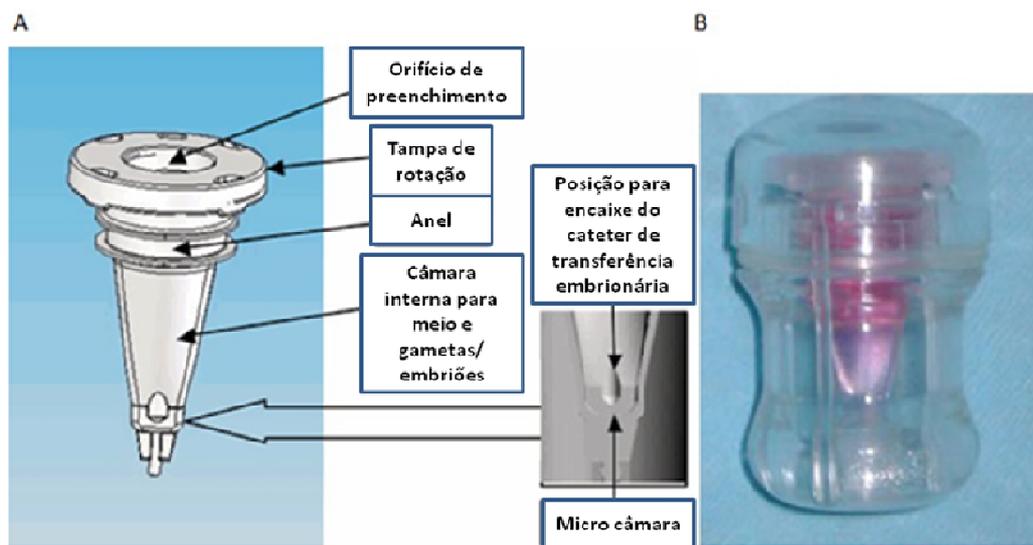


Figura 5. Dispositivo INVOCell™: (A) Partes interna do dispositivo; (B) Cápsula rígida externa (Adaptado Mitri *et al.* 2015)

b) Cápsula externa rígida

Desenvolvida com objetivo de proteger a câmara interna e manter a esterilidade da mesma. Possui uma superfície lisa que evita lesões no colo uterino e um grande anel de vedação de silicone, a sua parede é permeável ao CO_2 e O_2 (Figura 6). A estrutura permite que se utilize uma pinça para remoção da vagina, se necessário. Seu fechamento hermético permite um travamento da cápsula impedindo aberturas acidentais durante a incubação.

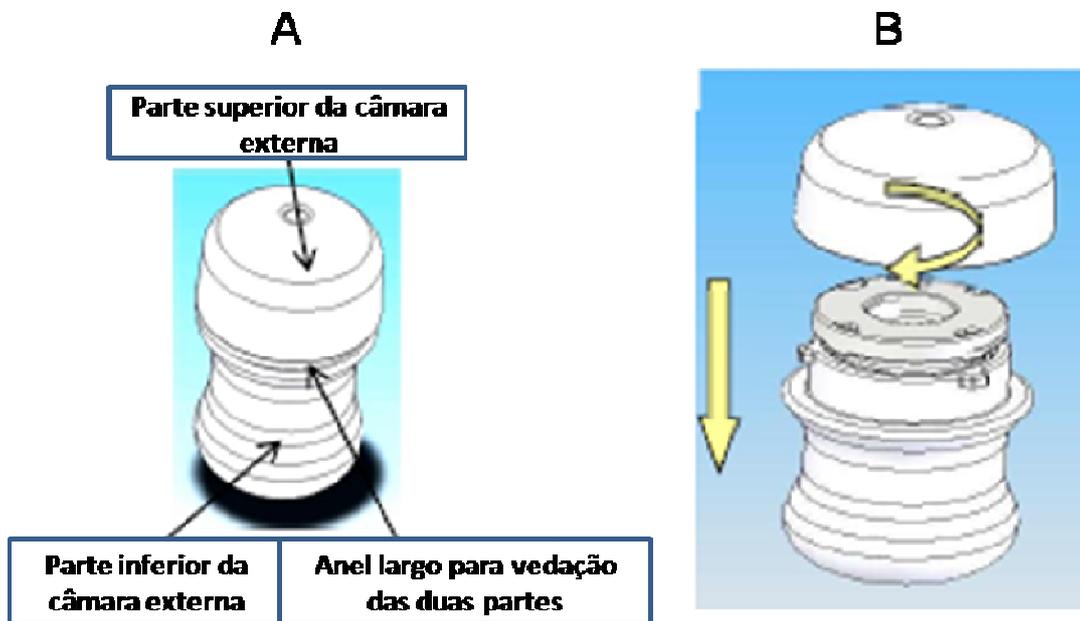


Figura 6. Cápsula externa rígida. (A) Anel de vedação; (B) Fechamento hermético (Adaptado The INVOCeII™ Intravaginal Culture System. USA. INVO Bioscience. Rev 14. Bula do dispositivo INVOCeII™)

Um diafragma passou a ser utilizado para reter o dispositivo INVOCeII™ na cavidade vaginal (Figura 7). Pequenos orifícios foram feitos na membrana do diafragma para a eliminação de secreções vaginais durante a incubação.

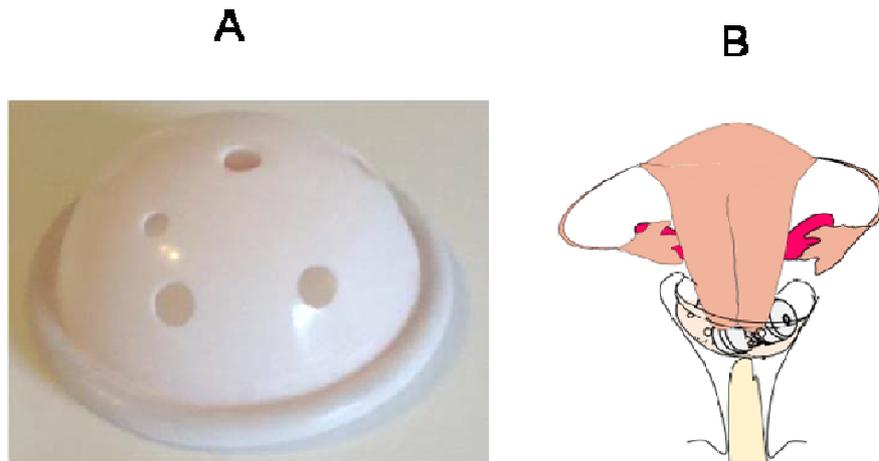


Figura 7. Diafragma. (A) diafragma perfurado para retenção do dispositivo na cavidade vaginal; (B) Ilustração do dispositivo com o diafragma na cavidade vaginal (Adaptado The INVOCeCell™ Intravaginal Culture System. USA. INVO Bioscience. Rev 14. Bula do dispositivo INVOCeCell™)

Testes clínicos também foram realizados quanto ao desconforto do dispositivo na cavidade vaginal (FRIDMAN E RANOUX, 2008). O dispositivo INVOCeCell™ também foi testado pela ISO 10993, para avaliar a toxicidade e biocompatibilidade, recebendo declaração de conformidade pela CE da União Européia em 2012. A aprovação pela FDA com número de regulação 21CFR 884.61652015 veio em 2015 após um conjunto de testes. No Brasil, seu registro para comercialização foi divulgado no Diário Oficial de 26 de dezembro de 2016 (ANEXO 1)

A aceitabilidade e experiência geral com o uso do dispositivo INVOCeCell foi um dos estudos realizado com um grupo de pacientes no Canadá (MITRI *et al*, 2015). Foi apresentado um questionário e a maioria das participantes demonstraram satisfação com o uso do dispositivo (MITRI *et al*, 2015).

Em 2008, Fridman e Ranoux publicaram os resultados dos ensaios clínicos de mais de 800 casos, que foram realizados por grupos de infertilidade em países como França, Holanda, Inglaterra, Estados Unidos e Japão. A taxa de sucesso de gravidez por ciclo foi de 19,6%, demonstrando que o uso do dispositivo pode ser uma alternativa no tratamento de fertilização *in vitro*.

Em um estudo realizado na Colômbia por Lucena e Colaboradores, entre 2009 e 2011, utilizando o dispositivo em grupos de pacientes com diferentes faixa etárias. Houve a seleção de 125 ciclos, com análise da taxa gravidez, nascidos vivos

e taxas de nascidos vivos únicos. Um resultado satisfatório foi apresentado, 40% de taxa de gravidez, usando o dispositivo INVOCeCell™. Resultado comparável a FIV convencional, que gira em torno de 41,6%. Relatando o uso do dispositivo como uma alternativa segura de tratamento na reprodução assistida (LUCENA, 2012).

No Brasil, um artigo propondo a introdução do uso do dispositivo INVOCeCell™ como técnica alternativa a FIV convencional foi publicado em 2013 (COELHO, 2013). Neste trabalho, foram testados um total de 40 ciclos com pacientes apresentando 34,5 anos de média de idade, onde 20 ciclos utilizaram a fertilização com o uso do dispositivo e os outros 20 ciclos utilizaram a técnica ICSI. O estudo foi realizado entre dezembro de 2010 a maio de 2011. O resultado apresentado mostrou uma taxa de gravidez por ciclo de 30% com o uso do dispositivo e de 25% com o uso da técnica ICSI (COELHO, 2013).

O estresse presente nos casais que passam pelo tratamento de fertilização *in vitro*, é um relato constante. Vieira, realizou um estudo preliminar com 40 mulheres que vivenciaram tratamento de reprodução assistida utilizando as técnicas INVO e as técnicas convencionais de fertilização *in vitro*. No total, 60% das mulheres que utilizaram o dispositivo INVOCeCell™ não apresentaram estresse. Por outro lado, entre as pacientes que utilizaram as técnicas convencionais o resultado foi menor e 45% não apresentaram estresse. O resultado sugere que o uso do dispositivo proporcione maior participação da mulher no tratamento, diminuindo da ansiedade e estresse (2013).

1.8 Ciclo Ovariano e Ciclo de estimulação ovariana

Para se compreender os protocolos de estímulo ovariano é necessário o conhecimento prévio do ciclo ovariano. O ciclo ovariano é formado por três fases, folicular, ovulatória e lútea (Figura 8).

