

JOSÉ LUÍS BENTO LINO METELLO
Licenciado em Medicina

Impacto da utilização de didrogesterona em ciclos com níveis de progesterona baixos no dia da transferência de embriões congelados

MESTRADO EM ESTATÍSTICA PARA A SAÚDE
Universidade NOVA de Lisboa
Dezembro, 2022

Impacto da utilização de didrogesterona em ciclos com níveis de progesterona baixos no dia da transferência de embriões congelados

JOSÉ LUÍS METELLO

Licenciado em Medicina

Orientadora: Isabel Natário,
Professora Associada, Universidade NOVA de Lisboa

Júri

Presidente: Doutora Ayana Maria Xavier Furtado Mateus,
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Arguentes: Doutora Inês Jorge Sequeira,
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Doutora Isabel Cristina Maciel Natário,
Professora Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Impacto da utilização de didrogesterona em ciclos com níveis de progesterona baixos no dia da transferência de embriões congelados

Copyright © José Luís Metello, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade NOVA de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Este documento foi criado com o processador de texto Microsoft Word e o template NOVAThesis Word.

O trabalho aqui expresso é dedicado à minha esposa, Carla Metello, sempre presente e às
minhas filhas Carolina, Sofia e Luísa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Professora Isabel Natário que sempre me apoiou e me ajudou a encontrar energia nos momentos mais trabalhosos.

Um obrigado ao Dr Rui Gomes que muito contribuiu para o meu empenho nesta tarefa.

Um abraço especial ao Dr Pedro Ferreira, sem ele não teria conseguido compilar os dados que permitiram concluir o trabalho e outro para a Dra Claudia Tomás que desde inicio me encorajou para completar esta ideia.

Tenho que agradecer também ao CIRMA e ao Serviço de Ginecologia do Hospital Garcia de Orta, pois este trabalho só foi possível porque esta Unidade existe e com o carinho e a atenção possível tantas alegrias tem proporcionado a tantos pacientes.

RESUMO

Introdução: As transferências de embriões congelados (TECs) aumentaram consideravelmente na última década. Parece haver uma relação entre os baixos níveis séricos de progesterona (P4) no dia da TEC e uma redução na taxa de gravidez evolutiva e de parto. Uma estratégia de resgate de ciclos com P4 baixo no dia da TEC poderá ser útil como alternativa a cancelar o ciclo.

Objetivo: Verificar se a taxa de gravidez evolutiva dos ciclos TEC em que se observaram valores de P4 baixos, subsequentemente suplementados com didrogesterona (DYD) foi semelhante aos resultados dos ciclos com valores de P4 considerados normais. Avaliar a distribuição dos valores de P4 na amostra e se variáveis como o peso, o índice de massa corporal, a idade ou a etnia da mulher o podem influenciar.

Métodos: Estudo de coorte retrospectivo que incluiu ciclos TEC realizados entre Julho de 2019 e Março de 2022 após um ciclo de preparação endometrial artificial usando valerato-estradiol e P4 vaginal micronizado (400 mg duas vezes ao dia). Sempre que o valor de P4 sérico foi considerado baixo na manhã da transferência planeada, adicionou-se 10mg de DYD tri-diário como suplementação. O evento de interesse primário foi gravidez evolutiva após 10 semanas de gravidez. Após uma análise exploratória, identificaram-se quais as variáveis relacionadas com um desfecho positivo, numa análise de regressão univariada e multivariada. Compararam-se grupos de acordo com a administração ou não de DYD, avaliou-se a distribuição dos valores de P4 na amostra e as variáveis associadas a esta variação.

Resultados: Analisaram-se 679 ciclos TEC, dos 181 casos (26.7%) suplementadas com DYD e 498 (73.3%) com o tratamento habitual. Verificaram-se 437 casos de gravidez (64.4%-

64,9% no grupo sem DYD e 63% no grupo com DYD). Destes 292 (43% do total) foram de gravidez evolutiva (44,0% no grupo sem DYD e 40,9% no grupo com DYD).

Os valores de progesterona observados são bem modelados por uma distribuição gama, com média 14.4 ng/ml e desvio padrão de 4.6 ng/ml. Através de um modelo de regressão gama verificou-se que as variáveis idade no dia da TEC ($p < 0.05$), etnia ($p < 0.01$), peso ($p < 0.001$) e altura ($p < 0.05$) ajudam a explicar a variação da P4.

Num modelo de regressão multivariada verificou-se que a idade na colheita ($p < 0.01$), a espessura endometrial ($p < 0.001$), o dia da transferência ($p < 0.001$) e o n° de embriões transferidos ($p < 0.05$) se relacionavam com gravidez evolutiva. Não se verificaram diferenças nos resultados entre ciclos com ou sem uso de DYD.

Conclusões: A idade da mulher no dia da transferência, a etnia e o peso podem ajudar a explicar variações nos valores de progesterona observados. A espessura do endométrio, o dia de chegada a blastocisto e o n° de embriões transferidos relacionaram-se de forma positiva com a possibilidade de gravidez evolutiva. A taxa de gravidez evolutiva foi independente do uso de DYD.

Palavras chave: Didrogesteron, Transferência de embriões congelados, ciclo artificial, sucesso em PMA, fase lútea

ABSTRACT

Introduction: Frozen embryo transfers (FETs) have increased considerably over the past decade. There seems to be a relationship between low serum progesterone (P4) levels on the day of embryo transfer and a reduction in ongoing and delivery rate. A rescue strategy of cycles with low P4 on the FET day might be useful as an alternative to cancel the cycle.

Objective: To evaluate whether the results of cycles with FET where low levels of plasma P4 were observed and which were subsequently supplemented with dydrogesterone (DYD) were similar to the results of cycles with normal progesterone values. To assess the distribution of P4 values in the sample and whether variables such as weight, body mass index, age or ethnicity of the woman can influence serum progesterone values.

Methods: Retrospective cohort study that included FET cycles performed between July 2019 and March of 2022 after a cycle of artificial endometrial preparation using valerate-estradiol and micronized vaginal P4 (400 mg twice daily). Whenever the serum P4 value was considered low on the morning of the planned transfer, 10mg of DYD tri-daily was added as a supplement. The primary endpoint was ongoing pregnancy after 10 weeks of pregnancy. After an exploratory analysis, the variables related to a positive outcome were identified in a univariate and multivariate regression analysis. Groups were compared according to the administration or not of DYD. The distribution of P4 values in the sample and variables associated with this variation was evaluated.

Results: 679 FET cycles were analyzed, of which 181 (26.7%) undergone treatment with DYD and 498 (73.3%) had the usual treatment. There were 437 pregnancies (64.4%: 64,9% without DYD and 63% with DYD). Of these 292 (43% of the total) were from ongoing pregnancies (44,0% without DYD and 40,9% with DYD).

The progesterone values could be modeled by a gamma distribution, with a mean of 14.4 ng/ml and a standard deviation of 4.6 ng/ml. Through a gamma regression model, it was found that the variables age on the day of FET ($p<0.05$), ethnicity ($p<0.01$), weight ($p<0.001$) and height ($p<0.05$) help to explain the variation in progesterone.

In a multivariate, it was found that age at egg collection ($p<0.01$), endometrial thickness ($p<0.001$), day of transfer ($p<0.001$) and number of embryos transferred ($p<0.05$) were related to the final outcome. There were no differences in the results between cycles with or without the use of DYD.

Conclusions: The woman's age at the time of transfer, ethnicity, and weight may help explain variations in observed progesterone values. The endometrial measurement, the day of arrival at the blastocyst and the number of embryos transferred were positively related to the possibility of an ongoing pregnancy. The ongoing pregnancy rate was not different whether or not DYD was used.

Keywords: Dydrogesterone; Frozen embryo transfer; Artificial cycle; ART outcome; Luteal phase

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	7
1.1	Contexto global.....	7
1.2	FIV/ICSI	7
1.3	Implantação.....	9
1.4	Transferência de Embriões Congelados.....	10
1.5	Didrogesterona	13
1.6	Motivo e objetivo do estudo.....	13
1.7	Organização da Tese	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1	Critérios de inclusão:	16
2.2	Variáveis	17
2.2.1	Variáveis dependentes.....	17
2.2.2	Variáveis independentes	17
2.3	Protocolo de preparação endometrial	19
2.4	Análise estatística	20
2.4.1	Análise exploratória:	20
2.4.2	Métodos estatísticos:	21
3	RESULTADOS	31
3.1	Avaliação inicial dos dados.....	31
3.2	Avaliação sumária dos dados.....	31
3.3	Matriz de correlações	36
3.4	Fatores que influenciam valor de progesterona:.....	40

3.5	Análise Univariada para o desfecho final- gravidez evolutiva:	44
3.6	Estimação de um Modelo Multivariado para determinação de gravidez evolutiva	47
3.7	Análise de sensibilidade para os valores de progesterona.....	50
3.8	Comparação dos resultados entre pacientes que utilizaram ou não utilizaram didrogesterona.....	52
3.8.1	Sub-grupo de progesterona 10-12.5 ng(dl):	56
4	DISCUSSÃO	63
4.1	Considerações iniciais.....	63
4.2	Análise global dos dados - Gravidez evolutiva	64
4.3	Variação nos níveis de progesterona	65
4.4	Comparação dos resultados entre ciclos com e sem didrogesterona adicionada	66
4.5	Considerações finais.....	69
5	CONCLUSÕES.....	71
6	BIBLIOGRAFIA.....	72

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de variáveis analisadas.....	17
Tabela 2 - Distribuição das variáveis contínuas	32
Tabela 3 - Distribuição das variáveis categóricas	34
Tabela 4 - Distribuição das variáveis categóricas reclassificadas	35
Tabela 5- Matriz de Correlações- variáveis contínuas	37
Tabela 6- Matriz de correlações II	38
Tabela 7- Resultado da regressão gama: fatores que influenciam o valor de progesterona	43
Tabela 8- Análise Univariada para o desfecho final- gravidez evolutiva- comparação entre variáveis contínuas.....	44
Tabela 9 - Análise Univariada para o desfecho final- gravidez evolutiva- comparação entre variáveis categóricas (Teste Qui-quadrado)	45
Tabela 10- Resultado da estimação do Modelo Multivariado para determinação de gravidez evolutiva	49
Tabela 11 - Resultados observados de acordo com o valor de progesterona no dia da TEC	51
Tabela 12 - Comparação entre os grupo com e sem adição de didrogesterona. Teste Qui-quadrado.....	52
Tabela 13 - Comparação dos resultados entre pacientes que utilizaram ou não utilizaram didrogesterona- variáveis contínuas (Teste t-Student).	54
Tabela 14 - Comparação entre pacientes que utilizaram ou não utilizaram didrogesterona- variáveis categóricas (teste de Qui-Quadrado).	54
Tabela 15 - Comparação entre o grupo com progesterona [10.5.12.8[e os restantes (teste de Qui-quadrado).....	56
Tabela 16 - Resultados comparativos entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5 ng/ml[(teste de Qui-Quadrado)	58
Tabela 17- Comparação entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5[ng/ml, variáveis quantitativas (teste de t de Student)	59

Tabela 18 - Comparação das gravidezes entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5[ng/ml, variáveis qualitativas (teste Qui-Quadrado)	59
Tabela 19 - Resultados comparativos das gravidezes entre pacientes que utilizaram Didrogesterona de acordo com o valor de progesterona (teste Qui-Quadrado).....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Variação dos níveis estradiol relativamente ao pico de LH num ciclo natural, sem gravidez.	10
Figura 2 - Variação dos níveis de progesterona relativamente ao pico de LH, num ciclo natural, sem gravidez	10
Figura 3 - Resultados globais	31
Figura 4- Histograma com a distribuição observada da idade da Mulher na colheita.....	32
Figura 5- Boxplot e histograma com a distribuição do valor da progesterona do dia da colheita	33
Figura 6- Distribuição da idade das mulheres no dia da colheita- boxplot e sub-classificação da variável	36
Figura 7- Boxplot com o nº ovúlos recolhidos, utilizados e nº de embriões obtidos (2PN).....	39
Figura 8 Relação entre a idade da mulher na colheita e o nº de ovócitos obtidos	40
Figura 9A- Gráfico de resíduos contra valores ajustados e resíduos padronizados contra valores preditos:	42
Figura 10 - Variação do nível de progesterona de acordo com o peso e a etnia	43
Figura 11- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com o dia de chegada a blastocisto.....	46
Figura 12- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com o nº de embriões transferidos	47
Figura 13- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com a classe etária da colheita.....	47
Figura 14- Figura 9B- Gráfico mostrando os valores efetivamente influentes.....	49
Figura 15- Relação entre a idade, o nº de embriões transferidos, o dia de chegada a blastocisto e a taxa de gravidez evolutiva.....	50
Figura 16- Distribuição dos valores de progesterona de acordo com a segmentação por 5 percentis...	51
Figura 17- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com o valor de progesterona no dia da TEC.....	52
Figura 18- Comparação de ciclos com ou sem uso de didrogesteron.....	53
Figura 19- Comparação das taxas de gravidez evolutiva entre o grupo com progesterona [10.5.12.8[e os restantes (teste de Qui-quadrado)	57
Figura 20- Comparação entre o grupo com e sem uso de didrogesteron no intervalo [10.12.5[ng/ml	58
Figura 21- Resultados comparativos entre pacientes que utilizaram Didrogesteron de acordo com o valor de P4.....	62

SIGLAS

2PN	2 pronúcleos (óvulo fecundado)
CIRMA	Centro de Infertilidade Reprodução Medicamente Assistida
DYD	Didrogesterona
FIV	Fertilização in Vitro
FIV/ICSI	Conjunto de técnicas de procriação medicamente assistida que incluem quer a fertilização <i>in vitro</i> clássica quer a injeção intra-citoplasmática de espermatozoides
FET	Frozen Embryo Transfer
ICSI	Injeção Intra-citoplasmática
IM	Intra-muscular
LH	Hormona luteotrópica- luteotropina
OMS ou WHO	Organização Mundial de Saúde
OR	<i>Odds Ratio</i> - Razão de chances
P4	Progesterona
PMA	Procriação Medicamente Assistida
TEC	Transferência de Embriões congelados
WHO	Organização Mundial de Saúde

1.1 Contexto global

Infertilidade é definida pela OMS como a incapacidade de conseguir uma gravidez no espaço de 12 meses [1]. Estima-se que um em cada seis casais pode ter alguma dificuldade em conseguir uma gravidez e que na Comunidade Europeia mais de 25 milhões de pessoas podem ser afetadas por esta situação [2].