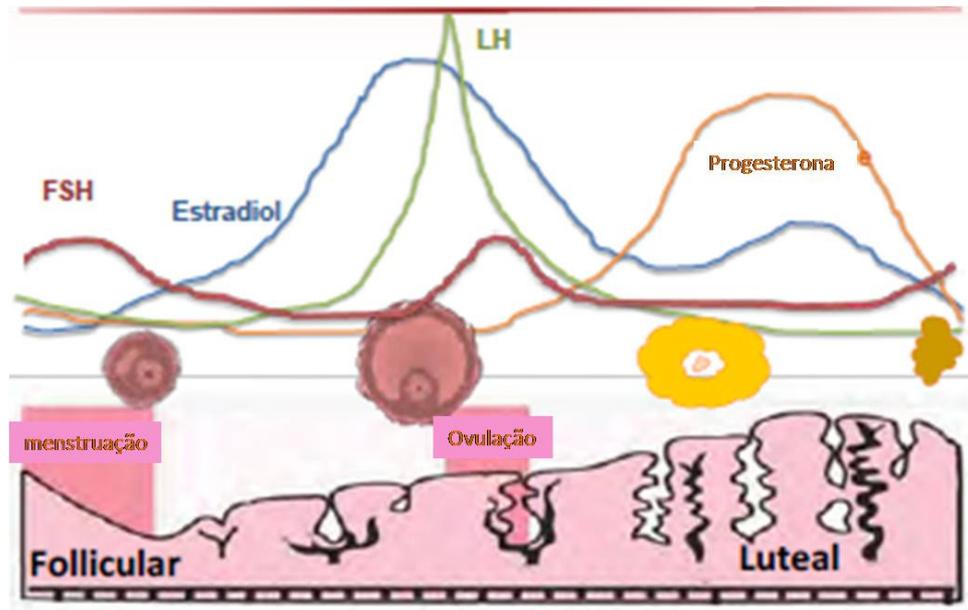


Figura 8. Ciclo Ovariano (Adaptado ASRM,2015)

A fase folicular tem duração de 10 a 14 dias e se inicia no primeiro dia do ciclo menstrual. O Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) liberado pelo hipotálamo estimula a hipófise a liberar o FSH (hormônio folículo-estimulante). O FSH vai estimular o desenvolvimento dos folículos nos quais estão alojados os oócitos. As células foliculares irão secretar estrogênio, que induz a proliferação do endométrio, tornando o revestimento uterino mais espesso e apropriado para a implantação do óvulo fertilizado caso ocorra à fertilização (SANTOS e RAMOS, 2010).

A fase de ovulação acontece em média no décimo quarto dia de um ciclo de 28 dias. Ela se dá em resposta da elevação do LH (hormônio luteinizante). Um oócito maduro, ou seja, pronto para ser fertilizado por um espermatozoide, é liberado pelo folículo. Após ovulação, ocorre a diminuição dos níveis de estrogênio e a suave movimentação das fímbrias das tubas uterinas auxiliam no transporte do óvulo para o útero (SANTOS e RAMOS, 2010).

A fase lútea tem início na ovulação se estendendo até a fase menstrual do próximo ciclo. Após a liberação do oócito, o folículo sofre degeneração e forma o corpo lúteo. O corpo lúteo secreta progesterona em quantidades crescentes (SANTOS e RAMOS, 2010).

O estímulo ovariano controlado é um dos procedimentos associados ao tratamento de fertilização *in vitro*. Visando maximizar o número de oócitos recuperados para aumentar as chances de se obter mais pré-embriões, tentando aumentar as chances de sucesso da FIV. Objetiva-se a escolha do pré-embrião de melhor qualidade para transferência, e a geração de pré-embriões excedentes para criopreservação e uso em ciclos posteriores não estimulados (FAUSER *et al*, 2010).

O uso de gonadotrofina para a estimulação ovariana desempenha um papel central no tratamento de infertilidade. Atualmente as gonadotrofinas mais utilizadas em protocolos de estimulação ovariana controlada para FIV são FSH recombinante e FSH urinário purificado de mulheres menopausadas (ASRM, 2008).

Protocolos convencionais de estimulação ovariana controlada estão associados a bons resultados clínicos e a um grande número de óocitos recuperados, podendo alcançar um número mínimo de 8 a 15 oócitos por ciclo. Junto a isso há o aumento do desconforto da paciente, risco de complicações como a síndrome de hiperestímulo ovariano (OHSS), torção ovariana e aumento do sangramento após excessivas aspirações foliculares para a recuperação do grande número de oócitos. Os custos com medicamentos são mais elevados, muitas vezes superando o custo do procedimento de FIV, acarretando em um maior número de abandono do tratamento (FAUSER *et al*, 2010).

A administração de baixas doses de gonadotrofina exógena em ciclos tratados com antagonistas de GnRH, tem sido uma opção mais leve de estimulação ovariana. Este tipo de estimulação leve requer menos dias de tratamento, reduzindo a necessidade de visitas às clínicas para o monitoramento, diminuindo as chances de complicações como a síndrome de hiperestímulo ovariano, assim também como o abandono do tratamento (FAUSER *et al*, 2010).

Os custos de medicação com ciclos utilizando a estimulação leve foram relatados como significativamente mais econômico (Fauser *et al*, 2010) e tem sido associado ao tratamento de fertilização *in vitro* com uso do dispositivo INVOCell™ (MITRI, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Com objetivo de estender o cultivo dos pré-embriões dentro do dispositivo INVOCell™, que tem como uso até o momento o cultivo de três dias. Foi avaliado nesse estudo a formação dos blastocistos que são pré-embriões de 5º dia, quanto ao número de formados e qualidade dos mesmos. A comparação foi feita com os resultados obtidos através da técnica, já rotineiramente utilizada em clínicas de RA que é a FIV convencional.

O estudo abrange a análise do custo operacional entre as técnicas avaliadas, variável que tem como influenciar nas decisões dos casais a realizarem os procedimentos de fertilização *in vitro*. Assim como o de aumentar o alcance aos tratamentos por casais de países em desenvolvimento, uma vez que a técnica de cultura intravaginal apresenta uma diminuição considerável nos custos.

Na presente dissertação, com a utilização dos conhecimentos básicos adquiridos por intermédio do Mestrado Profissional de Formação para a Pesquisa Biomédica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), estão descritos os resultados obtidos para a implantação da técnica de cultura intravaginal, com o uso do dispositivo INVOCell™ por um período prolongado de cultivo embrionário, 120 horas.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Comparar as técnicas de fertilização *in vitro* usando o dispositivo INVOCell™ e a técnica de FIV convencional quanto ao número de blastocistos obtidos e a sua qualidade morfológica.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar a taxa de pré-embriões formados nos cultivo de 3 e 5 dias nas técnicas de INVO e FIV Convencional;

Avaliar a segurança microbiológica do meio de cultura no dispositivo INVOCell™ com cultura de 5 dias;

Avaliar o pH do meio de cultura dentro do dispositivo INVOCeTM com cultura de 5 dias;

Comparar o custo benefício das técnicas de INVO e FIV Convencional com cultivo de três e cinco dias para o serviço de RA.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

Participaram deste estudo pacientes do Serviço de Medicina Reprodutiva do Hospital Escola Álvaro Alvin/Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense, no período de março de 2017 a julho de 2018. A aprovação pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa, ocorreu o dia 21 de fevereiro de 2017. As pacientes que buscaram pelo tratamento foram avaliadas por uma equipe multidisciplinar incluindo médico, psicólogo, assistente social e embriologista. Nessa etapa o estudo foi explicado e proposto a participação para o casal.

Os critérios de inclusão foram: idade da mulher inferior a 35 anos, índice de massa corporal (IMC) entre 18,5 e 24,9, aceitar assinar o termo de consentimento livre esclarecido (TCLE), ter como causa de infertilidade fator tubário, fatores ovulatórios e ISCA. Foram excluídas do estudo as que não cumpriram os critérios de inclusão, as discordantes com o termo de consentimento livre e esclarecido, as portadoras de endocrinopatias, casais cuja causa seja o fator masculino e/ou endometriose e as pacientes que não obtiverem o número mínimo de seis oócitos.

Durante o período de desenvolvimento do estudo, o serviço atendeu 160 casais, desses somente 22 atenderam os critérios de inclusão. Dos selecionados seis não obtiveram um número mínimo de seis oócitos, e foram excluídos do estudo.

5.2. Protocolo de estímulo/captação de oócitos

Todas as pacientes foram submetidas à estimulação ovariana controlada leve. O início do estímulo foi no segundo dia do ciclo, após ultrassonografia basal (aparelho GE® modelo Voluson-730 pro) para contagem de folículos antrais. Foi administrado 150 UI de gonadotrofina urinária (Fostimon®-CHE) até o 10º dia do ciclo ou até que se alcançasse dois folículos de 16 mm quando foi iniciado o uso por via oral da indometacina 50 mg (Indocid®-ZAF), três vezes ao dia, para bloqueio da ovulação. Para a luteinização foi utilizado o agonista do GnRH 0.2 mL de acetato de leuprolida (Lupron 5 mg/ml®-JPN) administrado quando dois folículos alcançaram 18 mm de diâmetro. No período da estimulação ovariana foram realizados a cada três dias, exames de ultrassonografia (aparelho GE® modelo Voluson-730 pro) para o acompanhamento do crescimento folicular.

A punção aspirativa ovariana ocorreu 36 horas após a administração do acetato de leuprolida, empregando agulha de 17G COOK® sob pressão de aspiração de 120 mm Hg, guiada por sonda ecográfica transvaginal de 7,5 MHz (ALOKA® 500 - JAPAN), sob sedação com Propofol 1% 10 mg/mL (Fresofol®).

Na aspiração folicular, o líquido folicular contendo os oócitos foi recolhido em tubos estéreis. No laboratório, os oócitos foram recuperados e lavados em human tubal fluid (HTF) modificado com hepes (Irvine Scientific®) e suplementado com 10% de Soro (Ingamed®) (soro suplementar substituto). Em seguida, os oócitos foram classificados subjetivamente de acordo com a expansão das células do complexo cumulus-ovócito (COC) baseado em MANDELBAUM, 2000.

As pacientes foram divididas aleatoriamente em dois grupos sendo, grupo 1 (G1) com cultivo embrionário até o 3º dia e grupo 2 (G2) com cultivo embrionário até 5º dia. Os oócitos de ambos os grupos foram subdivididos em duas técnicas de cultivo. Para a divisão entre as técnicas, os oócitos foram sorteados e distribuídos da seguinte forma: 3 oócitos submetidos à técnica INVO, cultivados no dispositivo INVOCeIl™ e 3 oócitos submetidos a técnica FIV convencional com cultivo contínuo em um único poço da placa de 4 poços (Nunc®).

5.3 Técnicas de cultivo

5.3.1 Coleta, análise e processamento seminal

A coleta do sêmen foi feita concomitantemente a punção aspirativa de oócitos. Os pacientes foram previamente informados da necessidade de abstinência sexual de no mínimo dois e máximo de sete dias. O sêmen foi analisado quanto ao volume, morfologia, motilidade e concentração, seguindo as orientações da Organização Mundial da Saúde, 2010. O processamento seminal foi feito pelo método *swim-up*. Resumidamente, essa técnica consiste na lavagem do sêmen por centrifugação e posterior recuperação dos espermatozóides com alta motilidade 40 minutos após resuspensão do pellet (VOLPES *et al*, 2016).

5.3.2 Cultura Intravaginal (dispositivo INVOcell™)

Os óvulos sorteados e classificados foram colocados para fertilização, sem a retirada das células da granulosa, com sêmen capacitado pela técnica *swim-up*, na concentração de 40.000 espermatozoides em 1 mL de meio de cultura GV Blast (Ingamed®) suplementado com 10% de Soro (Ingamed®), dentro do dispositivo INVOcell™ imediatamente após a capacitação. O valor da diluição foi padronizado pelo serviço em 40.000 espermatozoides conforme indicação do fabricante do dispositivo INVOcell™ (RANOUX, 2012).

Em seguida o dispositivo INVOcell™ foi depositado na cavidade vaginal da paciente juntamente com o diafragma de retenção, para manter a posição do dispositivo. As pacientes foram orientadas quanto a abstinência sexual e a suspensão de uso de ducha de higienização. A retirada do dispositivo ocorreu no 3º ou 5º dia após a colocação. O INVOcell™ foi retirado e lavado com soro fisiológico em temperatura de 37 °C. Em seguida, o conteúdo do INVOcell™ foi avaliado em estereomicroscópio (SMZ645 - Nikon) e feita a classificação dos pré-embriões. Imediatamente após a retirada dos pré-embriões do meio de cultura, foi feita aferição do pH, e retirada uma alíquota 100 µL para análise microbiológica.

5.3.3 FIV convencional em poço único

Na FIV convencional, os oócitos foram colocados para fertilização, sem a retirada das células da granulosa. O sêmen capacitado pela técnica *swim-up*, foi diluído em concentração de 40.000 espermatozóides por mL em meio de cultura GV Blast (Ingamed®) suplementado com 10% de Soro (Ingamed®). O cultivo foi realizado em único poço da placa de 4 poços (NUNC®). O volume de meio de cultura foi de 800µL e recoberto com 200µL de óleo mineral (Irvine Scientific®). Foram cultivados por 3 e 5 dias conforme grupo inserido, sem troca de meio de cultivo e em incubadora a 37 °C e 7% de CO₂. Após o tempo de cultivo, os pré-embriões foram retirados do meio e classificados. Imediatamente após a retirada dos pré-embriões do meio de cultura foi feita a aferição do pH e retirada de alíquota de 100 µL para análise microbiológica.

5.3.4 Classificação embrionária

A morfológica embrionária continua sendo um padrão ouro nos laboratórios de fertilização *in vitro*. A classificação utilizada no presente estudo está de acordo com o sistema de score do consenso de Istambul, 2011 (ALPHA e ESHRE, 2011) Os pré-embriões em 3º dia foram avaliados quanto o número de blastômero, grau de fragmentação, simetria dos blastômeros, grau de compactação dos blastômeros (Quadro 2).

O estágio de clivagem dos pré-embriões é avaliado desde duas células até mórula. O número de blastômeros e a sincronia de sua divisão são utilizados como característica principal. A avaliação do número de células é realizada conforme as horas pós DIA 0 (dia da fertilização) (Quadro 1).

Quadro 1. Desenvolvimento esperado conforme horas após a fertilização (Adaptado ALPHA e ESHRE, 2011)

DIA	HORAS APÓS FERTILIZAÇÃO	DESENVOLVIMENTO ESPERADO
Dia +1	17±1	Visualização dos pró-núcleos
Dia+2	44 ±1	Pré-embrião com 4 células
Dia+3	68 ±1	Pré-embrião com 8 células
Dia+4	92 ± 2	Estágio de mórula

Quadro 2. Critérios de avaliação morfológica de pré-embriões em estágio de clivagem (Adaptado PRADOS, *et al*, 2012, pp. 50–71)

Grau	Fragmentação (%)	
Grau 1	Menos de 10% de fragmentação, células simétricas e sem multinucleação.	
Grau 2	10 a 25% de fragmentação, células assimétricas e sem multinucleação.	
Grau 3	Acima de 25% de fragmentação, células completamente assimétricas e multinucleadas.	

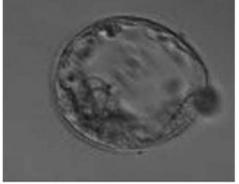
Um blastocisto, corresponde a um pré-embrião que se desenvolveu obtendo dois componentes celulares distintos (massa celular interna = ICM e trofoectoderma = TE) e uma cavidade de fluído, a blastocele. Este estágio é atingido após o 5º dia/Dia+5 de fertilização tanto *in vitro* quanto *in vivo* (GARDNER, 2001). A

classificação do blastocisto é realizada através da combinação do estágio e do score, sendo seguido o sistema de score do consenso de Istanbul, 2011 (Quadros 3, 4 e 5).

Quadro 3. Critérios de avaliação do desenvolvimento de pré-embriões em estágio de blastocisto (Adaptado HARDARSON, *et al*, 2012, pp. 72–91)

Grau	Desenvolvimento	
Grau 1	Blastocisto Inicial	
Grau 2	Blastocisto	
Grau 3	Blastocisto Expandido	
Grau 4	Blastocisto Eclodindo ou Eclodido	

Quadro 4. Critérios de avaliação do desenvolvimento da massa celular interna do blastocisto (Adaptado HARDARSON, *et al*, 2012, pp.72–91)

Grau	Desenvolvimento da ICM
Grau 1	<p>Proeminente, facilmente discernível, com muitas células compactadas e bem aderidas</p> 
Grau 2	<p>Facilmente discernível, com muitas células agrupada de forma solta</p> 
Grau 3	<p>Difícilmente discernível e com poucas células</p> 

Quadro 5. Critérios de avaliação do desenvolvimento do trofoectoderma do blastocisto (Adaptado HARDARSON, *et al*, 2012, pp. 72–91)

Grau	Desenvolvimento do Trofoectoderma (TE)	
Grau 1	Muitas células formando um epitélio coeso	
Grau 2	Poucas células formando um epitélio frouxo	
Grau 3	Poucas células sem formar um epitélio coeso	

5.4 Transferências dos pré-embriões

Os pré-embriões foram transferidos conforme legislação vigente (RESOLUÇÃO CFM nº 2.121/2015), que regulamenta quanto ao número de embriões a serem transferidos, fazendo as seguintes determinações de acordo com a idade:

- a) mulheres até 35 anos: até 2 pré-embriões;
- b) mulheres entre 36 e 39 anos: até 3 pré-embriões;
- c) mulheres com 40 anos ou mais: até 4 pré-embriões.

A escolha dos pré-embriões transferidos ocorreu através da classificação morfológica independente da técnica utilizada para o cultivo. A partir desse momento o tratamento das pacientes seguiu regularmente.

5.5. Técnicas empregadas para análises do meio de cultura

5.5.1 Análise microbiológica

A análise microbiologia foi realizada a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL com um *swab*, a análise foi realizada no Laboratório De Pesquisas Clínicas Plinio Bacelar, localizado a Rua José do Patrocínio, 99 – Centro Campos dos Goytacazes –RJ especializado em análise microbiológica.

5.5.2 Aferição de pH

O pH do meio de cultivo foi aferido pelo pHmetro OHRUS Starter 3100. Com eletrodo previamente calibrado com solução tampão para pH 4,01, pH 7,00 e pH 10,00. Logo após a retirada dos pré-embriões do meio de cultivo tanto do dispositivo INVOCell™ quanto da placa de 4 poços foi feita a aferição do pH. Esse procedimento não se estendeu ao tempo de 2 mim para o meio não sofrer desequilíbrio. O valor ideal de pH indicado pelo fabricante do meio de cultivo está entre 7,26 a 7,33.

5.5.3 Comparação do custo operacional das técnicas de INVO e FIV

Durante a execução de todo o estudo, os insumos utilizados para a realização das técnicas de FIV convencional e INVO, foi documentado e realizado cotação (anexo 2). Com essas informações foi obtido o custo médio operacional por técnica. Concomitante, foram levantados os custos atribuídos ao funcionamento de um laboratório de reprodução humana assistida, que segue as exigências contidas na legislação vigente RDC 23/2011. Que são: locação de cilindro de CO₂, gás CO₂ (33kg), ISO 9001, manutenção de ar condicionado, programa de prontuários e controle eletrônico, manutenção preventiva de equipamentos; manutenção preventiva de incubadoras; certificação do ar e ambiente; kit de descontaminação de incubadora; análise microbiológica de ambiente e incubadoras; sabão descontaminante; telefone; energia; capacitação profissional; profissional responsável (embriologista).

5.6. Estatística

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão ou percentual. Os resultados deste trabalho em relação à taxa de blastocisto e quantificação dos blastocistos obtidos em diferentes níveis de expansão foram gerados através do teste estatístico de Qui-Quadrado, aplicado no programa GraphPad Prism® versão 6.0 (Graphpad Software, Inc., USA). Os valores foram representados com $p \leq 0,05$, apresentando assim, valores estatisticamente significativos.

6. RESULTADOS

Os dados clínicos apresentados pelos casais participantes estão expostos na tabela 1. As causas de infertilidade entre os casais selecionados foram semelhantes. No grupo G2 cinco casais apresentaram como causa o fator tubário, dois casais ISCA e um casal participante apresentou como causa o fator masculino leve. Das oito participantes do grupo G1, seis apresentaram fator tubário e duas sem causa aparente (ISCA). Quanto a idade, não observamos diferenças entre os grupos nem em relação aos homens, nem em relação as mulheres.

Dos oito casais selecionados, foram utilizados 48 oócitos. Os oócitos foram divididos aleatoriamente, por sorteio, entre as duas técnicas de cultivo prolongado de 5 dias. Na tabela 2, está demonstrado a classificação dos mesmos. Dos vinte e quatro oócitos utilizados na técnica INVO, dezenove estavam em estágio de metáfase II (MII) e cinco foram classificados como imaturos e/ou degenerados. Dos dezenove oócitos em MII, quinze fertilizaram (78,95%). Dos vinte e quatro oócitos utilizados na técnica FIV Convencional dezoito estavam em MII e seis foram classificados como imaturos e/ou degenerados. Dos dezoito em MII, quinze fertilizaram (83,33%).