As causas para este problema são diversas e há uma vasta panóplia de tratamentos que estão disponíveis. Entre estes existem as técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA), entre as quais se inclui a fertilização *in vitro* (FIV/ICSI). O primeiro tratamento com sucesso realizou-se em 1978. Desde então as indicações, as técnicas e os materiais que permitem a realização destes procedimentos evoluíram de forma marcada. Na Europa o número de tratamentos com recurso a esta técnica tem aumentado nos últimos anos. O último registo europeu, publicado em 2021 e reportando ao ano de 2017, revela um total de cerca de 473 000 ciclos de FIV/ICSI [3]. O panorama em Portugal não é diferente, verificando-se que em 2018 foram iniciados mais de 7000 ciclos de FIV/ICSI. Nesse mesmo ano, como resultado do uso de várias técnicas de PMA nasceram em Portugal 2733 crianças-3.1% do total nacional. Este número contrasta com 2.5% em 2013 [4].

1.2 FIV/ICSI

A história deste tipo de procedimentos remonta às primeiras décadas do século XX [5], com diversas tentativas de fecundação de ovócitos *in vitro*. Em 1932 é publicado o romance de Aldous Huxley "Admirável Mundo Novo" onde se prevê que a Reprodução Humana possa ser conseguida totalmente com técnicas de reprodução assistida, muitas delas descritas de forma semelhante ao que se realiza atualmente. No entanto, apenas em

1978 se consegue o primeiro parto em seres humanos, resultante de um embrião conseguido após recolha de um ovócito que foi incubado com espermatozoides [6]. Nesta altura o tipo de medicação, o seguimento das pacientes, os meios de cultura e a tecnologia disponível eram muito rudimentares e as taxas de sucesso na época eram baixas.

Nos últimos 40 anos verificou-se uma evolução importante nesta área, resultado do aparecimento de novos fármacos, novas técnicas e novas estufas. Do conjunto global de inovações destaca-se a da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e dos métodos de congelação de embriões, sobretudo com o advento da vitrificação. O desenvolvimento farmacológico permitiu uma estimulação multifolicular mais segura e previsível, bem como o surgimento de fármacos bloqueadores hipofisários que permitem inibir a ovulação. Deste modo é possível hoje conseguirem-se estimulações que permitam a recolha de uma maior quantidade de óvulos e de uma forma mais segura [5].

Um ciclo de FIV/ICSI pode dividir-se em duas etapas. Numa primeira fase há uma estimulação hormonal que permite um recrutamento folicular aumentado a nível ovárico, que procura ser maximizado em função da idade e da reserva ovárica disponível. Através do uso de medicação específica o processo de maturação final dos ovócitos é inibido para evitar uma ovulação prematura. Quando os folículos atingem um tamanho adequado é desencadeado de forma farmacológica o processo de maturação final dos ovócitos. Estes serão recolhidos geralmente por via transvaginal e de forma ecoguiada. Os óvulos recolhidos podem ser utilizados de imediato ou congelados e utilizados posteriormente.

Independentemente do recurso a óvulos frescos ou congelados estes são incubados (FIV) ou inseminados (ICSI) com espermatozoides e cultivados. Nos dias seguintes os embriões resultantes permanecem em estufa e poderão ser transferidos, habitualmente entre o 3º e 5º dia de evolução. A transferência designa-se a fresco quando é realizada nesta fase, mas por outro lado pode optar-se por não transferir de imediato o embrião, sendo este congelado.

São vários os motivos que levam à não transferência a fresco de um embrião, onde se incluem: existência de embriões sobranes/excedentários, má condição endometrial para transferência de embriões a fresco, motivos sociais. Por outro lado, com esta estratégia é possível evitar o impacto negativo dos níveis suprafisiológicos hormonais que ocorrem durante a estimulação ovárica e reduzir o risco de síndrome de hiperestimulação [7]. É importante realçar ainda que as recentes evoluções no âmbito da biópsia

embrionária, tornaram populares e frequentes as técnicas de diagnóstico genético pré-implantatório [8] que implicam quase sempre transferências diferidas.

1.3 Implantação

Para a ocorrência de implantação são necessárias um conjunto de adaptações do útero. Parte destas alterações são mediadas pelo efeito da progesterona (P4). De acordo com a teoria da janela de implantação endometrial [9], existe um período ótimo para a implantação embrionária, que se encontra entre o 19º ou 20º dia do ciclo menstrual e dura 4 a 5 dias (Lessey, 2011), ou seja, 5 a 9 dias após a ovulação, a meio da fase lútea e secretora [10].

Nos ciclos naturais, inicialmente tanto os valores de estradiol como os de progesterona são baixos. Na primeira fase, fase folicular, verifica-se um aumento gradual nos níveis de estradiol. Após uma subida abrupta nos níveis de estradiol verifica-se um aumento súbito da Hormona Luteotrópica (LH), que irá desencadear o processo de ovulação. Após a ovulação inicia-se a produção de progesterona pelo corpo lúteo. Inicialmente verifica-se um aumento gradual até atingir uma fase de *plateau* quatro a cinco dias depois. Nesta altura o valor adequado de progesterona produzido pelo corpo lúteo parece rondar os 10 ng/mL [11], [12]. Se não se verificar gravidez inicia-se uma queda destes valores cerca de 9 a 10 dias após a ovulação [13] (Figura 1 e 2). No entanto, a sua duração poderá ser variável de forma inter e intracíclica, após cada menstruação [9]. De acordo com o conceito de janela de implantação e considerando uma variabilidade possível nos valores de progesterona sérica, transferir um embrião fora desses valores, poderá corresponder a uma assincronia entre o desenvolvimento endometrial e embrionário, diminuindo as taxas de implantação [14] [15] [16]. Assim, valores de progesterona baixos poderão atrasar a janela de implantação, ao passo que valores elevados poderão adiantá-la, afastando a data da transferência do período ótimo para a implantação embrionária. Para o primeiro caso, poderá considerar-se a suplementação com progesterona, cuja formulação e dose ideal fogem ao âmbito deste estudo, no segundo, a resolução poderá passar pela diminuição da dose de progesterona em curso.

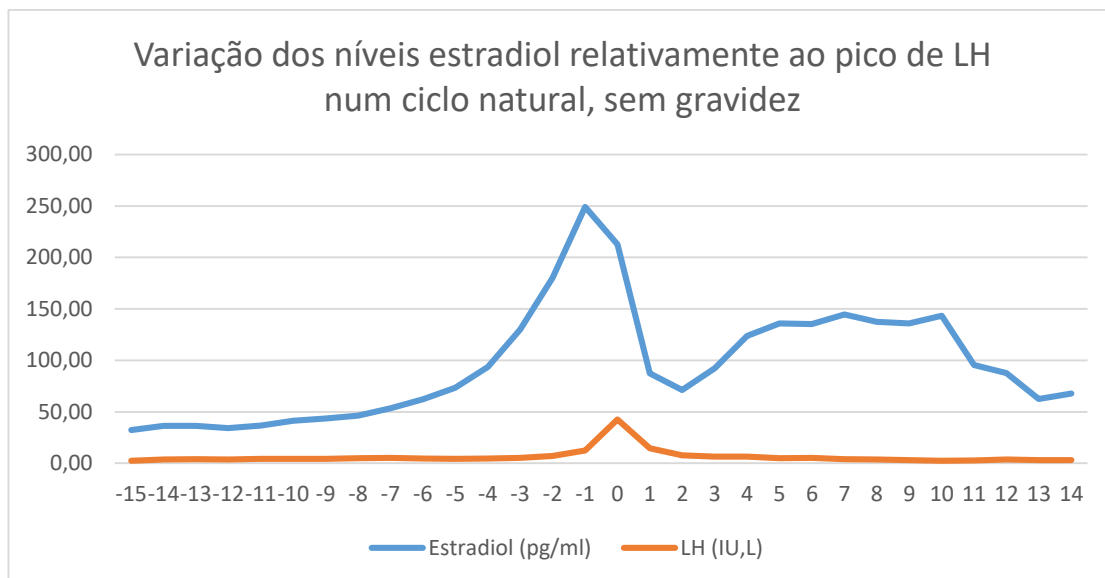


Figura 1 - Variação dos níveis estradiol relativamente ao pico de LH num ciclo natural, sem gravidez. [17]

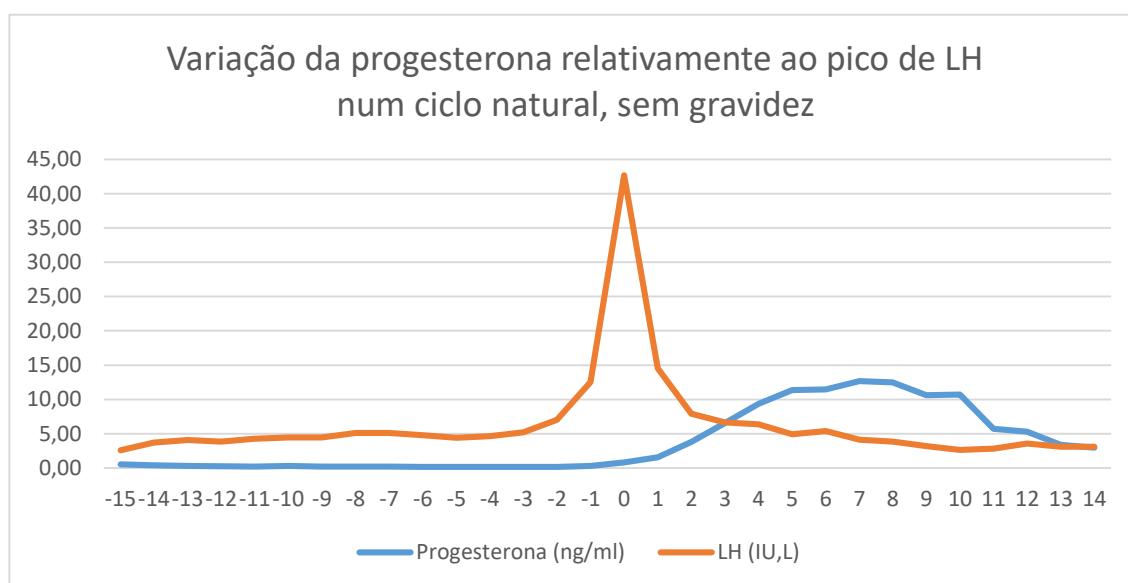


Figura 2 - Variação dos níveis de progesterona relativamente ao pico de LH, num ciclo natural, sem gravidez

1.4 Transferência de Embriões Congelados

À semelhança do que tem acontecido com o número de ciclos de FIV/ICSI, também o número de transferências de embriões congelados (TEC) tem aumentado, verificando-se que só em 2017 foram reportados no universo europeu mais de 270 000

ciclos [3], com taxas de gravidez de cerca de 30.2% no caso de óvulos próprios comparativamente com 41.1% no caso de óvulos provenientes de programas de doação de óvulos heterólogos. No contexto nacional e relativamente a 2018 verificaram-se mais de 2600 transferências de embriões congelados resultantes de óvulos próprios e mais de 800 transferências resultantes de programas de doação de óvulos [4].

Considerando o número de ciclos realizados tem havido uma atenção crescente no que respeita à preparação endometrial para a transferência de embriões congelados ou de embriões frescos que resultem de ciclos de doação de óvulos, onde a sincronia natural entre o endométrio e o estado de desenvolvimento embrionário são mais difíceis. Neste contexto, são várias as opções disponíveis.

A preparação endometrial nas TEC pode ser conseguida num ciclo natural, natural modificado ou artificial, não tendo sido reportadas até a data, diferenças significativas nas taxas de gravidez clínica e de recém-nascido vivo entre os três tipos de ciclo [18], [19].

Num ciclo natural ou natural modificado procura-se seguir o desenvolvimento de um folículo até à ovulação. Durante este período há um aumento gradual dos níveis de estradiol (Figura 1). A ovulação pode ser conseguida naturalmente ou desencadeada farmacologicamente, nas figuras surge representada como o pico de LH. Após este pico hormonal e passadas cerca de 24 horas verifica-se um aumento progressivo dos níveis de progesterona que daqui em diante será produzida pelo corpo lúteo (a estrutura que se origina após a ovulação). A transferência embrionária será realizada em função da altura prevista para a ovulação e o tempo de desenvolvimento do embrião. Na prática há uma variação hormonal diária durante o ciclo.

Em alternativa existem os ciclos artificiais. Neste tipo de tratamento, habitualmente após uma menstruação espontânea ou programada, há uma suplementação exógena de estradiol na primeira fase, e, posteriormente é adicionada suplementação com progesterona, uma vez que não existe ovulação e por isso um corpo lúteo endógeno. Habitualmente, a administração de estrogénios é iniciada ao 2º ou 3º dia do ciclo menstrual e a progesterona exógena é introduzida assim que o endométrio atinge uma espessura de 7mm, [20]. No caso de gravidez, a progesterona exógena é mantida até pelo menos até à 7ª-9ª semana de gestação, altura em que a produção de progesterona placentar substitui a produzida pelo corpo lúteo [21], [22]. Neste tipo de tratamento o grau de flutuação hormonal é pequeno, uma vez que rapidamente, após o início da medicação, são atingidos valores hormonais estáveis [23], [24] .