Tabela 1. Dados clínicos dos casais participantes selecionados

Dados clínicos dos casais participantes	INVO/FIV 5 dias	INVO/ FIV 3 dias	P
Fator tubário	5	6	-
ESCA	2	2	-
Fator masculino leve	1	0	-
Idade média das mulheres (anos)	29,9±3,4	29,5 ±3,7	P 0,92
Idade média dos homens (anos)	36,9 ±6,0	33,9 ±5,9	P 0,31

Tabela 2. Classificação qualitativa, quantitativa e taxa de fertilização dos oócitos recuperados do G2

Parâmetros avaliados	Dispositivo INVOCeII™ 5 Dias	Taxa de Sucesso (%)	FIV Convencional 5 Dias	Taxa de Sucesso (%)
Nº de participantes	8	-	8	-
Nº de oócitos utilizados	24	-	24	-
Nº de oócitos em MII	19	79,16%	18	75%
Nº de oócitos imaturos ou degenerados	5	20,83%	6	25%
Nº de oócitos fertilizados	15	78,95%	15	83,33%
Nº de oócitos não fertilizados	4	21,05%	3	11,75%

Podemos ver na tabela 3 a classificação dos oócitos utilizados no grupo G1, cultivo por três dias. Vinte e quatro oócitos foram utilizados, a distribuição foi feita de forma aleatória através de sorteio. Dos vinte e quatro oócitos utilizados na técnica INVO vinte e dois estavam em metáfase II e dois foram classificados como imaturo e/ou degenerado. Dos vinte e dois oócitos em metáfase II, quinze fertilizaram (68,18%). Os oócitos submetidos a FIV Convencional, vinte e um estavam em metáfase II e três foram classificados como imaturo e/ou degenerado. Dos vinte e um, onze fertilizaram (52,38%).

Tabela 3. Classificação qualitativa, quantitativa e taxa de fertilização dos oócitos recuperados do G1

Parâmetros avaliados	Dispositivo INVOCeII™ 3 Dias	Taxa de sucesso (%)	FIV Convencional 3 Dias	Taxa de Sucesso (%)
Nº de participantes	8	-	8	-
Nº de oócitos utilizados	24	-	24	-
Nº de oócitos em MII	22	91,67%	21	87,50%
Nº de oócitos imaturos ou degenerados	2	8,33%	3	12,50%
Nº de oócitos fertilizados	15	68,18%	11	52,38%
Nº de oócitos não fertilizados	7	31,82%	10	57,62%

6.1. Comparação entre as técnicas INVO e FIV convencional com cultivo prolongado (5 dias)

Foi observada uma equiparidade no número de blastocistos formados entre

as técnicas INVO e FIV Convencional utilizando o cultivo prolongado. A tabela 4 nos mostra o total de blastocistos formados em cada técnica utilizada. Podemos ver que no total de 15 óocitos fertilizados utilizando a técnica INVO, sete blastocistos (46,67%) foram recuperados após a cultura prolongada de 5 dias dentro do dispositivo. No grupo de FIV Convencional foram obtidos seis blastocistos (40%) após a cultura prolongada dentro da incubadora, dos quinze óocitos fertilizados utilizando a técnica.

Tabela 4: Número de blastocistos formados após cultivo prolongado por 5 dias utilizando as técnicas INVO e FIV Convencional. Os valores são percentuais. **O teste de χ^2 foi utilizado para avaliar quantitativamente a relação entre os resultados ($P=0,97$) ($P>0,05$)**

Parâmetros avaliados	Dispositivo	Taxa de	FIV	Taxa de
	INVOCell™	sucesso	Convencional	Sucesso
	5 Dias	(%)	5 Dias	(%)
Nº de óocitos em MII	19	-	18	-
Nº de óocitos fertilizados	15	78,95%	15	83,33%
Nº total de Blastocistos	7	46,67%	6	40%

6.1.1 Classificação dos pré-embriões obtidos com cultivo por 5 dias

O desenvolvimento embrionário inicial pode ser comparado na tabela 5. Dos blastocistos recuperados através das técnicas de cultivo intravaginal INVO cinco blastocistos foram classificados como iniciais (71,43%) e dois como blastocistos (28,57%). Dos seis recuperados na técnica de FIV convencional, três foram classificados como blastocisto (50%) e três como blastocistos iniciais (50%). Os resultados demonstram uma similaridade entre as duas técnicas ($P=0,68$). De igual

forma ocorreu com os pré-embriões classificados como bloqueados, 53,33% na técnica INVO e 60% na técnica FIV convencional.

Tabela 5: Desenvolvimento dos blastocistos recuperados no Dia+5 com as técnicas INVO e FIV convencional. Os valores são percentuais. **O teste de χ^2 foi utilizado para avaliar quantitativamente a relação entre os resultados (P=0,68) (P>0,05)**

Parâmetros avaliados	Dispositivo INVOCell™ 5 Dias	Taxa de sucesso (%)	FIV convencional 5 Dias	Taxa de sucesso (%)
N° de Blastocisto inicial	5	71,43%	3	50%
N° de Blastocisto	2	28,57%	3	50%
N° de pré-embriões bloqueados	8	53,33%	9	60%

Na figura 9 observamos a classificação no que se refere à ICM e TE dos pré-embriões recuperados da técnica INVO. Quatro foram classificados com ICM de difícil visualização e com poucas células; três apresentaram ICM discernível com células agrupadas porém soltas e um apresentou ICM proeminente e boa visualização com células compactas. Cinco apresentaram TE com poucas células e um epitélio frouxo e dois apresentaram TE sem formação de epitélio coeso.

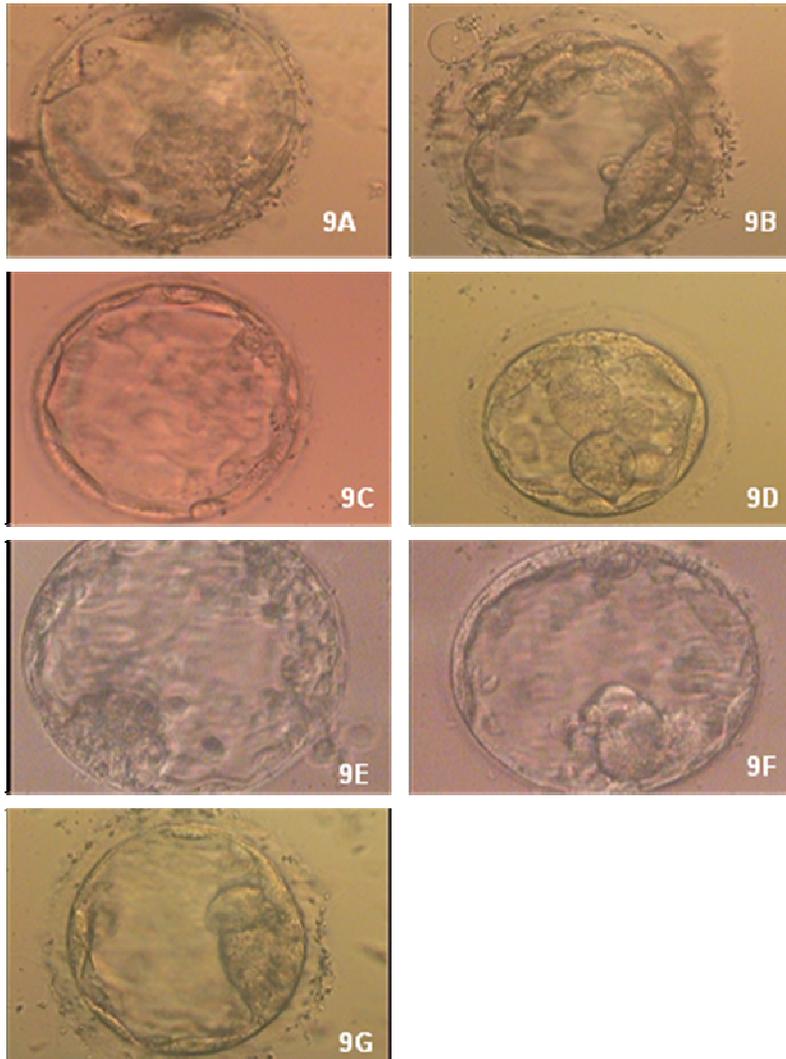


Figura 9. Blastocistos produzidos pela técnica INVO. **9A= blastocisto (Grau 2:3:2); 9B= blastocisto inicial (Grau 1:3:2); 9C= blastocisto inicial (Grau 1:2:3); 9D= blastocisto inicial (Grau 1:2:2); 9E= blastocisto (Grau 2:1:2); 9F= blastocisto inicial (Grau 1:3:3); 9G= blastocisto inicial (Grau 1:2:2).** Aumento de 40x. Obtenção: Laboratório do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF

Na figura 10, podemos ver os blastocistos produzidos pela técnica de cultura FIV convencional. Na classificação ICM, dois apresentaram proeminência e boa visualização com células compactas, e quatro a ICM estava discernível e com células agrupadas porém soltas. O trofoectoderma (TE) se formou com poucas células e um epitélio frouxo em quatro dos pré-embriões recuperados e de forma coesa e com muitas células em dois dos pré-embriões.

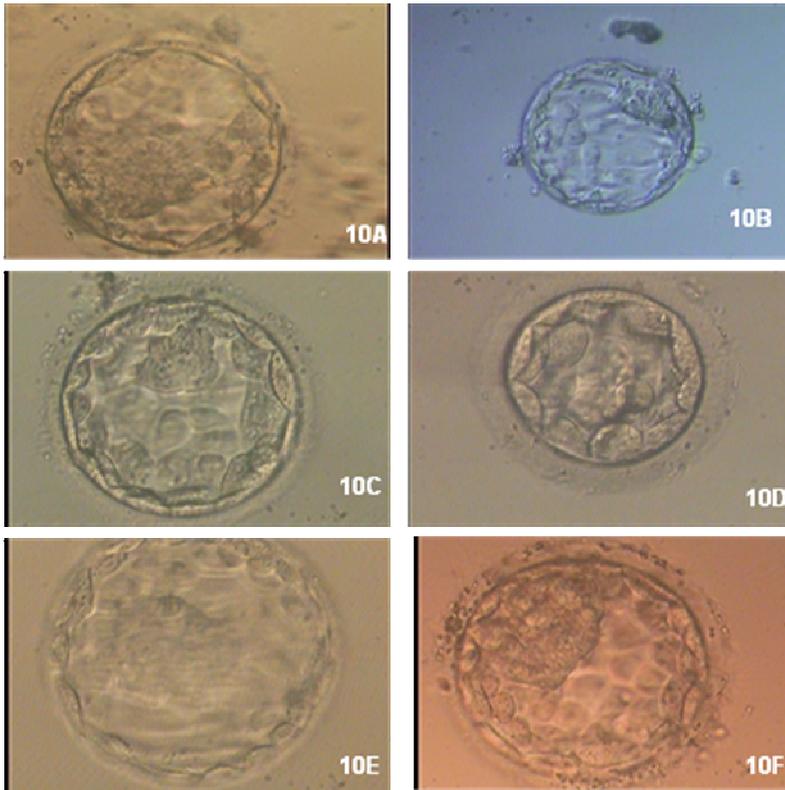


Figura 10. Blastocistos produzidos pela técnica FIV Convencional. **10A= blastocisto inicial (Grau 1:2:2); 10B= blastocisto inicial (Grau 1:2:2); 10C= blastocisto (Grau 2:2:2); 10D= blastocisto inicial (Grau 1:2:2); 10E= blastocisto (Grau 2:1:1); 10F= blastocisto (Grau 2:1:1).** Aumento de 40x. Obtenção: Laboratório do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF.

6.2. Comparação entre as técnicas INVO e FIV convencional com cultivo de 3 dias

Os resultados obtidos demonstram uma regularidade na quantidade de pré-embriões formados em ambas as técnicas, observado na Tabela 6. No uso da técnica INVO, dos vinte e dois oócitos classificados como MII quinze (68,18%) fertilizaram e apresentaram clivagem em conformidade com o dia de desenvolvimento. De igual forma ocorreu com os oócitos da técnica FIV convencional. Dos vinte e um oócitos em MII, onze (52,38%) fertilizaram e apresentaram clivagem.

Tabela 6. Pré-embriões recuperados após cultivo por 3 dias com as técnicas de INVO e FIV convencional. Os valores são percentuais. **O teste de χ^2 foi utilizado para avaliar quantitativamente a relação entre os resultados (P= 0,59) (P>0,05)**

Parâmetros avaliados	Dispositivo INVOCeII™ 3 Dias	Taxa de sucesso (%)	FIV Convencional 3 Dias	Taxa de Sucesso (%)
Nº de oócitos em MII	22	-	21	-
Nº de pré-embriões recuperados	15	68,18%	11	52,38%

A classificação geral dos pré-embriões recuperados em estágio de clivagem pode ser analisada na tabela 7. Os pré-embriões nas duas técnicas avaliadas, apresentaram resultado positivo quanto ao grau de fragmentação, um dos critérios para avaliar a morfologia (Figura 11 e 12). Todos os pré-embriões recuperados em ambas as técnicas apresentaram Grau 1 de fragmentação (<10%). Uma similaridade também foi verificada quanto ao número de pré-embriões apresentando 8 blastômeros, número ideal de células para o estágio de clivagem em Dia+3, 46,66% nos pré-embriões da técnica INVO e 54,54% nos de FIV convencional.

6.2.1 Classificação dos pré-embriões obtidos com cultivo por 3 dias

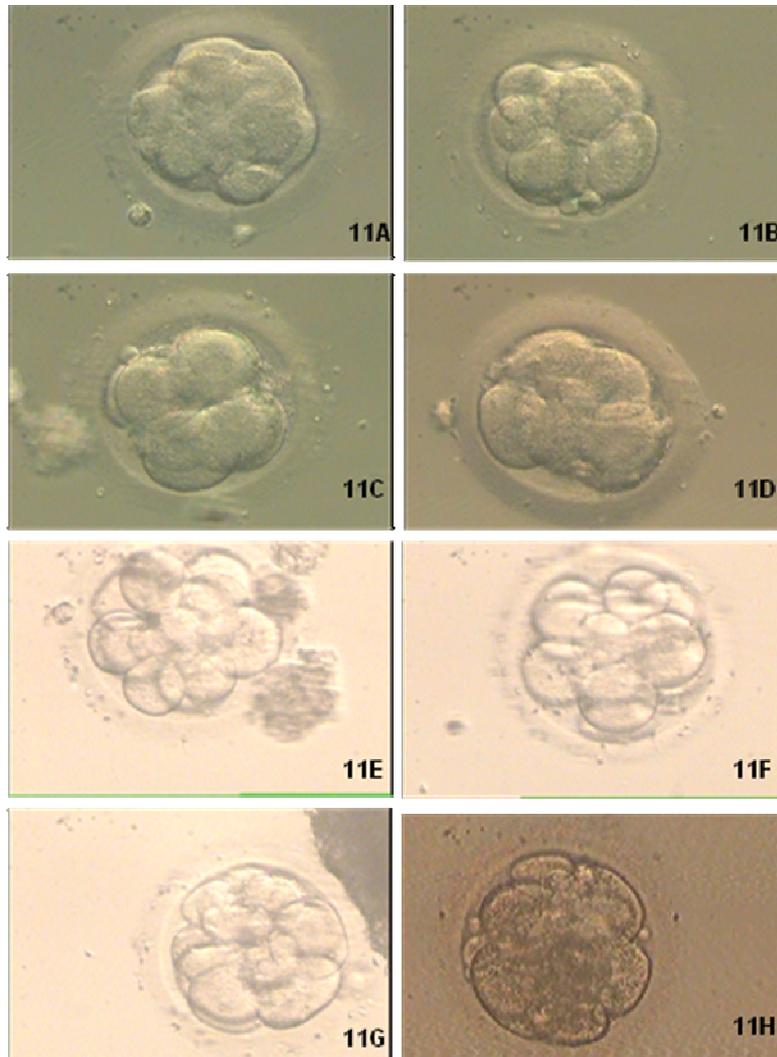


Figura 11. Amostra dos pré-embriões produzidos pela técnica FIV Convencional por 3 dias (68 ± 1 horas após fertilização). **11A= Pré-embrião (10 Células/Grau1); 11B= Pré-embrião (8 Células/Grau1); 11C= Pré-embrião (8 Células/Grau1); 11D= Pré-embrião (6 Células/Grau1); 11E= Pré-embrião (10 Células/Grau1); 11F= Pré-embrião (12 Células/Grau1); 11G= Pré-embrião (10 Células/Grau1); 11H= Pré-embrião (8 Células/Grau1).** Aumento de 40x. Obtenção: Laboratório do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF

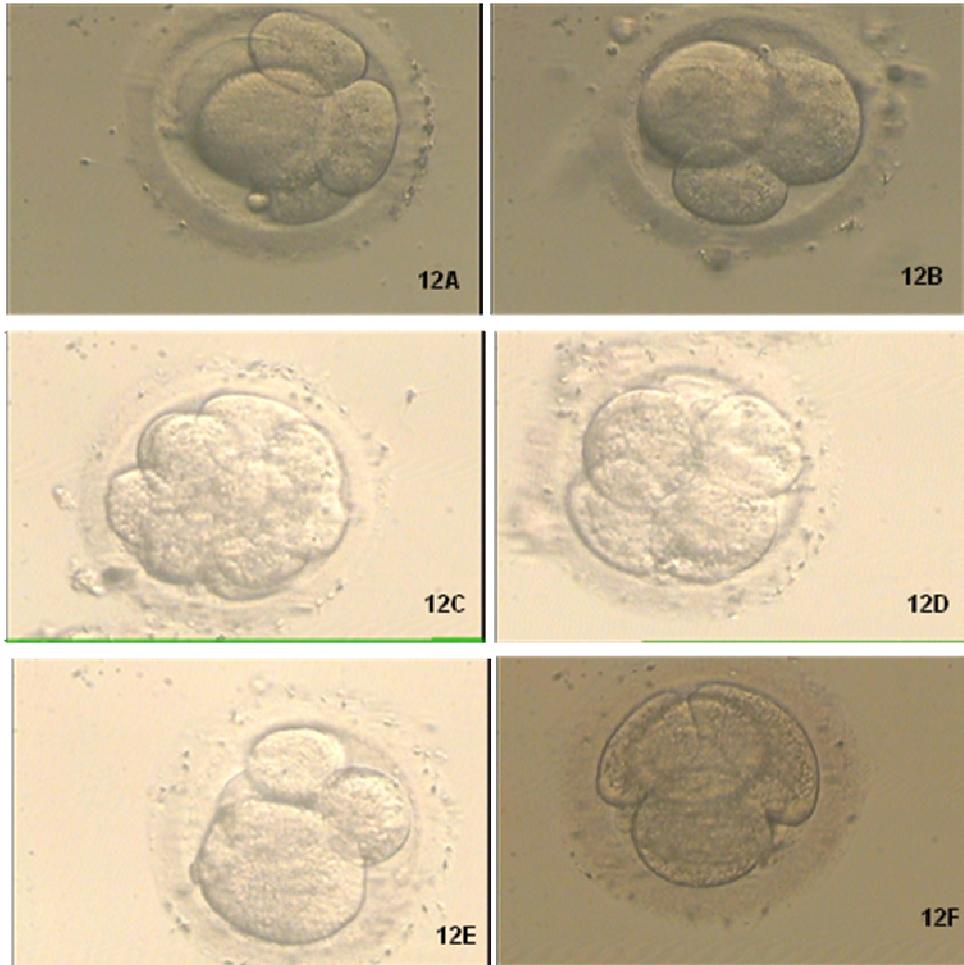


Figura 12. Amostras dos pré-embriões produzidos pela técnica INVOCell por 3 dias (68 ± 1 horas após fertilização). **12A= Pré-embrião (5 Células/Grau=1); 12B = Pré-embrião (5 Células/Grau=1); 12C = Pré-embrião (12 Células/Grau 1); 12D = Pré-embrião (6 Células/Grau= 1); 12E = Pré-embrião (5 Células/Grau=1); 12F= Pré-embrião (4 Células/Grau 1).** Aumento de 40x. Obtenção: Laboratório do Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do NF

Tabela 7. Classificação geral dos pré-embriões recuperados no Dia+3 nas técnicas de INVO e FIV convencional. Os valores são percentuais. **O teste de χ^2 foi utilizado para avaliar quantitativamente a relação entre os resultados (P=0,15) (P>0,05)**

Parâmetros avaliados	Dispositivo	Taxa de	FIV	Taxa de
	INVOCeII™	sucesso	convencional	sucesso
	3 Dias	(%)	3 Dias	(%)
N° de pré-embriões com 2 céls/grau 1	2	13,33%	0	-
N° de pré-embriões com 4 céls/grau 1	1	6,67%	0	-
N° de pré-embriões com 5 céls/grau 1	3	20%	0	-
N° de pré-embriões com 6 céls/grau 1	1	6,67%	1	9,09%
N° de pré-embriões com 8 céls/grau 1	7	46,66%	6	54,54%
N° de pré-embriões com 10 céls/grau 1	0	-	3	27,27%
N° de pré-embriões com 12 céls/grau 1	1	6,67%	1	9,09%

6.3. Aferição de pH

Para uma melhor eficiência do meio de cultura, o valor do pH apresenta uma margem ideal pelo fabricante. No meio de cultura utilizado no estudo, a margem indicada é de 7,26 a 7,33, com o melhor resultado em 7,29 de pH. A porcentagem de CO₂ na incubadora determinará esse valor, sendo um dos controles necessários

no laboratório. Todo o cultivo na técnica de FIV convencional seja do grupo G1 ou G2 utilizaram o pH de 7,29 valor padrão da incubadora do laboratório do Cinf-NF, que apresenta 7.2% de CO₂. Dessa forma, a aferição de pH foi realizada no meio de cultura armazenado no dispositivo INVOCeLL™ após os dias de cultivo, dos casais participantes que compõem o grupo G1 e G2.