Apesar de publicações recentes sugerirem que há benefícios favoráveis aos ciclos naturais ou naturais modificados, nos quais existe um corpo lúteo, com uma diminuição de doença hipertensiva na gravidez e diminuição no número de recém nascidos macrossômicos [25], [26], o ciclo artificial, hormono-substituído, tem sido o mais frequentemente utilizado. São várias as vantagens associadas a este tipo de tratamento, sobretudo pela maior facilidade de programação e pelo maior controle da exposição à progesterona exógena [9].

A receptividade endometrial parece estar relacionada com o tempo e dose de exposição à progesterona, após exposição estrogénica adequada, sendo que a progesterona é essencial para a implantação do embrião e evolução da gravidez [27]. A progesterona exógena pode ser administrada via oral, vaginal, subcutânea (SC) ou intramuscular (IM). As vias de administração vaginal e IM foram as mais estudadas, sem que nenhuma demonstrasse superioridade em relação à outra [28]. No entanto, a via vaginal é frequentemente preferida nos tratamentos de PMA por evitar injeções e os efeitos secundários associados à via IM [29]. Recentemente, a via oral tem sido estudada como alternativa, não inferior às anteriores, nos países em que a sua formulação está disponível [29], [30].

Recentemente foram publicados diversos estudos retrospectivos e prospetivos que demonstram uma associação negativa entre níveis baixos de progesterona sérica no dia da transferência embrionária e o resultado final, seja ele gravidez ou parto [15], [16], [31], [32], [33], [34]. Outro aspeto importante relaciona-se com a absorção e metabolização da progesterona vaginal que pode variar entre diferentes pacientes [15], [23], [31].

De acordo com Gaggiotti-Marre *et al.* [35], num estudo que envolveu 244 TECs em ciclos substituídos, com transferência de um embrião euploide, em que os valores de progesterona foram medidos na véspera da transferência, pacientes com valores de P4 no 1º quartil (<8.1 ng/mL) tiveram taxas de parto inferiores (41% versus 54-65% nos outros quartis, com $p<0.05$). Outro estudo prospetivo observacional, realizado em recetoras de embriões de doação de ovócitos, concluiu que um valor de P4 <9.2 ng/mL no dia da TEC, está associado a diminuição da taxa de gravidez evolutiva [36]. Outro estudo publicado pelo mesmo grupo englobando 1205 pacientes concluiu que pacientes com valores de progesterona inferiores a 8.8ng/ml (valor correspondente ao percentil 30 da amostra) tinham uma taxa de recém nascido vivo significativamente inferior [37].

Por outro lado, ainda que de forma menos consistente, há outros estudos que reportam que níveis elevados de progesterona também parecem estar associados a piores resultados [14], [38]. Neste trabalho focamos apenas nos níveis baixos. É importante referir que se verifica uma variação tanto nas dosagens como na forma de administração dos fármacos, o que dificulta comparações, quando tentamos agrupar estudos diferentes.

1.5 Didrogesterona

A didrogesterona (DYD) é um progestativo sintético desenvolvido na década de 1950 e comercializado desde 1961. É um fármaco administrado por via oral e apesar de ter uma bioatividade inferior a 10% após primeira passagem hepática é ainda mais ativa que a progesterona micronizada oral [39] e com uma alta especificidade para o recetor da progesterona [40]. Tem uma atividade progestagénica muito seletiva, sem atividade androgénica, glicocorticoide ou estrogénica [40]. Deste modo pode ser utilizada em doses menores e com menos efeitos secundários [29]. O metabolito ativo é o 20-alfa-dihidrodidrogesterona, que tem uma semivida de cerca de 17 horas. Infelizmente, esta é uma substância difícil de dosear na prática clínica.

No âmbito da PMA este fármaco mostrou-se uma boa alternativa quando utilizado em ciclos com transferência de embriões a fresco [41], [30].

Relativamente a questões de segurança, uma revisão sistemática [42] sobre a eficácia e segurança da DYD oral comparativamente à progesterona vaginal micronizadas como suporte de fase lútea mostrou uma incidência de alterações congénitas, familiares e genéticas semelhantes em ambos os grupos [43].

1.6 Motivo e objetivo do estudo

De acordo com dados da literatura mais recente parece claro que nos ciclos artificiais para preparação endometrial para TEC os resultados são piores nos casos em que os valores de progesterona são menores.

No Centro de Infertilidade e Procriação Medicamente Assistida de Almada (CIRMA), foi realizado um estudo prospetivo entre Maio de 2019 e Junho de 2020, em que se verificou uma forte tendência para resultados piores no grupo de pacientes com

progesterona mais baixa [44]. Por motivos éticos o estudo foi interrompido prematuramente após uma análise interina e após avaliação de publicações recentes à época. Na altura considerou-se que pacientes com níveis de progesterona baixos no dia da TEC poderiam beneficiar de uma estratégia que melhorasse o seu prognóstico. Optou-se por adicionar progesterona oral e a escolha da dose baseou-se nos resultados de 2 estudos [30] [45]. Nestes, uma dose DYD 20mg/dia pareceu insuficiente como suporte de fase lútea, quando utilizada de forma isolada, enquanto que uma dose de 40mg/dia pareceu não ser inferior ao regime habitual de progesterona vaginal. Atendendo à segurança deste fármaco em termos de dosagem e pela facilidade de administração adicionou-se à medicação em curso 10 mg de DYD de forma tri-diária nos ciclos com progesterona baixa. Inicialmente o valor de corte para a decisão foi 10 ng/ml plasmático. No entanto, uma vez que os resultados neste grupo pareceram promissores, cerca de 1 ano depois o valor de corte para administrar DYD subiu para 12.5 ng/ml, correspondente ao percentil 25-30 dos valores de distribuição de progesterona plasmática no centro.

Considerando uma amostra dos ciclos realizados no centro, procurou-se identificar quais as variáveis que influenciam o valor de progesterona plasmática no dia da TEC, quais as variáveis que estão associadas a uma gravidez evolutiva e se há diferenças na taxa de gravidez evolutiva entre pacientes com valores de progesterona baixa suplementados com DYD comparativamente com ciclos com valores considerados normais. A resposta a estas questões tem uma importância extrema, uma vez que por um lado poderá permitir conseguir melhores resultados nos ciclos TEC medicados, com valores de progesterona mais baixos de uma forma relativamente simples, barata e com baixo risco. Ao determinar a forma da distribuição dos valores de progesterona de uma amostra da população deste centro será possível comparar dados com outras populações. Por outro lado, poderá ser possível prever quais são as pacientes que terão níveis de progesterona plasmática baixos.

1.7 Organização da Tese

A apresentação da tese foi organizada em diversas etapas.

Inicialmente será descrita a metodologia e os dados; onde se descreve a origem da amostra e os critérios de inclusão e exclusão utilizados. As variáveis dependentes consideradas são gravidez bioquímica, gravidez evolutiva e progesterona. São apresentadas de seguida as variáveis independentes. Será descrito todo o protocolo de

preparação endometrial e de preparação dos embriões para a transferência. Do ponto de vista analítico, inicialmente será feita uma análise exploratória dos dados e descritos os métodos estatísticos utilizados.

Quanto aos resultados, inicialmente fez-se uma avaliação global dos dados onde se avaliaram as taxas de gravidez bioquímica, gravidez evolutiva e de aborto. Seguidamente será feita uma avaliação sumária dos dados, considerando variáveis contínuas e categóricas, bem como uma matriz de correlações entre as diferentes variáveis. Serão identificadas quais as variáveis que influenciam o valor de progesterona plasmática e quais as variáveis que poderão ter impacto na taxa de gravidez evolutiva, primeiro recorrendo a uma avaliação univariada e depois através da estimação de um Modelo de Análise Multivariado. Finalmente serão comparadas as taxas de gravidez evolutiva entre ciclos com valores de progesterona plasmática considerados baixos que foram suplementados com DYD com os ciclos com valores de progesterona considerados normais. Esta etapa será precedida de uma avaliação comparativa da taxa de gravidez evolutiva de acordo com diversos percentis de distribuição dos valores de progesterona.

A discussão irá resumir os principais resultados obtidos e comparar com outros trabalhos semelhantes procurando encontrar aspetos concordantes e justificar uma plausibilidade biológica. Terminará com alguns argumentos críticos à tese e perspectivas futuras.

No final, será apresentada uma conclusão que procura de forma resumida responder às questões iniciais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O objetivo do trabalho foi verificar se a taxa de gravidez evolutiva nos ciclos em que se observaram valores de progesterona plasmática baixos e que foram subsequentemente suplementados com DYD foram semelhantes aos resultados dos ciclos com valores de progesterona considerados normais.

Por outro lado, procurou-se avaliar a distribuição dos valores de progesterona na amostra e se variáveis como o peso, o índice de massa corporal (IMC), a idade ou a etnia da mulher podem influenciar os valores séricos de progesterona.

Para isso foi desenhado um estudo observacional, retrospectivo de transferências de embriões congelados realizadas no CIRMA em ciclo substituído, no período de 1 de Julho de 2019 a 31 Março de 2022.

2.1 Critérios de inclusão:

Foram incluídos todos os ciclos de pacientes que realizaram transferência de embriões congelados obtidos em FIV/ICSI, com idades compreendidas entre 18 e os 39 anos no dia da punção. Todos os embriões foram transferidos em ciclo hormono-substituído (1 ou 2 blastocistos- embriões que se desenvolveram até ao 5º ou 6º dia pós fecundação), com grau de expansão igual ou superior a 2 e grau 1 ou 2 na massa celular interna e trofoectoderme [46].

Foram excluídas as pacientes com endométrio menor que 7 mm previamente à administração de progesterona, pacientes com patologia endocavitária ou com deformação da mesma, pacientes com anomalia mulleriana não corrigida ou que tenham obtido um valor de progesterona não compatível com uma fase lútea (inferior a 3ng/ml) no dia da transferência.

2.2 Variáveis

2.2.1 Variáveis dependentes

As variáveis de interesse são gravidez bioquímica, gravidez evolutiva e valor de progesterona plasmática no dia da TEC. As duas primeiras são variáveis binárias (definidas como positiva ou negativa). Considerou-se gravidez bioquímica todas as gravidezes com valor sérico de β -HCG > 10 UI/l, e gravidez evolutiva todas as gravidezes que ultrapassaram as 10 semanas de gestação, com batimentos cardíacos confirmados. Consideraram-se abortos todas as gravidezes bioquímicas que não tiveram uma ecografia compatível com gravidez evolutiva depois das 10 semanas.

A outra variável dependente é o valor de progesterona no dia da transferência embrionária. Dada a sua importância nestes processos serão identificados fatores associados à sua variação,.

2.2.2 Variáveis independentes

As variáveis explicativas escolhidas são referentes a características dos progenitores, aos ciclos de FIV/ICSI que deram origem aos embriões que foram transferidos e aos próprios ciclos de transferência de embriões congelados:

Tabela 1 - Lista de variáveis analisadas

Nome	Tipo	Descrição
Idade mulher na punção	Contínua	Idade da mulher em anos no dia da punção
Idade da mulher na TEC	Contínua	Idade da mulher em anos no dia da TEC
Idade do homem na punção	Contínua	Idade do homem em anos no dia da punção
IMC mulher	Contínua	Índice de massa corporal da mulher no dia da punção
Peso Mulher	Contínua	Peso da mulher em Kg no dia da punção

Nome	Tipo	Descrição
IMC homem	Contínua	Índice de massa corporal da mulher no dia da punção
Dose de gonadotrofinas	Contínua	Dose de gonadotrofinas utilizadas no ciclo FIV/ICSI
Número de Ovócitos	Contínua	Número de ovócitos obtidos na punção
Número de 2PN	Contínua	Número de óvulos fecundados normalmente- 2PN
Espessura endometrial	Contínua	Última espessura endometrial medida antes da TEC em mm
Valor de Progesterona	Contínua	Valor da progesterona no dia da TEC em ng/ml
Hábitos tabágicos Mulher	Categórica	Hábitos tabágicos da mulher: nunca; antigos ou presentes
Hábitos tabágicos Homem	Categórica	Hábitos tabágicos do homem: nunca; antigos ou presentes
Etnia Mulher	Categórica	Asiática; caucasiana; cigana; indiana; negra; mista-caucasiana-africana; mista caucasiana-asiática; mista-outra;
Etnia Homem	Categórica	Asiática; caucasiana; cigana; indiana; negra; mista-caucasiana-africana; mista caucasiana-asiática; mista-outra;
Fator de infertilidade	Categórica	Motivo para tratamento: tubário; endometriose; ovulatório; múltiplos só femininos; masculino; azoospermia; feminino + masculino; idiopático; Outro

Nome	Tipo	Descrição
Nº de embriões transferidos	Dicotómica	Número de embriões transferidos: 1 ou 2
Dia de desenvolvimento embrionário	Dicotómica	Dia de transferência embrionária: 5º ou 6º dia
Mulher com filhos	Dicotómica	Sim; Não
Homem com filhos	Dicotómica	Sim; Não
Ciclo diferido	Dicotómica	Se o ciclo teve transferência de embriões a fresco: Sim; Não
Ordem da TEC	Categórica	Ordem da transferência
Didrogesterona	Dicotómica	Medicação com didrogesterona

2.3 Protocolo de preparação endometrial

No 2º ou 3º dia de um ciclo menstrual espontâneo, pós-progestativo ou pós-pílula, a paciente iniciou a aplicação de estradiol (Zumenon®, Bayer Portugal, SA, Portugal) na dose de 2mg de 12/12h por via vaginal. Foi realizado controlo ecográfico 10 a 20 dias depois. Após verificação de uma espessura endometrial acima de 7 mm, as pacientes iniciaram a administração de progesterona por via vaginal (Progeffik®, Laboratórios Effik, Portugal) na dose de 400 mg de 12/12h.

A transferência de embriões foi realizada após a 11ª administração de progesterona. Na manhã da transferência, foi feito novo doseamento de progesterona.

Os embriões, num máximo de 2, previamente vitrificados num suporte Cryotop® (Kitazato, Japan), foram desvitrificados segundo o seguinte protocolo: o Cryotop® é removido do azoto líquido e imediatamente submerso em 300µl de *Thawing solution* (TS) (Kitazato, Japan), previamente aquecidos a 37°C. Após 1 minuto, os embriões foram transferidos para uma gota de 60µl de *Diluent solution* (DS) (Kitazato, Japan) durante 3

minutos à temperatura ambiente. Finalmente, foram colocados numa gota 60µl de *Washing solution* (WS) (Kitazato, Japan) durante 5 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente lavados durante 1 minuto numa outra gota de 60 µl de WS à temperatura ambiente. Depois foram transferidos, individualmente, para gotas de 30µl de *Sequential Blast®* medium (ORIGIO, Denmark) cobertas com Liquid Paraffin (ORIGIO, Denmark) onde permaneceram durante pelo menos 2 horas antes da transferência.

As transferências de embriões foram rotineiramente realizadas sob controlo ecográfico. Após colocação de espéculo metálico e remoção da progesterona cervical com compressa, foi introduzido o cateter (Cook® ou Wallace®) até passar o meio da cavidade endometrial, onde se depositaram os embriões. Foram transferidos 1 ou 2 blastocistos e o teste de β -HCG foi realizado 9 a 12 dias após a transferência. Em caso de gravidez, o estradiol e a progesterona eram mantidos até à 10^a-12^a semana de gravidez.

De acordo com o período de estudo sempre que os valores de progesterona estaveram abaixo do nível de corte à época (10 ou 12.5 ng/ml), foi iniciada medicação com 10 mg de didrogesterona (Didrogesterona®, BGP products, Portugal) tri-diário. Nestes casos esta medicação foi mantida até pelo menos 8 semanas de gravidez

Os doseamentos hormonais de progesterona e β -HCG foram efetuados em amostra de soro. A metodologia utilizada foi a de Eletroquimioluminescência (ECLIA) e utilizou-se o equipamento Modular EVO (E170) *Roche Diagnostics®*. O método de doseamento da β -HCG baseou-se em reação imunológica tipo *sandwich* e o da progesterona em reação imunológica competitiva.

2.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com recurso aso programas IBM® SPSS® statistics v22.0 e R 4.2.2 for windows.

2.4.1 Análise exploratória:

Foi feita uma análise exploratória inicial através de frequências absolutas, relativas, valor médio, desvio padrão e mediana das variáveis estudadas e intervalo inter-quartil das variáveis contínuas. Fez-se uma matriz de correlações entre as diferentes variáveis analisadas. Quando adequado as variáveis categóricas foram reclassificadas e variáveis contínuas foram categorizadas.

2.4.2 Métodos estatísticos:

2.4.2.1 Normalidade das variáveis da amostra

Para avaliar se os dados respeitantes a cada variável contínua X incluída no estudo indicam a normalidade da mesma utilizou-se o Teste de Shapiro-Wilk [47].

As hipóteses a testar são:

H0: a amostra de X provém de uma distribuição normal $N(\mu, \sigma^2)$

H1: a amostra de X não provém de uma distribuição normal $N(\mu, \sigma^2)$

Este teste é baseado na estatística W dada por:

$$W = \frac{b^2}{\sum_{i=1}^n (x_{(i)} - \bar{x})^2}$$

em que $x_{(i)}$ são os valores observados ordenados da variável. A constante b é determinada da seguinte forma:

$$b = \begin{cases} \sum_{i=1}^{n/2} a_{n-i+1} \times (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) & \text{se } n \text{ é par} \\ \sum_{i=1}^{(n+1)/2} a_{n-i+1} \times (x_{(n-i+1)} - x_{(i)}) & \text{se } n \text{ é ímpar} \end{cases}$$

em que a_{n-i+1} são constantes geradas pelas médias, variâncias e covariâncias das estatísticas de ordem de uma amostra de tamanho n de uma distribuição Normal. Os seus valores, podem ser consultados em Tabelas próprias.

Para um nível de significância α (usualmente 5% ou 1%), rejeita-se H0 se $W_{\text{observado}} < W_{\text{crítico}}$ ou se $p < \alpha$ onde p representa o p-value p do teste.

2.4.2.2 Teste T para duas amostras independentes

Para comparar a distribuição das variáveis com distribuição normal utilizou-se o teste de T [48]. Este teste testa a igualdade de médias de duas populações ou grupos, desde que estejam verificados os seguintes pressupostos:

- os dados são independentes

- a variável a comparar segue uma distribuição normal

As hipóteses a testar são:

H0: Média de grupo 1 = Média de grupo 2 ou seja não há diferenças entre a média dos dois grupos.

H1: Média de grupo 1 $\neq$ Média de grupo 2 ou seja há diferenças entre a média dos dois grupos.

Para grupos de tamanhos diferentes, com variâncias iguais, a estatística de teste sob H0 é dada por:

$$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1 X_2} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Onde $S_{X_1 X_2} = \sqrt{\frac{(n_1-1)S_1^2 + (n_2-1)S_2^2}{(n_1+n_2-2)}}$, S_1^2 e S_2^2 são variâncias amostrais de cada grupo

O número de graus de liberdade associado a esta estatística é de n_1+n_2-2 , que sob H0 segue uma distribuição de T-student

Para tamanhos diferentes, com variâncias diferentes, a estatística de teste é dada por:

$$T = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}}$$

onde $S_{\bar{X}_1 - \bar{X}_2} = \sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}$

o número de graus de liberdade associados à estatística de teste é:

$$\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{S_1^2}{n_1}\right)^2}{(n_1-1)} + \frac{\left(\frac{S_2^2}{n_2}\right)^2}{(n_2-1)}}$$

Para avaliar a homogeneidade das variâncias utilizou-se o Teste de Levene.

2.4.2.3 Teste de Levene [49]

As hipóteses a testar são:

H0: As variâncias populacionais são iguais entre grupos

H1: As variâncias populacionais não são iguais entre grupos

A estatística de teste pode ser dada por:

$$W = \frac{(N-k)}{(k-1)} \cdot \frac{\sum_{i=1}^k N_i (Z_{i.} - Z_{..})^2}{\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} N_i (Z_{ij} - Z_{i.})^2},$$

k= n° de grupos diferentes aos quais os casos amostrados pertencem

N_i= n° de casos i-ésimo grupo

N = n° total de casos em todos os grupos

x_{ij} = valor da variável medida para o j-ésimo caso do i-ésimo grupo

z_{ij} = |X_{ij} - $\bar{X}_i$ |, $\bar{X}_i$ é a média do grupo i

A estatística do teste W, sob H0, é aproximadamente distribuída F com (k-1) e (N-k) graus de liberdade, testado contra F(1- α ; k-1, N-k), onde F é um quantil da distribuição F, com (k-1) e (N-k) graus de liberdade e α é o nível de significância escolhido (geralmente 0.05 ou 0.01).

2.4.2.4 Teste de Qui-Quadrado para variáveis categóricas

O teste de Qui-Quadrado é um teste não paramétrico que avalia a associação entre variáveis qualitativas [50].

Considere-se que as variáveis a testar, digamos X e Y, têm *a* e *b* níveis, respetivamente. Considere-se a Tabela de contingência relativa à forma como as observações se distribuem nos níveis destas variáveis:

X \ Y	1	...	b
1	11	1...	1b
...	...1		... b
a	a 1	a ...	a b

As hipóteses a testar são:

H0: As variáveis são independentes ou não estão associadas.

H1: As variáveis não são independentes ou estão associadas.

A estatística de teste de Qui-Quadrado é dada por:

$$\chi^2 = \sum_{i,j} \frac{(f_{oij} - f_{eij})^2}{f_{eij}}$$

Onde: f_{oij} = frequência observada na célula (i,j) da tabela de contingência;

f_{eij} = frequência esperada na célula (i,j) da tabela de contingência

$(f_{eij} = (f_{oi} * f_{oj})/n)$, onde $f_{oi} = \sum_j f_{oij}$ e $f_{oj} = \sum_i f_{oij}$

Sob H0 esta estatística segue uma distribuição qui-quadrado com $(a-1)*(b-1)$ graus de liberdade

Para um nível de significância α , a regra de decisão é: se χ^2 calculado $\geq \chi^2$ tabelado, rejeita-se H0 (ou se $p < \alpha$).

2.4.2.5 Modelo de Regressão Logística [51]

Para avaliar a capacidade de prever um acontecimento dicotômico como o da gravidez evolutiva recorre-se a um modelo de análise multivariada que inclui todas as variáveis descritas que numa análise univariada são significativas, ao nível de significância de 15% ($p < 0.15$), utilizando um modelo de regressão logística [52].

2.4.2.5.1 Especificação do Modelo de Regressão Logística:

Seja Y a variável dependente ou variável resposta, onde $Y=1$ ou $Y=0$. Y segue uma distribuição Bernoulli de probabilidade de sucesso π . Consideremos um conjunto de variáveis explicativas $(X_1, \dots, X_k)$. A probabilidade de sucesso π relaciona-se com as covariáveis, através do seu logit, $\log\left(\frac{\pi}{1-\pi}\right)$, resultando na seguinte equação de regressão logística:

$$P(Y = 1|X) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_k X_k}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_k X_k}} = \pi(X)$$

$\beta_0, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ são os parâmetros que se pretendem estimar, impactando o logit da probabilidade de sucesso de forma linear (preditor).

2.4.2.5.2 Estimação do Modelo de Regressão Logística pelo Método da Máxima Verossimilhança:

Seja (Y_i, X_i) uma amostra de n observações independentes da variável resposta Y , e do vetor de variáveis explicativas X , para $i=1, \dots, n$. A variável Y é uma variável dicotômica que assume os valores 0 ou 1, que representam a ausência ou presença de determinada característica. Um dos métodos mais utilizados para estimar os parâmetros do modelo de regressão logística é o método da máxima verossimilhança. Em termos de formulação matemática, este método consiste na maximização de uma função denominada função de verossimilhança, cuja expressão analítica é dada por:

$$L(\pi) = \prod_{i=1}^n \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{1-y_i},$$

$$\pi_i = P(Y_i = 1 | X_i) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \beta_3 X_{3i} + \dots + \beta_k X_{ki}}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \beta_3 X_{3i} + \dots + \beta_k X_{ki}}}$$

Por uma questão de simplificação, é usual trabalhar-se com o logaritmo da função de verossimilhança, a função de log-verossimilhança, uma vez que a aplicação de logaritmos é uma transformação estritamente monótona, o que significa que o valor que maximiza a

função de verosimilhança também maximiza o seu logaritmo. Assim, procedendo à logaritimização da função de verosimilhança, vem que:

$$l(\pi) = \ln(L(\pi)) = \sum_{i=1}^n [y_i \ln(\pi_i) + (1 - y_i) \ln(1 - \pi_i)]$$

A função de verosimilhança pode ser escrita em função dos parâmetros β a estimar. Maximizar $L(\pi)$ consiste na determinação dos valores de $\beta = (\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_k)$ para os quais as primeiras derivadas parciais são nulas e posterior averiguação (por análise da matriz Hessiana) sobre se de facto estamos em presença de um máximo da função. À derivada de $L(\pi(\beta))$ em ordem a β dá-se o nome de *score*. A maximização da função verosimilhança faz-se neste caso de forma numérica, através do método dos scores de Fisher, já que o modelo de regressão logística é um membro da família dos modelos lineares generalizados.

2.4.2.5.3 Interpretação dos coeficientes estimados:

Variáveis categóricas: Quando a variável explicativa é medida numa escala nominal, é necessário representá-la utilizando as denominadas variáveis *dummy*. Em geral a uma variável (medida numa escala nominal) que assume m modalidades possíveis, correspondem $m-1$ variáveis *dummy*, desde que o modelo de regressão contenha um termo constante no preditor. É feita uma interpretação dos coeficientes estimados e da razão de chances (*odds ratio*) para estas variáveis. Esta razão é dada pelo quociente entre a probabilidade de sucesso e a probabilidade de insucesso (chance) para cada nível da covariável, em relação à chance do nível de referência.

Variáveis Explicativas Contínuas: A interpretação do coeficiente estimado de uma variável explicativa contínua depende, por um lado, da unidade de medida da variável e, por outro, da forma funcional que liga o logit à variável em causa.

Significância dos parâmetros de regressão

Para analisar a significância individual de cada variável, utiliza-se o seguinte teste de hipóteses: $H_0: \beta_j = 0$ contra $H_1: \beta_j \neq 0$, $j=0, \dots, k$

Considera-se a seguinte estatística de teste, sob H_0 :

$$T = \frac{\hat{\beta}_j}{\sqrt{\widehat{var}(\hat{\beta}_j)}}$$

Demonstra-se que, sob a hipótese nula, a estatística T segue, assintoticamente, uma distribuição Normal padrão:

$$T = \frac{\hat{\beta}_j}{\sqrt{\widehat{var}(\hat{\beta}_j)}} \sim^a N(0,1)$$

A regra de teste, para um nível de significância α , é a seguinte: rejeitar H_0 se

$$|T| > Z_{1-\frac{\alpha}{2}}, \text{ onde } \Phi\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1 - \frac{\alpha}{2}$$

e $\Phi(\cdot)$ é a função de distribuição Normal. Após fixar o nível de significância $\alpha=5\%$, é também possível utilizar o *p-value* associado ao valor calculado da estatística de teste para decidir pela rejeição ou não rejeição da hipótese nula.