A normalidade entre os valores de pH pode ser observada na tabela 8. A média obtida nos dois grupos que utilizaram o dispositivo INVOCeLL™ com cultura de cinco e três dias está dentro da média indicada pelo fabricante do meio de cultura. Também está próximo ao ideal padronizado pelo laboratório do Cinf-NF. Demonstrando que o corpo da paciente fornece um ambiente capaz de manter o meio de cultura equilibrado quanto ao pH.

Tabela 8: Valor médio do pH no cultivo utilizando o dispositivo INVOCeLL™ com cultura de 5 e 3 dias. \bar{x} :7,28 e 7,29 respectivamente.

Valor do pH no cultivo D+5	Valor do pH no cultivo D+3
7,20 ±0,03	7,30 ±0,01
7,30 ±0,03	7,29 ±0,01
7,30 ±0,03	7,27 ±0,01
7,30 ±0,03	7,30 ±0,01
7,30 ±0,03	7,28 ±0,01
7,29 ±0,03	7,29 ±0,01
7,30 ±0,03	7,30 ±0,01
7,29 ±0,03	7,30 ±0,01

6.4 Análise microbiológica

A análise microbiológica foi um dos requisitos testados pelo FDA para

aprovação do uso do dispositivo por 72 horas. O presente estudo se restringiu a analisar a microbiologia do meio de cultivo do dispositivo INVOCeTM nas pacientes do grupo G2, cultivo prolongado. Das oito amostras analisadas, nenhuma apresentou crescimento de bactérias patogênicas, após a semeadura em meios adequados. Vale ressaltar que o grupo G1 tem o cultivo em incubadoras, que segue o padrão de análise microbiológica indicado pela regulação vigente RDC 23/2011, que diz que a análise deve ser feita na incubadora onde está ocorrendo o cultivo em prazo determinado por cada serviço. No Cinf-NF a análise é realizada semestralmente, nas últimas oito análises não houve crescimento de bactérias patogênicas.

6.5 Levantamento do custo operacional associado às técnicas de INVO e FIV Convencional

Para um laboratório de Reprodução Humana Assistida ter aprovação para funcionamento pela Vigilância Sanitária (VISA) é necessário o cumprimento de exigências como: qualidade e certificação do ar e ambiente, certificações por empresas especializadas, uso de material de qualidade com aprovação da Anvisa, análise microbiológica regular de incubadoras e ambiente, capacitação dos profissionais, manutenções preventivas obrigatórias em todos os equipamentos, validações de procedimentos (ISO 9001) entre outras. Para o cumprimento dessas exigências, é necessário um alto investimento financeiro. Na Tabela 9 é demonstrado o custo operacional mensal do funcionamento de um laboratório com aprovação da VISA. O valor não inclui manutenções corretivas que podem ocorrer ao longo do ano, nem depreciação de equipamentos.

Para comparar o valor dos custos das duas técnicas INVO e FIV Convencional, foi determinado um valor diário de R\$ 470,74 para o funcionamento de um laboratório, baseado nos custos listados na Tabela 9.

Tabela 9. Custo operacional mensal para um laboratório de acordo com as exigências da Vigilância Sanitária (VISA)

MATERIAL	VALOR MENSAL (R\$)
Locação de cilindro de CO2	150,00
Gás CO2 (33 kg)	1550,67
ISO 9001	1482,00
Manutenção de ar condicionado	2000,00
Programa de prontuários e controle eletrônico	249,90
Manutenção preventiva de equipamentos	1950,26
Manutenção preventiva de incubadoras	145,83
Certificação do ar e ambiente	269,17
Kit de descontaminação de incubadora	192,66
Análise microbiológica	54,00
Sabão descontaminante	305,00
Telefone	410,00
Energia	2480,00
Capacitação profissional	198,92
Biólogo	2683,80
Custo operacional do laboratório	14.122,21

Na Tabela 10 e 11 estão demonstrados os insumos utilizados nas técnicas de FIV Convencional e INVOCeCell™ e seu custo operacional, respectivamente. Observa-se que todos os insumos utilizados são os mesmos para as duas técnicas, diferindo

entre as mesmas o tempo de permanência e utilização do laboratório, fazendo com que haja uma diferença de 43,74% nos valores de custo operacional de uma técnica para outra. Essa diferença ocorre devido ao corpo da participante funcionar como uma “incubadora” para o dispositivo INVOCell™, diminuindo sua permanência no laboratório.

7. Discussão

Na atualidade se tem um consenso, cada vez maior, sobre as vantagens de se transferir um pré-embrião na fase de blastocisto nos procedimentos de FIV (MORENO, 2005). Comparações diretas entre os estágios de clivagem e estágio de blastocisto apóiam o uso da transferência no 5º dia como prática clínica (GLUJOVSKY, 2016). Podemos citar como vantagens a transferência do melhor pré-embrião e a redução do número de pré-embriões transferidos. Desta forma, se aumenta a chance de sucesso do tratamento e se reduz as chances de gravidez múltipla. A seleção do melhor blastocisto, contribuiria também para melhor sincronização entre pré-embrião e útero. Além disso, a transferência de blastocistos também já foi associada a melhores resultados perinatal (GLUJOVSKY, 2016).

É sabido que a cultura estendida de pré-embriões por cinco dias requer um sistema de cultivo que supra todas as necessidades embrionárias neste período. Meios de cultura otimizados são utilizados para prover os substratos necessários ao crescimento e desenvolvimento do embrião. Em laboratório, esse cultivo prolongado eleva o custo do tratamento, não só pelo custo de manutenção de um laboratório como da mão de obra especializada. No presente trabalho, procuramos testar a viabilidade do uso do dispositivo INVOCell™, para a cultura estendida como forma alternativa de menor custo.

Tabela 10. Custo operacional da técnica FIV Convencional (5 dias)

MATERIAL	QUANTIDADE	VALOR TOTAL (R\$)
Meio de cultura	3 ml	37,50
Soro suplemento substituto	0,3 ml	4,96
Meio tamponado	6 ml	22,83
Seringa 1ml	2	0,32
Seringa 5 ml	1	0,12
Frasco coletor	1	0,48
Placa de 4 poços	1	8,90
Placa de 1 poço	1	4,36
Placa de petri 100x20	3	13,59
Agulha de punção	1	81,90
Cateter de transferência embrionária	1	118,00
Tubo estéril 14 ml	6	4,98
Tubo vacutainer	1	2,04
Ponteiras	20	75,73
Custo operacional diário do laboratório	6	2824,44
Custo operacional da técnica FIV Convencional		3200,15

Tabela11. Custo operacional da técnica INVO (5 dias)

MATERIAL	QUANTIDADE	VALOR TOTAL (R\$)
Dispositivo INVOCell	1	483,00
Meio de cultura	3 ml	37,50
Soro suplemento substituto	0,3 ml	4,96
Meio tamponado	6 ml	22,83
Seringa 1ml	2	0,32
Seringa 5 ml	1	0,12
Frasco coletor	1	0,48
Placa de 4 poços	1	8,90
Placa de 1 poço	2	4,36
Placa de petri 100x20	3	13,59
Agulha de punção	1	81,90
Cateter de transferência embrionária	1	118,00
Tubo estéril 14 ml	6	4,98
Tubo vacutainer	1	2,04
Ponteiras	20	75,73
Diária de laboratório	2	941,48
Custo operacional da técnica INVOCell (5 dias)		1800,19

7.1 Sistema de cultivo com o dispositivo INVOCeCell™ x FIV convencional por 5 dias

A fim de maximizar as taxas de sucesso nas técnicas de RA, o cultivo estendido até o estágio de blastocisto tem sido utilizado com esse fim. Os resultados obtidos nesse estudo nos mostram a equivalência entre as técnicas de fertilização *in vitro* INVO e FIV convencional com tempo de cultivo estendido de três para cinco dias. Segundo o 11º relatório publicado pelo Sisembrio, uma média de 76% de taxa de fertilização foi alcançada pelas clínicas do Brasil no ano de 2017 (ANVISA, 2018). A taxa de fertilização alcançada no nosso estudo foi de 78,95% com o uso do dispositivo INVOCeCell™ e de 83,33% com o uso da técnica FIV convencional. Portanto, podemos considerar que as duas técnicas utilizadas atingiram eficiência média vista na maioria dos serviços brasileiros.

Não só a taxa de fertilização, como também o número de pré-embriões obtidos no estágio de blastocisto confirma a equivalência da eficácia do cultivo intravaginal e da FIV convencional. Uma vez que nosso estudo é o pioneiro no cultivo de blastocisto no dispositivo INVOCeCell™, não há publicações comparativas de outros serviços. Entretanto, podemos comparar com a técnica de FIV convencional, onde Moreno e colaboradores, em 2005, avaliando meios de cultura no cultivo estendido, obteve taxa de 42,1% de blastocistos com o uso da cultura de FIV convencional.

A morfologia tem sido proposta como um dos marcadores de qualidade embrionária. No presente estudo, em ambos os grupos os blastocistos apresentaram uma morfologia com um número reduzido de células na ICM e no TE. Segundo Bloise, isso pode levar a consequências deletérias para o crescimento fetal, atrasando significativamente os eventos posteriores (2014). A morfologia do TE, é tido como um preditor de sucesso das técnicas de FIV, devido à melhor comunicação entre blastocisto e endométrio. A massa celular interna e o trofoectoderma são sensíveis as variáveis específicas do sistema de cultura (BLOISE, 2014). Contudo, Figueira e colaboradores, com o objetivo de associar a morfologia dos blastocistos com alterações cromossômicas mostrou que 40% dos pré-embriões que alcançaram o estágio de blastocisto apresentaram aneuploidia. Além disso, 35% dos que apresentaram TE normal foram aneuplóide e 38% com massa celular interna com normalidade morfológica também apresentou aneuploidia

(FIGUEIRA *et al*, 2015).