Para se chegar ao modelo final utilizou-se um procedimento de seleção automático de variáveis baseado na medida da qualidade de ajuste Akaike Information Criterion (AIC). O AIC é uma medida de qualidade usada para selecionar um modelo estatístico entre diversas alternativas. O AIC é uma medida de qualidade de um modelo que equilibra a capacidade de prever novos dados e a complexidade do modelo. Quanto menor o AIC, melhor é o modelo. O procedimento automático de stepwise vai incluindo e retirando covariáveis uma a uma, comparando os correspondentes AIC dos modelos.

2.4.2.5.4 Avaliação da qualidade de Ajustamento

O teste de Hosmer-Lemeshow [53] é um dos procedimentos mais utilizados para avaliar a qualidade do ajustamento do modelo aos dados. Os autores sugerem que o intervalo $[0,1]$ de variação de π seja dividido em s intervalos mutuamente exclusivos (aproximadamente 10), comparando-se de seguida as frequências esperadas e as frequências observadas em cada grupo. A hipótese a testar foi que o modelo encontrado

explica bem os dados. A estatística de teste é obtida pela estatística de Qui-quadrado de Pearson, a partir de uma Tabela 2 * g, onde g é o número de grupos criados. Esta Tabela contém as frequências observadas e esperadas.

A estatística de teste é dada por:

$$\chi^2_{HL} = \sum_{k=1}^g \frac{(O_k - \eta k \bar{\pi}_k)^2}{\eta k \bar{\pi}_k (1 - \bar{\pi}_k)} \sim_{sob H_0} \chi^2_{g-2}$$

Onde,

ηk - é o número de indivíduos no k-ésimo grupo

$$\sum_{i=1}^{C'_k} Y_i$$

é o número de respostas ao longo das C'k classes de variáveis

A regra de teste, é para um nível de significância α , não rejeitar H_0 se $p > \alpha$

2.4.2.6 Correlação [48]

O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de correlação entre duas variáveis de escala, variando entre -1 e 1. O coeficiente pode ser calculado através da seguinte fórmula:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} = \frac{cov(X, Y)}{\sqrt{var(X) \cdot var(Y)}}$$

Onde $X_1, X_2, \dots, X_n$ e $Y_1, Y_2, \dots, Y_n$ são valores medidos de ambas as variáveis e

- $\bar{X} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n X_i$ e $\bar{Y} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n Y_i$ são médias aritméticas de ambas as variáveis
- $cov(X, Y)$ é a covariância entre as variáveis
- $\sqrt{var(X)}$ e $\sqrt{var(Y)}$ são os desvio padrão das variáveis

O coeficiente de correlação de Spearman é uma medida não paramétrica da dependência dos postos das variáveis. Para uma amostra de tamanho n , os n dados brutos X_i e Y_i são convertidos em ordenações (ranks) $rg X_i$ e $rg Y_i$ originando o coeficiente r_s a partir da sua correlação:

$$r_s = \rho_{rgX,rgY} = \frac{\text{cov}(rgX,rgY)}{\sigma_{rgX}\sigma_{rgY}}$$

Em que:

. ρ denota o usual coeficiente de correlação de Pearson, mas aplicado às ordenações das variáveis em postos.

. $\text{cov}(rgX,rgY)$ é a covariância das ordenações das variáveis em postos

. σ_{rgX} e σ_{rgY} são os desvios padrão das ordenações das variáveis em postos

Considerou-se uma correlação forte para valores obtidos entre [0.7.1.0], moderada entre [0.5.0.7], fraca entre [0.3.0.5] e insignificante abaixo de 0.3.

2.4.2.7 Modelo de regressão gama [51]

Este tipo de modelo é adequado para dados contínuos não negativos, assimétricos.

Considere-se que a variável resposta de interesse segue uma distribuição Gama de média μ ,

$$Y \sim \text{Gama} \left(v, \frac{v}{\mu} \right)$$

No modelo de regressão Gama esta média relaciona-se com as covariáveis como:

$$\mu = \exp((\beta_0 + \beta_1 X_1, \dots, \beta_n X_n))$$

Este modelo pertence à classe de modelos lineares generalizados e pode escrever-se como:

$$Y_i = \exp(x^T \beta) \varepsilon_i, i = 1. \dots, n, \varepsilon_i \sim \text{Gama}(v, v/\mu_i), \text{ independentes}$$

A estimação é feita por máxima verossimilhança, numericamente como no caso do modelo de regressão logística. A interpretação dos seus coeficientes e o teste à sua significância são feitos como em qualquer outro modelo linear generalizado. A qualidade do ajuste do modelo recorre à função desvio.

Neste trabalho, o nível de significância utilizado será $\alpha = 5\%$

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação inicial dos dados

Foram incluídos 679 ciclos de transferência de embriões congelados. A amostra incluía dois grupos, um que foi submetido a tratamento adicional com didrogesterona, 181 casos (26.7%), enquanto 498 (73.3%) tiveram o tratamento considerado habitual.

Verificaram-se 437 casos de gravidez (64.4%- 64,9% no grupo sem DYD e 63% no grupo com DYD). Destes 292 (43% do total) foram de gravidez evolutiva (44,0% no grupo sem DYD e 40,9% no grupo com DYD) (Figura 3).

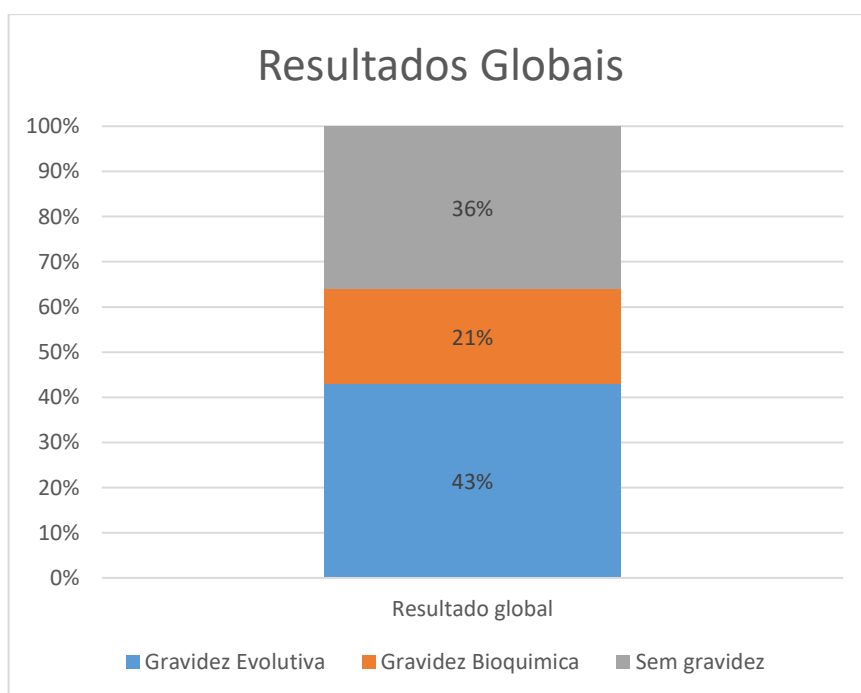


Figura 3 - Resultados globais

3.2 Avaliação sumária dos dados

Variáveis contínuas

A Tabel 2 descreve a distribuição das variáveis contínuas do estudo.

A idade média das mulheres no dia da transferência foi de 34.7 anos, com desvio padrão de 3.98, mediana de 35 e amplitude inter-quartil (AIQ) de 6. A idade média na altura da colheita dos ovócitos foi semelhante, 34 anos, com desvio padrão de 3.96, mediana de 34 e amplitude inter-quartil de 6.

Tabela 2 - Distribuição das variáveis contínuas

	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Amplitude inter-quartil
Idade na TEC	34.74	35.00	3.98	21.00	43.00	6.00
Espessura endometrial	9.74	9.70	1.77	6.00	16.10	2.60
P4 transferência	14.38	13.90	4.57	4.20	32.30	6.20
Duração de infertilidade	61.27	53.00	30.89	12.00	180.00	32.00
Idade na colheita	33.96	34.00	3.96	21.00	39.00	6.00
Peso Mulher	65.03	62.00	13.09	41.00	115.00	14.00
Altura da mulher	162.83	163.00	6.62	146.00	184.00	10.00
IMC da mulher	24.56	24.00	4.85	14.00	43.00	6.00
Idade homem	36.45	36.00	5.24	24.00	58.00	6.00
Peso homem	81.63	80.00	14.23	53.00	142.00	17.00
IMC do homem	26.54	25.00	5.26	16.00	112.00	5.00
Óvulos recolhidos	15.39	14.00	8.19	2.00	43.00	11.00
óvulos utilizados	14.27	13.00	7.58	2.00	43.00	11.00
2PN	9.62	8.00	5.52	1.00	30.00	7.00

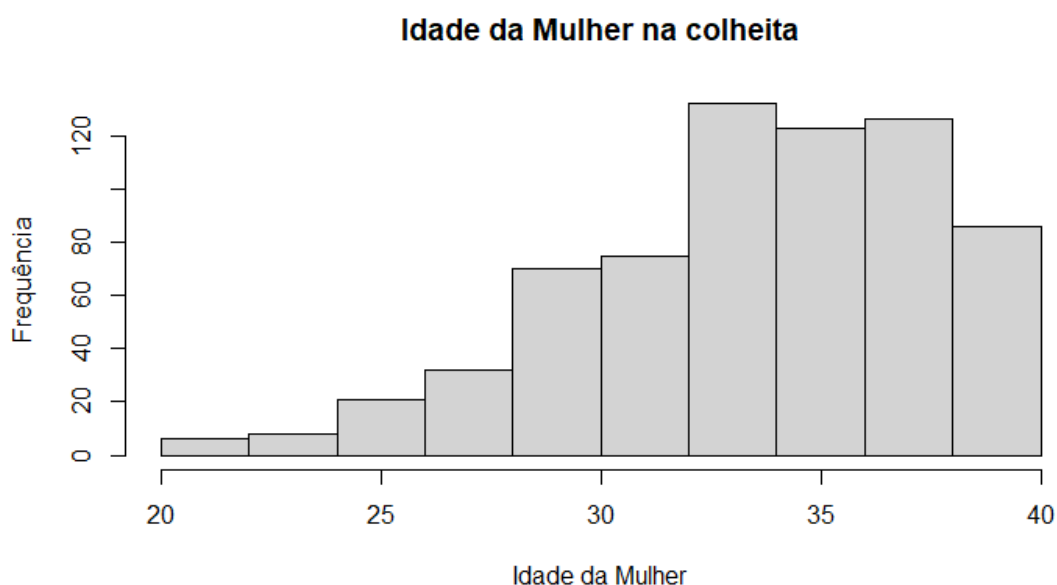


Figura 4- Histograma com a distribuição observada da idade da Mulher na colheita

O histograma da Figura 4 mostra que a idade da mulher no dia da colheita se distribui de uma forma assimétrica, sendo que a maioria tem idade entre 33 e 39 anos.

O boxplot e histograma da Figura 5 mostram a distribuição da progesterona no dia da colheita. A distribuição tem uma forma de sino, de cauda direita um pouco mais pesada, com mediana afastada da média (13.9 versus 14.4 ng/ml), com desvio padrão de 4.56. O valor mínimo identificado foi 4.20 ng/ml e o máximo de 32.30 ng/ml. 1º primeiro quartil 11.15 ng/ml e o 3º 17.25 ng/ml, revelando algum grau de assimetria.

Foi aplicado o teste de Shapiro Wilk para avaliação da normalidade desta variável, que obteve um p-value <0.001, o que rejeita a hipótese da amostra ser proveniente de uma distribuição normal. Testou-se de seguida a possibilidade desta variável ser proveniente de uma distribuição gama. Para isso recorreu-se ao teste de Kolmogorov-Smirnov e obteve-se um p-value >0.05, pelo que não se rejeitou a hipótese da amostra desta variável ser proveniente de uma distribuição gama.

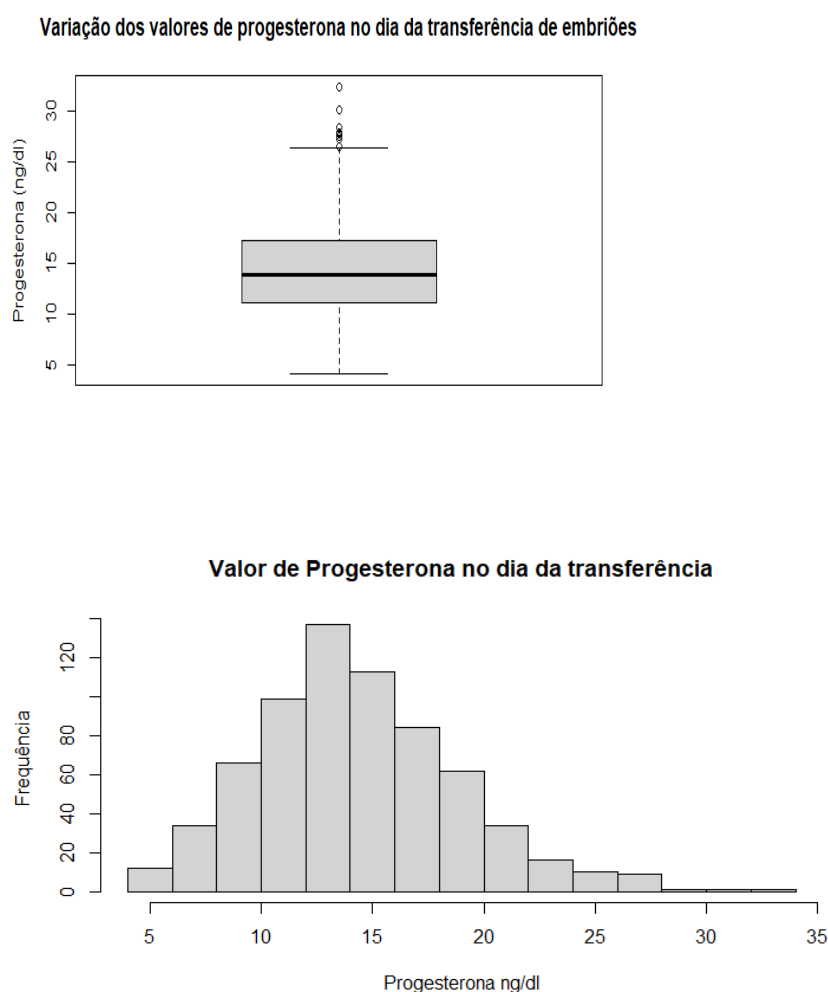


Figura 5- Boxplot e histograma com a distribuição do valor da progesterona do dia da colheita

Variáveis categóricas

A Tabela 3 mostra a distribuição das variáveis categóricas.

Tabela 3 - Distribuição das variáveis categóricas

	n	%
Dia da transferência		
Blastocisto 5º dia	567	84%
Blastocisto 6º dia	112	16%
Nº de embriões transferidos		
1 embrião	536	79%
2 embriões	143	21%
Ciclo diferido		
Ciclo não diferido	108	16%
Ciclo diferido	571	84%
Mulher com filhos		
Não	587	86%
Sim	92	14%
Homem com filhos	679	
Não	581	86%
Sim	98	14%
Adição de didrogesterona		
Sem adição de didrogesterona	498	73%
Com adição de didrogesterona	181	27%
Etnia da mulher		
Asiática	3	0%
Caucasiana	584	86%
Cigana	18	3%
Indiana	1	0%
Mista	39	6%
Negra	33	5%
Outra	1	0%
Etnia do homem		
Asiática	4	1%
Caucasiana	598	88%
Cigana	18	3%
Mista	38	6%
Negra	21	3%
Causa de infertilidade		
Endometriose	53	8%

	n	%
Fator Masculino	194	29%
Fatores femininos e masculino	85	13%
Infertilidade Inexplicada	161	24%
Múltiplos fatores exclusivamente femininos	27	4%
Outro	5	1%
Ovulatório	68	10%
Tubário	86	13%
Tipo de fecundação		
FIV	420	62%
ICSI	236	35%
Misto FIV/ICSI	23	3%
Hábitos Tabágicos da Mulher		
Anteriores	132	19%
Nunca	395	58%
Presentes	152	22%
Hábitos Tabágicos do Homem		
Anteriores	142	21%
Nunca	292	43%
Presentes	245	36%

Tabela 4 - Distribuição das variáveis categóricas reclassificadas

	n	%
Idade na colheita		
<35 anos	344	51%
35-37 anos	176	26%
38-39 anos	159	23%
Etnia da mulher		
Caucasiana	584	86%
Não caucasiana	95	14%
Etnia do homem		
Caucasiana	598	12%
Não caucasiana	81	88%

Relativamente à etnia do homem e da mulher optou-se por sub-classificar a variável em etnia caucasiana versus não caucasiana por haver poucas observações nas várias etnias não caucasianas. Uma vez que o resultado esperado dos tratamentos pode variar com a idade da colheita da mulher de uma forma assimétrica, sendo relativamente constante até aos 35 anos e diminuindo de forma mais abrupta após os 35, optou-se por reclassificar esta variável (

e Figura 6- Distribuição da idade das mulheres no dia da colheita- boxplot e sub-classificação da variável).

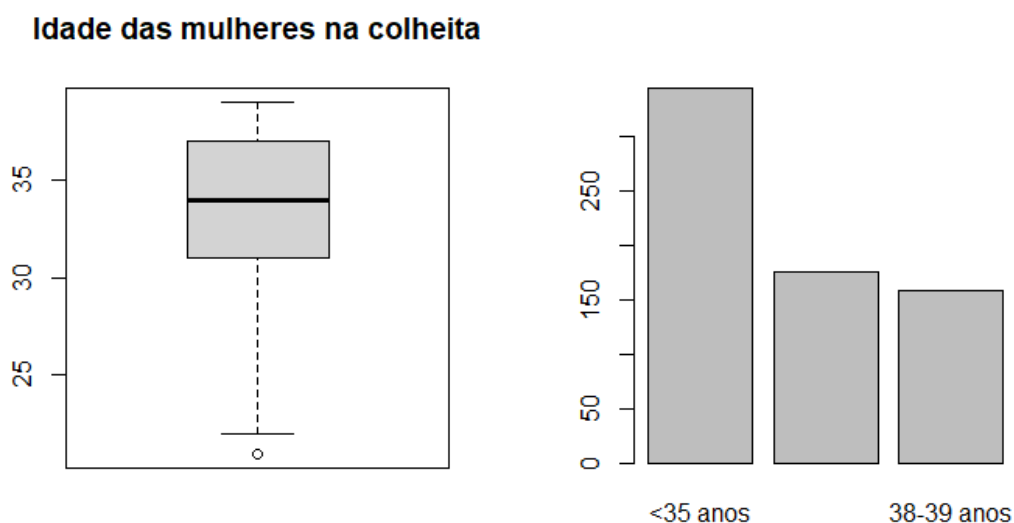


Figura 6- Distribuição da idade das mulheres no dia da colheita- boxplot e sub-classificação da variável

3.3 Matriz de correlações

Foi feita uma matriz de correlações entre os valores observados das diferentes variáveis. Para avaliar a correlação entre variáveis contínuas utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson e entre variáveis contínuas e categóricas ou entre variáveis categóricas utilizou-se o coeficiente de Spearman.

Considerou-se uma correlação absoluta forte ou muito forte entre $|0.7-1.0|$; moderada entre $|0.5-0.7|$; fraca entre $|0.3-0.5|$ e insignificante no caso de um valor inferior. Na Tabela 5 são demonstradas as correlações forte, moderadas e fracas e respectivo nível de significância do teste associado.

Verificou-se uma correlação fortemente positiva entre a idade da mulher na colheita e a idade na transferência, entre o peso da mulher e o seu IMC, entre o número de óvulos colhidos, o número de óvulos utilizados e o número de embriões (Figura 7).

Estas correlações são esperadas, uma vez que a transferência de embriões congelados ocorre frequentemente após a colheita. O número de embriões obtidos está associado ao número de óvulos utilizados e este ao número de óvulos obtidos.

Tabela 5- Matriz de Correlações- variáveis contínuas

	Idade na TEC	Idade na colheita	Peso Mulher	IMC mulher	Idade homem	Peso homem	altura homem	IMC homem	Dose de gonadotrofinas	Óvulos recolhidos	óvulos utilizados	2PN
Idade na TEC		,943**			,415**				,310**			
Idade na colheita	,943**				,477**				,349**			
Peso Mulher				,911**								
IMC mulher			,911**									
Idade homem	,415**	,477**										
Peso homem							,394**	,675**				
altura homem						,394**		-,303**				
IMC homem						,675**	-,303**					
Dose de gonadotrofinas	,310**	,349**								-,424**	-,410**	-,345**
Óvulos recolhidos									-,424**		,961**	,853**
óvulos utilizados									-,410**	,961**		,870**
2PN									-,345**	,853**	,870**	

** . A correlação é significativa no nível 0.01 (2 extremidades).

* . A correlação é significativa no nível 0.05 (2 extremidades).

correlação forte |0.7-1.0|

correlação moderada |0.5-0.7|

correlação fraca |0.3-0.5|

Tabela 6- Matriz de correlações II

	Idade na TEC	Ciclo diferido	P4 transferência	Idade na colheita	Idade homem	Dose de gonadotrofinas	2PN	Ordem da TEC	Nº Embriões transferidos	Gravidez bioquímica	Gravidez Evolutiva	homem tem filhos	Etnia rec mulher	Etnia rec homem	Ordem TEC	idade_colheita
Idade na TEC																,759**
Espessura endometrial																
Ciclo diferido																
P4 transferência																
Idade na colheita																,824**
Idade homem												,311**				,337**
Dose de gonadotrofinas																,355**
2PN								,312**								
Ordem da TEC							,312**		,342**						,976**	
Dia de transferência																
Nº Embriões transferidos								,342**							,357**	
gravidez bioquímica											,648**					
Gravidez evolutiva										,648**						
homem tem filhos					,311**											
Didrogesterona			-,666**													
Etnia rec mulher														,624**		
Etnia rec homem													,624**			
Ordem TEC								,976**	,357**							
idade_colheita	,759**			,824**	,337**	,355**										

** A correlação é significativa no nível 0.01 (2 extremidades).

* A correlação é significativa no nível 0.05 (2 extremidades).

correlação forte |0.7-1.0|

correlação moderada |0.5-0.7|

correlação fraca |0.3-0.5|

Boxplot de nº ovúlos recolhidos, utilizados e nº de embriões obtidos

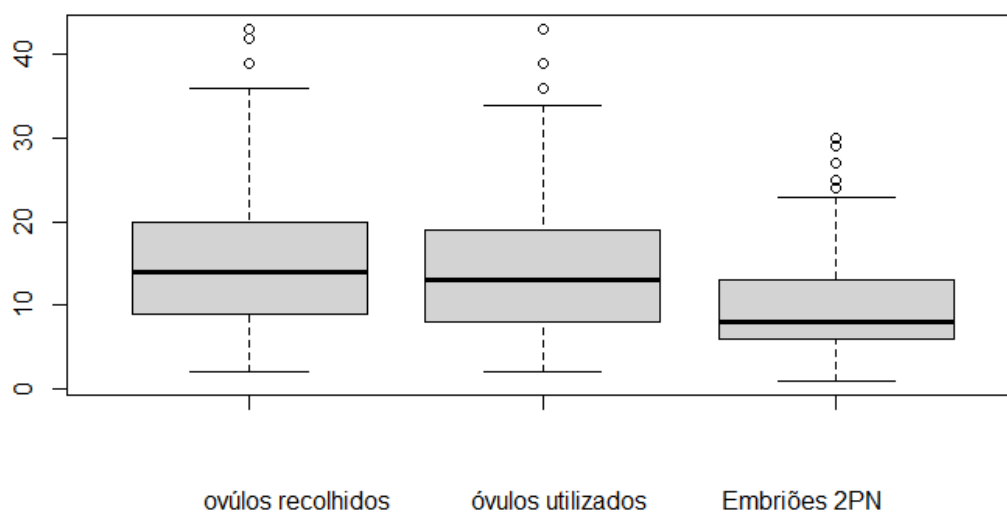


Figura 7- Boxplot com o nº ovúlos recolhidos, utilizados e nº de embriões obtidos (2PN)

A título ilustrativo na Figura 8 pode verificar-se a relação entre a idade da mulher e o número de ovócitos obtido. Por outro lado, o peso é uma das variáveis que determina o IMC pelo que a relação entre as duas é esperada.

Verificou-se contudo, uma correlação moderadamente positiva entre o peso do homem e o seu IMC. Verificaram-se correlações fracamente positivas entre as idades da mulher na colheita e transferência e a idade do homem, entre a idade da mulher e as doses de gonadotrofinas. Verificou-se uma correlação moderadamente negativa entre o peso do homem e a altura e entre o uso de gonadotrofinas e o nº de óvulos obtidos, utilizados e embriões conseguidos. Normalmente em mulheres mais velhas, a reserva ovárica é menor pelo que se utilizam maiores doses de gonadotrofinas e obtém-se menor nº de ovócitos, obtendo-se uma menor quantidade de embriões.

Para correlação entre variáveis contínuas e categóricas ou entre variáveis categóricas, utilizou-se o coeficiente de Spearman (Tabela 6).

Verificou-se uma correlação moderadamente negativa entre os valores de progesterona e uso de didrogesteron (-0.666) explicada porque a didrogesteron foi utilizada nos casos com níveis de progesterona menores. Verificou-se também uma correlação moderadamente positiva entre gravidez bioquímica e evolutiva (0.648). Esta relação é esperada uma vez que gravidez evolutiva é um subconjunto de gravidez

bioquímica. Também se verificou uma relação moderadamente positiva entre a etnia do homem e da mulher quando sub-classificada (0.624), provavelmente porque os casais terão uma preferência no relacionamento por parceiros etnicamente semelhantes.