A cultura estendida evidencia uma melhor seleção embrionária, além de colaborar com as legislações vigentes no país, pois segundo a RDC Nº 23/2011 um pré-embrião só deve ser considerado inviável e desprezado por ausência de clivagem em período superior a 48h (quarenta e oito horas). A morfologia quanto ao tempo de desenvolvimento é crucial nessa consideração. Todos os blastocistos formados tanto no dispositivo INVOCell™ quanto no FIV convencional se enquadram em viabilidade para transferência.

Para o cultivo de pré-embriões viáveis o equilíbrio no sistema de cultura é de extrema importância. A permeabilidade a gás do dispositivo INVOCell™ é capaz de manter a concentração de Oxigênio em torno de 5%, um dos fatores que favorecem ao desenvolvimento do blastocisto. Além de manter o meio com pH equilibrado em média 7,28 durante o período de incubação. Essas concentrações contribuem para um metabolismo energético adequado para a viabilidade, fertilização e desenvolvimento embrionário dos gametas (GARCIA, 2015).

As variáveis pH, temperatura, e concentração de oxigênio foram constantes no cultivo INVO, indicando que a heterogeneidade apresentada na qualidade dos blastocistos formados no dispositivo, pode ser atribuída a fatores intrínsecos dos gametas, uma variável impactante nos resultados embrionários, e as condições de cultivo do INVO não foram suficientes para superar essas limitações. Alterações induzidas pelo sistema de cultivo, já pertencentes aos gametas ou induzidas pela estimulação ovariana podem ser mascarados por análises morfológicas, uma vez que aproximadamente 40% dos blastocistos produzidos por mulheres com menos de 35 anos apresentam aneuploidias (TAYLOR *et al*, 2014).

Em nossa análises nenhum dos casos utilizando o dispositivo por cinco dias houve o crescimento de bactérias patogênicas, mostrando que diferentemente do seu protótipo o dispositivo INVOCell™ assegura a esterilidade o meio de cultura dentro dele, como havia sido comprovada em D+3 pelo FDA.

7.2 Sistema de cultivo com o dispositivo INVOCell™ x FIV convencional por 3 dias

O uso do dispositivo INVOCell™ com cultivo de 72 horas, já é rotina em vários laboratórios do mundo (MITRI, 2015 ; GARCIA, 2015; LUCENA, 2012; COELHO, 2013). Seu uso já foi regulamentado por instituições como o FDA, nos Estados Unidos e Vigilância Sanitária, no Brasil. Os resultados alcançados nesse trabalho corroboram para o uso seguro do dispositivo em cultivo de 72 horas.

Como foram considerados fertilizados todos os pré-embriões em qualquer estágio de clivagem, a taxa de fertilização e clivagem foi à mesma. Os resultados demonstraram eficácia da técnica INVO, com 68,18% de oócitos fertilizados/clivados, e 52,38% na técnica de FIV convencional, não havendo diferença significativa entre as técnicas ($P=0,6$). Analisando a taxa de pré-embriões recuperados em estágio de clivagem, em ambas as técnicas observamos uma diferença, considerando os resultados publicados no último relatório do SISEmbrio, que foi de 95%, a taxa de clivagem no cultivo de três dias foi relativamente mais baixa que o esperado.

Quando analisado os pré-embriões com um número de 8 blastômeros e grau 1 de fragmentação, morfologia ideal para o dia+3, a qualidade dos pré-embriões demonstra que entre as técnicas de INVO e FIV convencional não foi existiu diferença significativa. As causas da fragmentação não estão estabelecidas, alguns processos celulares parecem estar envolvidos como apoptose, deficiência de ATP no embrião e perda de blastômero por apoptose devido alteração cromossômica. Essas alterações podem ter influencia do sistema de cultura e também dos gametas. Independente do mecanismo ou da causa, a fragmentação embrionária parece estar diretamente relacionada com o comprometimento da viabilidade embrionária (STENSEN *et al.* 2015, ALIKANI *et al.* 1999). Dessa forma o estudo nos confirma um ambiente favorável para o desenvolvimento embrionário nos sistemas de cultivo avaliados.

7.3 Custo operacional associado às técnicas de INVO e FIV Convencional

Todas as decisões de cuidados de saúde têm implicações de recursos, e até

mesmo a decisão de se transferir um pré-embrião em estágio de clivagem ou blastocisto influenciará nos custos envolvidos em um tratamento de reprodução assistida. Para a transferência em estágio de blastocisto, os custos precisam levar em conta o pessoal adicional de laboratório, equipamentos e insumos necessários para oferecer um eficiente cultivo aos pré-embriões. Também se deve levar em consideração que em torno de 9% das mulheres, tem seu ciclo cancelado por não haver blastocistos para transferência (GLUJOVSKY, 2016).

Para se obter bons pré-embriões é necessário um investimento alto em laboratórios, em um sistema de qualidade eficiente para controlar todas as variáveis que irão influenciar no sistema de cultivo e por sua vez no desenvolvimento embrionário. O sistema de cultivo INVO, com a utilização do dispositivo INVOCeTM tem se proposto como alternativa na redução desses custos, ao mesmo tempo que oferece um ambiente favorável ao desenvolvimento embrionário (RANOUX, 2012).

Os custos nos tratamentos de reprodução assistida em todo o mundo é um dos limitadores de acesso as técnicas. No Brasil, o custo do tratamento gira em torno de 18 a 20 salários mínimos, no Canadá pode exceder a 12 mil dólares (MITRI 2015). Esses valores podem variar conforme idade da mulher, quantidade de medicação para estimulação e técnicas utilizadas. A tecnologia necessária para o funcionamento de um laboratório, assim como sua estrutura e tudo que envolve para a excelência nos resultados é considerada cara, e todos os gastos são repassados nos tratamentos, ou seja, para os casais. Um valor de R\$ 470,74 foi determinado como diária em um laboratório, baseado nas exigências mínimas para o funcionamento de um laboratório de BCTG (Banco de células e tecidos germinativos). A análise dos custos utilizando o dispositivo INVOCeTM demonstrou uma redução considerável de valores.

No estudo ao comparar as duas técnicas INVO e FIV convencional no cultivo prolongado foi observada uma redução de 43% no total de custos com o laboratório. Esse valor se deve ao menor tempo de diária dos pré-embriões dentro do laboratório, valor ao qual não será repassado ao tratamento. Diminuindo assim seus custos e aumentando a oportunidade para casais que buscam por tratamentos mais viáveis financeiramente.

A diferença financeira apresentada demonstra que a redução dos custos para

o tratamento utilizando o dispositivo INVOCeCell™ é possível. Abrindo uma possibilidade de tratamento para casais inférteis, que por motivos financeiros não realizam o tratamento de reprodução assistida.

A FIV estabeleceu protocolos de cultivo e estímulo ovariano que produzem bons resultados, com isso os profissionais sentem-se confortáveis em suas rotinas. Para haver uma mudança nessa estabilidade com a adoção de protocolos de estímulo ovariano leve e uso do dispositivo INVOCeCell™, os clínicos e embriologistas teriam que se ajustar as técnicas, o que a torna menos atraente. Pois com a implantação do ICSI muitos dos embriologistas deixaram de lado o uso da FIV convencional, isso muito se deve ao receio de falhas de fertilização. A avaliação morfológica dos gametas, assim como a correta diluição seminal asseguram uma boa fertilização, o que se comprova com os resultados do presente estudo.

Os profissionais envolvidos nos tratamentos de fertilização *in vitro* devem levar em consideração as vantagens para as pacientes e seus descendentes, o tratamento não pode ser oferecido de forma comercial, onde a abordagem de novas técnicas não é aceita por impor riscos financeiros (FAUSER, 2010).

No Brasil, os convênios de saúde não incluem as técnicas de fertilização *in vitro*, e os poucos serviços públicos existentes não oferecem o tratamento de forma completamente gratuita. Com a redução dos custos com a técnica INVO a criação de serviços completamente públicos passa a ser viável.

8. CONCLUSÃO

A técnica de cultivo intravaginal estendida, utilizando o dispositivo INVOCeCell™, se apresentou eficiente, viável e de menos custo.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

A técnica de cultivo INVO de forma estendida será implantada na rotina do Serviço de Medicina Reprodutiva do Hospital Escola Álvaro Alvin/Centro de Infertilidade e Medicina Fetal do Norte Fluminense. Os resultados desse trabalho

serão fornecidos para a empresa desenvolvedora e fornecedora INVO Bioscience. Serão usados como base para a implantação do uso do dispositivo INVOCeII™ no cultivo estendido.

Analisar o nível de saturação no microambiente formado no cultivo dos blastocistos tanto no dispositivo quanto na incubadora. Objetivando correlacionar os resultados encontrados com o a morfologia dos blastocistos.

Através dos resultados encontrados na futura análise buscar mudanças no sistema de cultivando fornecendo blastocistos morfologicamente melhores.

Correlacionar o cultivo estendido de 5 dias no dispositivo INVOCeII™ com a taxa de gestação e bebê em casa.

10. Referências Bibliográficas

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC Nº 23/2011. **Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos nos termos desta Resolução.** Diário Oficial da União de 30 de maio de 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2954258/RDC_23_2011_COMP.pdf/ba335341-5993-4843-83dc-f23681690514>. Acesso em: 02 mai 2017; 24 nov 2018.

ALIKANI, M. J.; COHEN G.; TOMKIN, G. J.; GARRISI, C.; MACK, R. T.; SCOTT. **"Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation."** Fertil Steril 71 (5) p.836-42. 1999.

ALLAHBADIA, G.N. **IVF in Developing Economies and Low Resource Countries: An Overview.** The Journal of Obstet.Gynaecol. India. v. 63, p. 291-294; 2013.

ALPHA SCIENTISTS IN REPRODUCTIVE MEDICINE AND ESHRE SPECIAL INTEREST GROUP OF EMBRYOLOGY. **The Istanbul Consensus Workshop on embryo assessment: proceedings of and expert meeting.** Human Reproduction, v. 26, n°6 p. 1270-1283. 2011.

ANVISA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, v. 9, p.8-150. 2013.** Disponível em: <<https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/category/manuais>>. Acesso em: 20 out. 2017.

ANVISA. **Relatórios SisEmbrio - Sistema Nacional de Produção de Embriões.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/sangue/publicacoes?tagsName=sisembrio#>>. Acesso em: 15 dez. 2015; 18 jul. 2018.