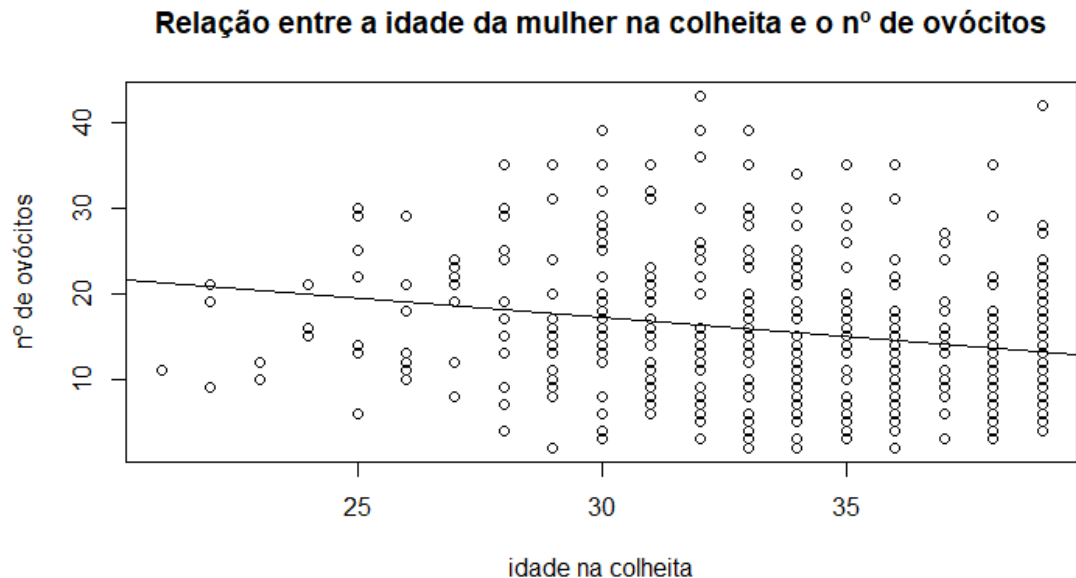


Figura 8 Relação entre a idade da mulher na colheita e o nº de ovócitos obtidos

Relativamente a correlações fracamente positivas: entre a idade do homem na colheita e o facto de ter filhos (0.311) ou a idade da mulher na colheita (0.337), entre a ordem da transferência e o número de embriões (0.311) - explicada pelo facto de que casos com menos embriões terão acesso a menos transferências; entre o número de embriões e o número de embriões transferidos (0.342) e a ordem de transferência. Insucessos prévios normalmente levam a transferências múltiplas subsequentes.

3.4 Fatores que influenciam valor de progesterona:

Uma das questões de investigação procurava encontrar quais das variáveis analisadas poderiam ajudar a explicar o valor de progesterona medido. Através da matriz de correlações conseguimos observar que apenas o peso e o IMC parecem associadas à sua variabilidade (-0.233 e -0.232). No entanto apesar destas correlações serem estatisticamente significativas, a correlação é fraca.

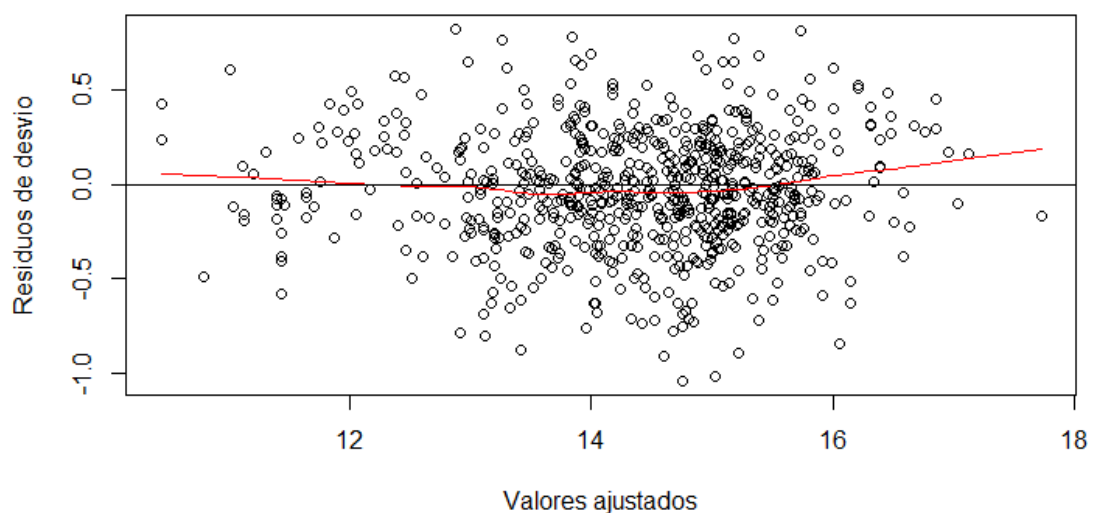
Para averiguar mais profundamente esta questão criaram-se vários modelos de regressão, com as variáveis: idade da mulher na transferência, mulher fumadora, espessura do endométrio, fator de infertilidade, etnia da mulher agrupada, peso, altura da mulher e se a mulher já teve filhos, para explicar a variável resposta valor de progesterona.

Testou-se o modelo considerando uma distribuição normal e uma distribuição gama. O modelo que mostrou melhor desempenho, foi o que considerou a distribuição gama para a variável resposta. Tal como foi expresso no ponto 3.1 a distribuição gama adequa-se aos dados.

A qualidade do ajuste foi adequada com um p-value do teste à qualidade baseado na função desvio >0.05 . Com este modelo, após Stepwise obteve-se um valor de AIC 3918.

Através da avaliação do gráfico dos resíduos observados contra os valores preditos, verificou-se uma dispersão importante, apesar de ser relativamente simétrica e controlada nos seus valores. (Figura 9A).

Avaliou-se de seguida os valores potencialmente influentes e efetivamente influentes (Figura 9B). Este gráfico identifica as observações com maior distância de Cook. Em todos os casos a distância foi inferior a 0,05 pelo que para avaliação do modelo final se optou por manter todos os dados.



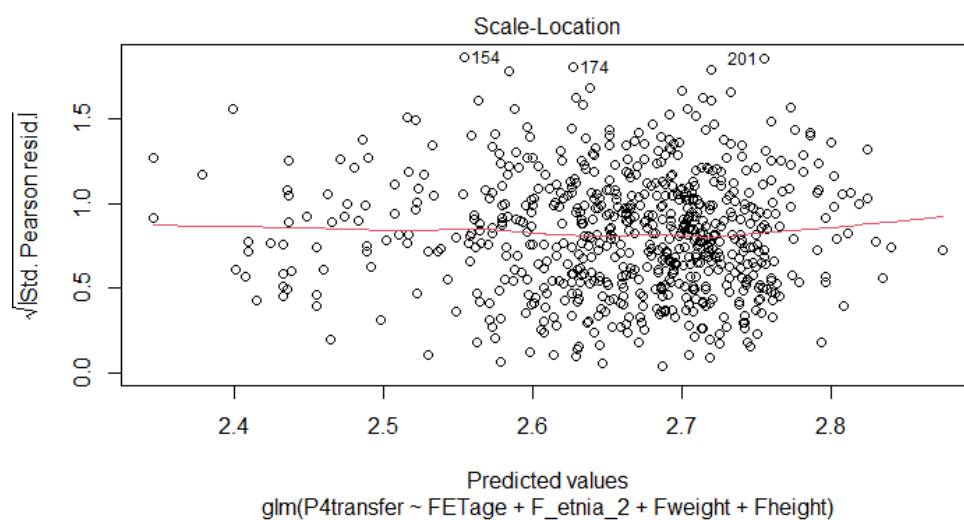


Figura 9A- Gráfico de resíduos contra valores ajustados e resíduos padronizados contra valores preditos:

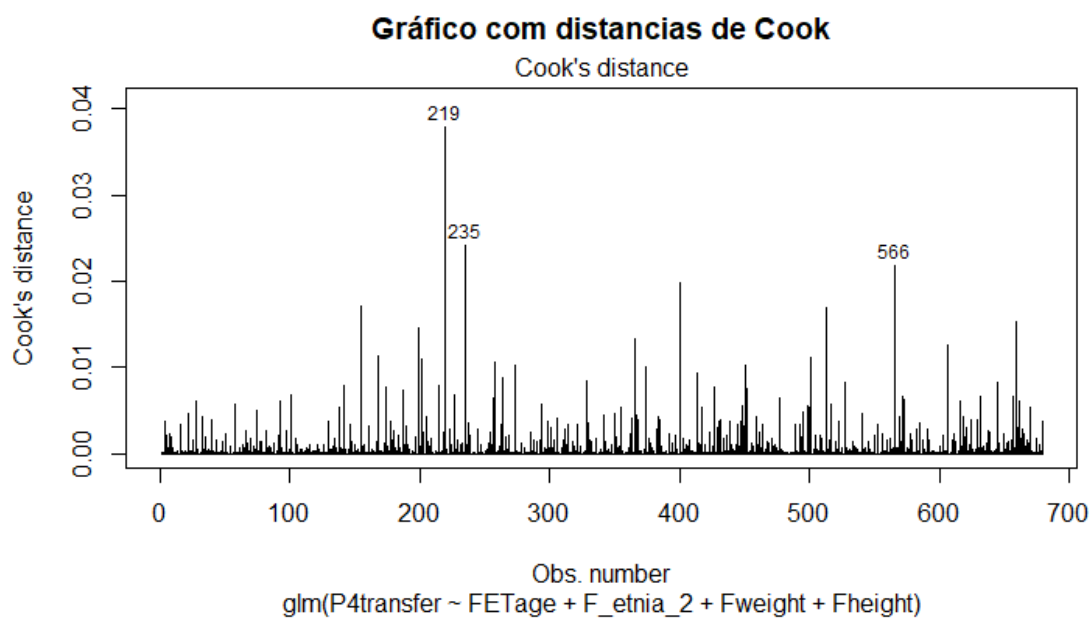


Figura 9B- Gráfico que revela os valores efetivamente influentes

A tabela 7 mostra os coeficientes obtidos no modelo final.

Tabela 7- Resultado da regressão gama: fatores que influenciam o valor de progesterona

		Intervalo confiança 95%		$H_0: \beta_j=0$ vs $H_1: \beta_j \neq 0$
	estimado	inferior	superior	p-value
(Intercept)	11.38	6.25	20.71	<0.001
Idade na TEC	1.01	1.00	1.01	<0.05
Etnia caucasiana	0.91	0.85	0.97	<0.01
Peso Mulher	0.99	0.99	1.00	<0.001
Altura Mulher	1.00	1.00	1.01	<0.05

Com base nos valores obtidos considerou-se que as variáveis idade no dia da transferência, etnia, peso e altura ajudam a explicar a variação da progesterona (tabela 7).

O gráfico abaixo (Figura 10) permite apreciar de que modo os valores de progesterona preditos podem variar considerando o peso e a etnia.

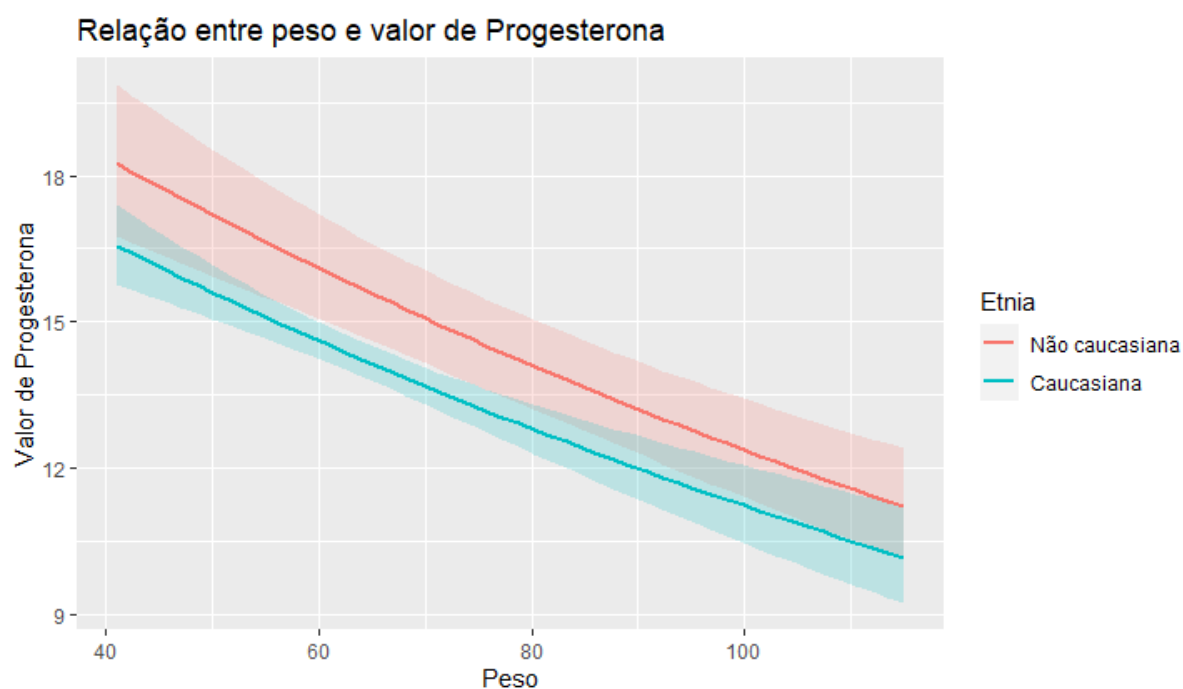


Figura 10 - Variação do nível de progesterona de acordo com o peso e a etnia

3.5 Análise Univariada para o desfecho final- gravidez evolutiva:

Avaliaram-se quais as variáveis que de forma individual se poderão associar ao resultado primário gravidez evolutiva. Compararam-se as médias das variáveis contínuas relativas a cada grupo de gravidez evolutiva através do teste t-Student (Tabela 8). A homogeneidade das variâncias foi avaliada recorrendo ao teste de Levene.

Tabela 8- Análise Univariada para o desfecho final- gravidez evolutiva- comparação entre variáveis contínuas

	Sem gravidez evolutiva		Com gravidez evolutiva		p-value
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Idade na TEC	35.0	4.0	34.4	3.9	0.067
Espessura endometrial	9.5	1.6	10.1	1.9	<0.001*
P4 transferência	14.4	4.7	14.3	4.4	0.752
Duração de infertilidade	62.3	31.8	60.0	29.7	0.343
Idade na colheita	34.3	4.0	33.5	3.9	0.013
Peso Mulher	64.8	12.7	65.3	13.6	0.645
Altura da mulher	162.5	6.6	163.3	6.6	0.119
IMC da mulher	24.6	4.9	24.5	4.8	0.792
Idade homem	36.7	5.4	36.2	5.0	0.206
Peso homem	81.3	13.3	82.1	15.3	0.430
Altura homem	175.5	8.5	175.8	6.9	0.605
IMC do homem	26.5	5.8	26.5	4.4	0.974
Dose de gonadotrofinas	2592	812	2503	787	0.149
Óvulos recolhidos	14.9	8.0	16.0	8.4	0.082
óvulos utilizados	13.9	7.6	14.8	7.5	0.107
2PN	9.3	5.4	10.0	5.6	0.123

- P<0,05 no teste de Levene

Nas variáveis contínuas analisadas verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na espessura do endométrio, que foi maior em pacientes que tiveram gravidez evolutiva (em média, mais 0.6mm) e na idade da mulher aquando da colheita de ovócitos (em média, menos 0.8 anos).