BERGER, D. S; ZAPANTIS, A.; MERHI, Z ; YOUNGER, J. POLOTSKY, A. J.; JINDAL,S. K. **Embryo quality but not pronuclear score is associated with clinical pregnancy following IVF.** J Assist Reprod Genet. v. 31. p. 279–283. 2014.

BLOISE, E.; FEUER, S. K.; RINAUDO P. F. **Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human**

reproductive medicine and animal breeding. Hum. Reprod. Update. v. 0, n.0 p. 1–18. 2014.

COELHO, F.; AGUIAR, L. F.; CUNHA, G.S.P.; LUCENA, E. **Introduction of the method of intravaginal culture (IVC), through the device INVOCell routine laboratory RHA in Brazil.** JBRA Assisted Reproduction. v. 17 n. 6. p. 340-343. 2013.

COLLINS, J. **Cost-effectiveness of in vitro fertilization.** Semin.Reprod. Med. v.19, p. 279–289. 2001.

DELIGEOROGLOU, E.; PANTOS, K.; KOUTSILIERIS M. **Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics.** In Vivo. v. 32, p. 451-460. 2018.

DIEAMANT, F.; PETERSEN C. G.; MAURI A. L.; COMAR V.; MATTILAM.; VAGNINI L. D.; RENZI A.; PETERSEN B.; RICCI J.; OLIVEIRA J. B. A.; BARUFFI R. L. R; FRANCO J. G. **Single versus sequential culture medium: which is better at improving ongoing pregnancy rates? A systematic review and meta-analysis.** JBRA Assisted Reproduction. Vol. 21, n.3, p. 240-246. 2017.

FAUSER, B.C.J.M.; NARGUND, G.; ANDERSEN, A. N.; , NORMAN R.; TARLATZIS, B.; BOIVIN J., LEDGER W. **Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later.** Human Reproduction. v.25, n.11, p. 2678–2684. 2010.

FIGUEIRA RCS, SETTI AS, BRAGA DPAF, IACONELLI A JR, BORGES E JR. **Blastocyst morphology holds clues concerning the chromosomal status of the embryo.** Int J Fertil Steril. v. 9. n 2, p. 215-220. 2015

GARCÍA-FERREYRA J.; HILARIO, ,R.; LUNA, D.; VILLEGAS, L.; ROMERO, R.; ZAVALA, P.; DUEÑAS-CHACÓN, J. **In Vivo Culture System Using the INVOcell Device Shows Similar Pregnancy and Implantation Rates to Those Obtained from In Vivo Culture System in ICSI Procedures.** Clinical Medicine Insights: Reproductive Health. v. 9, p.7–11. 2015.

GARDNER, D.K. “Art and the human blastocyst”. **Serono Symposia Series**, Springer Verlag. New York. 2001.

GARDNER, D.K. **Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics.** *Reprod. Fertil.* v. 20, p. 9–18. 2008.

GLUJOVSKY, D.; FARQUHAR, C. **Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms?** *Fertility and Sterility.* v. 106, n. 2, p. 244-250. 2016.

HARDARSON, T.; LANDUYT, L. V.; JONES G. The blastocyst. In: Magli M. C., Jones, G.M.; Lundin, K.; Van den Abbeel, E. **Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos.** *Human Reproduction.* v. 27, n.1, Cap. 4, p. 72–9. 2012.

HONG, K. H.; LEE, H.; FORMAN, E. J.; UPHAM, K. M.; SCOTT R. T. **Examining the temperature of embryo culture in in vitro fertilization: a randomized controlled trial comparing traditional core temperature (37°C) to a more physiologic, cooler temperature (36°C).** *Fertility and Sterility.* v. 102, n. 3. p. 767-773. 2014.

IBGE, **Projeção da População do Brasil – 2013.** Disponível em: <<http://brasilemsintese.ibge.gov.br/populacao/taxas-de-fecundidade-total.html>>. Data de acesso: 11 jan. 2016.

LUCENA, E.; SAA, A. M.; NAVARRO, D. E.; PULIDO, C.; LOMBANA, O.; MORAN, A. **INVO Procedure: Minimally Invasive IVF as an Alternative Treatment Option for Infertile Couples.** *The Scientific World Journal.* v.4:571596. 2012.

MANDELBAUM, J. **Oocytes.** *Hum. Reprod.* v. 15, S. 4, p. 11–18. 2000.

MITRI, F.; ESFANDIARI N.; COOGAN-PREWER, J.; CHANG, P.; BENTOV, Y.; MCNAUGHT, J.; KLEMENT, A. H., CASPER, R. F. **A pilot study to evaluate a device for the intravaginal culture of embryos.** *Reproductive BioMedicine Online.* v. 31. p. 732–738. 2015.

MORENO, J. **Mejora clínica de la implantación embrionaria mediante la utilización de medios secuenciales definidos químicamente para el desarrollo de embriones humanos hasta el estadio de blastocistos.** 2005. 241 p. Tese de Doctorado. Universitat de València - Facultat de Medicina i odontologia Departament de Pediatria, Obstetricia y Ginecología. València – ESP, 2005.

PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE. **Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives.** Fertil. Steril. v.90, p. 13–20. ASRM, 2008.

PRADOS F. J.; DEBROCK, S.; LEMMEN, J. G.; AGERHOLM, J. The cleavage stage embryo. In: Magli M. C., Jones, G.M.; Lundin, K.; Van den Abbeel, E. **Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos.** Human Reproduction. v. 27, S. 1, Cap. 3, p. 50-71. 2012.

RANOUX, C. In Vivo Embryo Culture Device. In: Z.P. NAGY, ZSOLT PETER, VARGHESE, ALEX C., AGARWAL, ASHOK . **Practical Manual of In Vitro Fertilization: Advanced Methods and Novel Devices.** Springer-Verlag New York. v. 1, p. 161-169. 2012.

RANOUX, C.; FOULOT, H.; AUBRIOT, F.X.; POIROT, C.; DUBUISSON, J.B.; CHEVALLIER, O.; CARDONE, V. **A new in vitro fertilization technique: intravaginal culture.** Fertil Steril. vol. 49, p. 654-657. 1988.

RANOUX, C.; FRYDMAN R. **INVO: a simple, low cost effective assisted reproductive technology.** ESHRE Monographs. Ed. 1, p. 85–89. 2008.

SANTOS, T. A. Fisiologia do Ovário e da Fecundação. In: RAMOS, M. M.; SANTOS, T. A. **Esterilidade e Procriação Medicamente Assistida.** Coimbra, 2010. Cap. 03, p. 39-53.

SBRA - **Estilo De Vida Pode Provocar Infertilidade** – 2017. Disponível em: <<http://sbra.com.br/noticias/estilo-de-vida-pode-provocar-infertilidade/>>. Acesso em: 13 set. 2018.

SIMOPOULOU, M.; SFAKIANOUDIS, K.; RAPANI, A.; GIANNELOU, P.; ANIFANDIS, G.; BOLARIS; S., PANTOU, A.; LAMBROPOULOU, M.; PAPPAS, A.; DELIGEOROGLOU, E.; PANTOS, K.; KOUTSILIERIS, M. **Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: From Media to Epigenetics.** in vivo. v. 32, p. 451-460. 2018.

SOCIEDADE AMERICANA DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. Educação continuada em ciências reprodutivas. **Embriologia Clínica, Sistema Reprodutivo Feminino, Anatomia e Fisiologia.** Cap. 1, p. 24. 2015.

STENSEN, M. H.; T. G. TANBO, R. STORENG, T. ÅBYHOLM, AND P. FEDORCSAK. **"Fragmentation of human cleavage-stage embryos is related to the progression through meiotic and mitotic cell cycles."** Fertil Steril. v. 103, n. 2, p. 374-381. 2015.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS R.G. **Birth after the reimplantation of a human embryo.** Lancet. p. 312-366. 1978.

SWAIN, J. E.; CARRELL, D.; COBO, A.; MESEGUER, M.; RUBIO, C.; SMITH, G. D. **Optimizing the culture environment and embryo manipulation to help maintain embryo developmental potential.** Fertility and Sterility. v. 105, n. 3, p. 571-587. 2016.

TAVARES, R.; CUNHA G.; AGUIAR L.; DUARTE S. C.; CARDINOT N.; BASTOS E.; COELHO F. **Socioeconomic profile of couples seeking the public healthcare system (SUS) for infertility treatment.** JBRA Assisted Reproduction. v. 20, n 3. p. 112-117. 2016.

TAYLOR, H.T.; PATRICK, J. L.; GITLIN, S. A.; CRAIN, J. L. WILSON, J. M.; GRIFFIN, D. K. **Blastocyst euploidy and implantation rates in a young (<35 years) and old (>35 years) presumed fertile and infertile patient population.** Fertility and Sterility. v. 102, n. 5, p. 1318-1323. 2014.

THOMPSON, J.G.E; SIMPSON A.C.; PUGH P.A.; DONNELLY P.E.; TERVIT H. R. **Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos.** J Reprod Fertil. v. 89, p. 573–578. 1990.

TSO, L. O.; FILHO, O. B. D. Epidemiologia da Infertilidade. In: DZIK, A.; PEREIRA, D.H.M; CAVANA, M.; AMARAL, W.N. **Tratado de Reprodução Assistida.** São Paulo, 2011. cap. 1, p. 1-9.

VIEIRA, G. H.; COELHO, F. **Comparative preliminary study between the conventional IVF/ICSI and the INVO intra-vaginal device: Stress-related psychological impact.** JBRA Assisted Reproduction . v. 17, n 5, p. 300-303. 2013.

VOLPES, A.; SAMMARTANO, F.; RIZZARI, S.; GULLO, S.; MARINO, A.; ALLEGRA, A. **The pellet swin-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures.** J Assist Reprod Genet. v. 33, p. 765-770. 2016.

WALE, P. L.; GARDNER D. K. **The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction.** Human Reproduction Update. Vol.0, p. 1–21. 2015.

WHO, World Health Organization and Department of Reproductive Health and Research, **Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.** World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2010. cap. 1, p. 56–58.

Anexo 2. Insumos para as técnicas INVOCeII e FIV Convencional por 5 dias

MATERIAL	INVOCeII™	Fiv convencional
Dispositivo INVOCeII	1	0
Meio de cultura	3 ml	3 ml
Soro suplemento substituto	0,3 ml	0,03 ml
Meio tamponado	6 ml	6 ml
Seringa 1ml	2	2
Seringa 5 ml	1	1
Frasco coletor	1	1
Placa de 4 poços	1	1
Placa de 1 poço	2	1
Placa de petri 100x20	3	3
Agulha de punção	1	1
Cateter de transferência embrionária	1	1
Tubo estéril 14 ml	6	6
Tubo vacutainer	1	1
Ponteiras	20	20
Custo operacional diário do laboratório	2	6