Relativamente às variáveis categóricas (Tabela 9) verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o dia da transferência favorável ao 5º dia (45% versus

32%), para transferências de 2 versus 1 embrião (51% versus 41%) e para a idade da mulher no dia da colheita, favorável ao grupo com idade <35 anos (48% versus 42% versus 33%).

Tabela 9 - Análise Univariada para o desfecho final- gravidez evolutiva- comparação entre variáveis categóricas (Teste Qui-quadrado)

	n	n gravidez evolutiva	% gravidez evolutiva	p-value
Dia da transferência				
Blastocisto 5º dia	567	257	45%	0.012
Blastocisto 6º dia	112	36	32%	
Nº de embriões transferidos				
1 embrião	536	220	41%	0.032
2 embriões	143	73	51%	
Ciclo diferido				
Ciclo não diferido	108	42	39%	0.342
Ciclo diferido	571	251	44%	
Mulher tem filhos				
Não	587	253	43%	0.946
Sim	92	40	43%	
Homem tem filhos				
Não	581	251	43%	0.949
Sim	98	42	43%	
Adição de didrogesterona				
Sem adição de didrogesterona	498	219	44%	0.472
Com adição de didrogesterona	181	74	41%	
Etnia da mulher				
Caucasiana	584	250	43%	0.657
Não caucasiana	95	43	45%	
Etnia do homem				
Caucasiana	598	257	43%	0.802
Não caucasiana	81	36	44%	
Causa de infertilidade				
Multiplos factores femininos	171	68	40%	0.599
Fator masculino	194	84	43%	
Fatores feminino e masculino	85	34	40%	
Infertilidade inexplicada	161	73	45%	
Fator ovulatório	68	34	50%	
Tipo de fecundação				
FIV	420	183	44%	0.956
ICSI	236	100	42%	
Misto FIV/ICSI	23	10	43%	

	n	n gravidez evolutiva	% gravidez evolutiva	p-value
Hábitos Tabágicos da Mulher				
Anteriores	132	54	41%	0.843
Nunca	395	173	44%	
Presentes	152	66	43%	
Hábitos Tabágicos do Homem				
Anteriores	142	69	49%	0.29
Nunca	292	125	43%	
Presentes	245	99	40%	
Ordem TEC				
1	439	183	42%	0.193
2	179	87	49%	
3 ou mais	61	23	38%	
Idade na colheita				
<35 anos	344	166	48%	0.007
35-37 anos	176	74	42%	
38-39 anos	159	53	33%	

As Figuras 11,12 e 13 ilustram de forma gráfica estes aspetos.

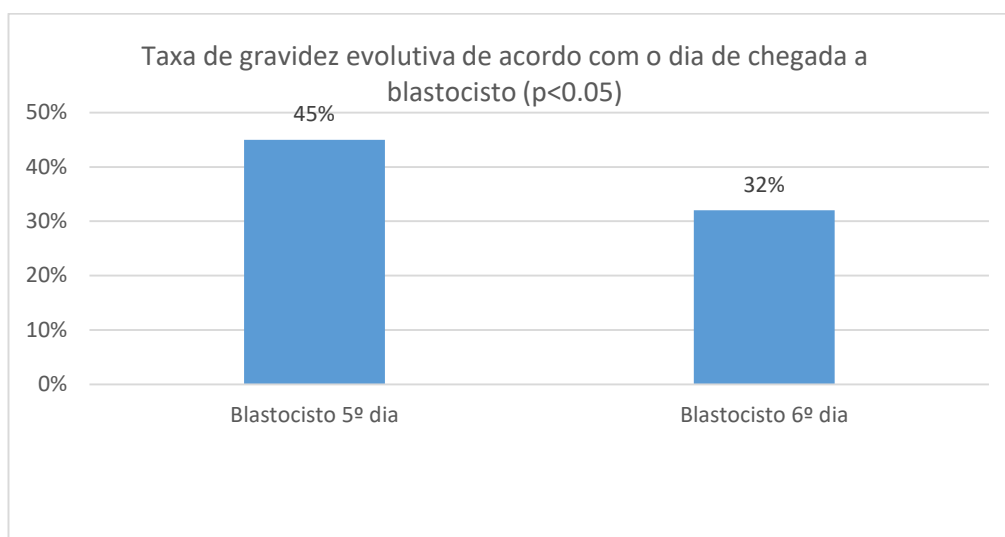


Figura 11- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com o dia de chegada a blastocisto

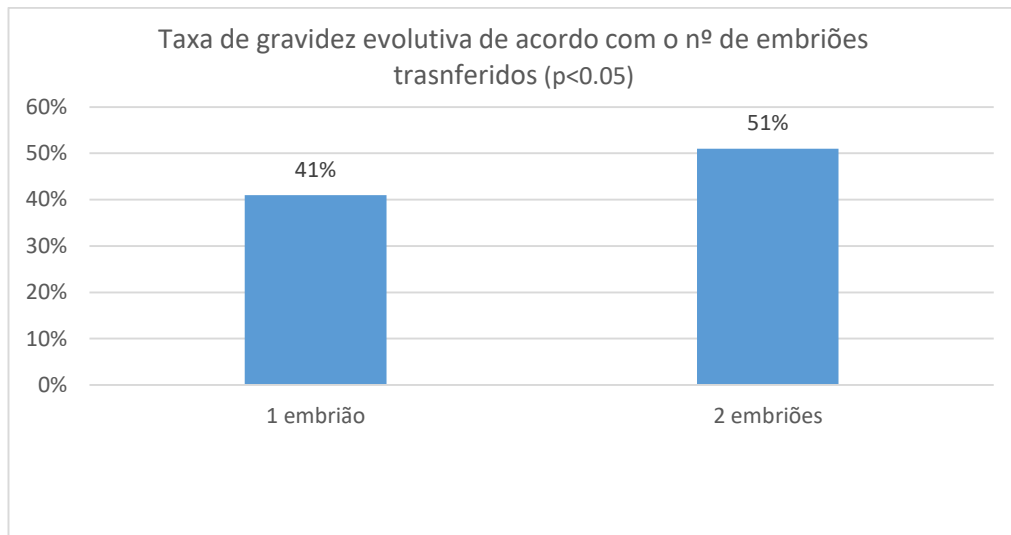


Figura 12- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com o nº de embriões transferidos

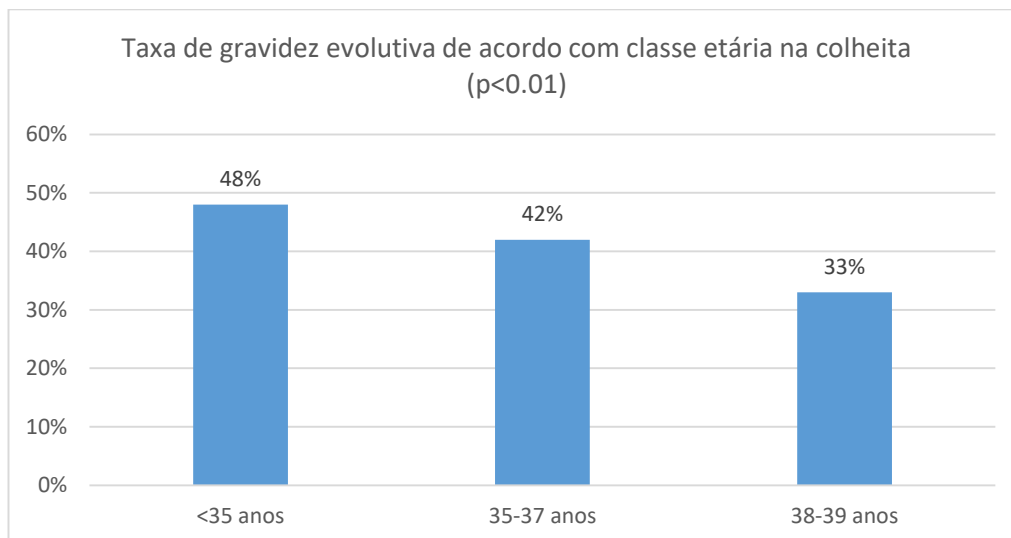


Figura 13- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com a classe etária da colheita

3.6 Estimação de um Modelo de Regressão Logística Multivariado para determinação de gravidez evolutiva

Para a estimação do modelo de análise multivariada para determinação de gravidez evolutiva foram consideradas as variáveis que na análise univariada apresentaram $p < 0.150$ (no teste-t para variáveis contínuas e teste Qui-quadrado para categóricas): Idade

na TEC ($p=0.067$), Idade na colheita ($p=0.013$), Espessura endometrial ($p<0.001$), Dose de gonadotrofinas ($p=0.149$), Óvulos recolhidos ($p=0.082$), óvulos utilizados ($p=0.107$), 2PN ($p=0.123$), Dia da transferência ($p=0.012$), N° de embriões transferidos ($p=0.032$) e idade na colheita-categorizada ($p=0.07$). Uma vez que o uso de didrogesterona e os valores de progesterona eram o foco deste trabalho, a variável uso de didrogesterona foi adicionada.

Atendendo aos valores de correlação muito forte entre algumas das variáveis, o modelo final de regressão foi construído com: Idade na colheita, Espessura endometrial, Dose de gonadotrofinas, Óvulos recolhidos, Dia da transferência, N° de embriões transferidos e Uso de didrogesterona.

Para se chegar ao modelo final utilizou-se um procedimento de seleção automático de variáveis baseado na medida da qualidade de ajuste AIC. Recorrendo ao teste de Qui-Quadrado avaliou-se a distribuição dos desvios residuais. O resultado obtido, foi $p<0,001$, rejeitando a hipótese de um bom ajuste, com um valor de AIC de 903.38. Avaliou-se de seguida os valores potencialmente influentes e efetivamente influentes (Figura 14). Este gráfico identifica as observações com maior distância de Cook. Em todos os casos a distância foi inferior a 0,05 pelo que para avaliação do modelo final se optou por manter todos os dados.

Para avaliar a qualidade do modelo em termos preditivos recorreu-se ao teste de Hosmer e Lemeshow, que resultou num $p<0.05$, pelo que apesar das variáveis estatisticamente significativas incluídas no modelo, este não se revelou um bom preditor de gravidez evolutiva.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 10) é possível concluir que o aumento da idade da mulher na colheita, uma medida de endométrio menor, o dia de chegada a blastocisto em dia 6 e a transferência de apenas um embrião se relacionam significativamente com o desfecho final de gravidez evolutiva, de forma negativa.

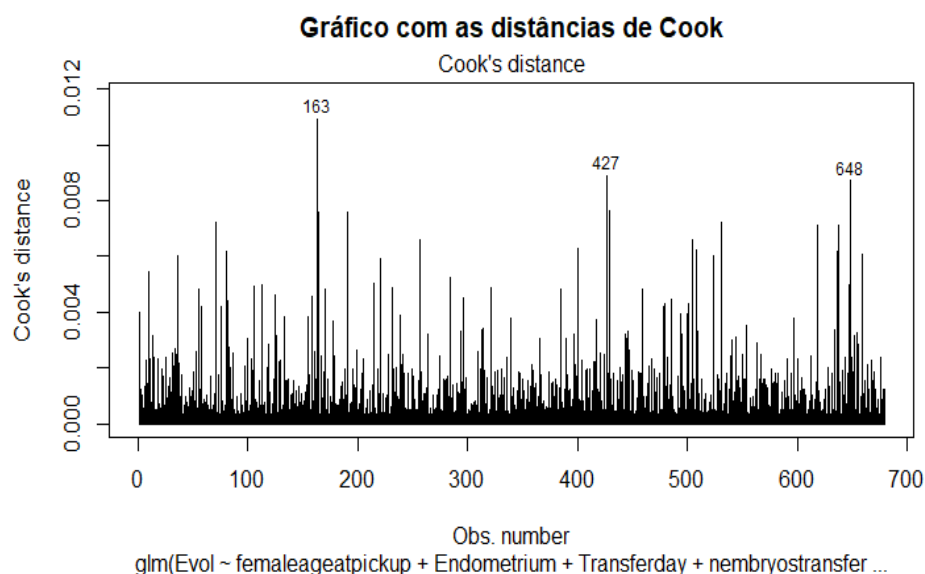


Figura 14- Figura 9B- Gráfico mostrando os valores efetivamente influentes

Tabela 10- Resultado da estimação do Modelo Multivariado para determinação de gravidez evolutiva

		IC 95%		
Parâmetro	Odds -ratio	Limite inferior	Limite superior	p-value
Intercept	0.48	0.09	2.48	
Idade na colheita	0.95	0.91	0.99	<0.01
Espessura endometrial	1.20	1.09	1.31	<0.001
Blastocisto de 6º dia	0.56	0.36	0.86	<0.01
2 embriões transferidos	1.63	1.12	2.39	<0.05

Os gráficos (Figura 15) ajudam a demonstrar o impacto da transferência de um ou de dois embriões ou do dia da transferência no resultado final. A taxa de gravidez é cerca de 10-15% superior no caso de embriões de dia 5, semelhante ao que acontece quando se transferem 2 embriões.

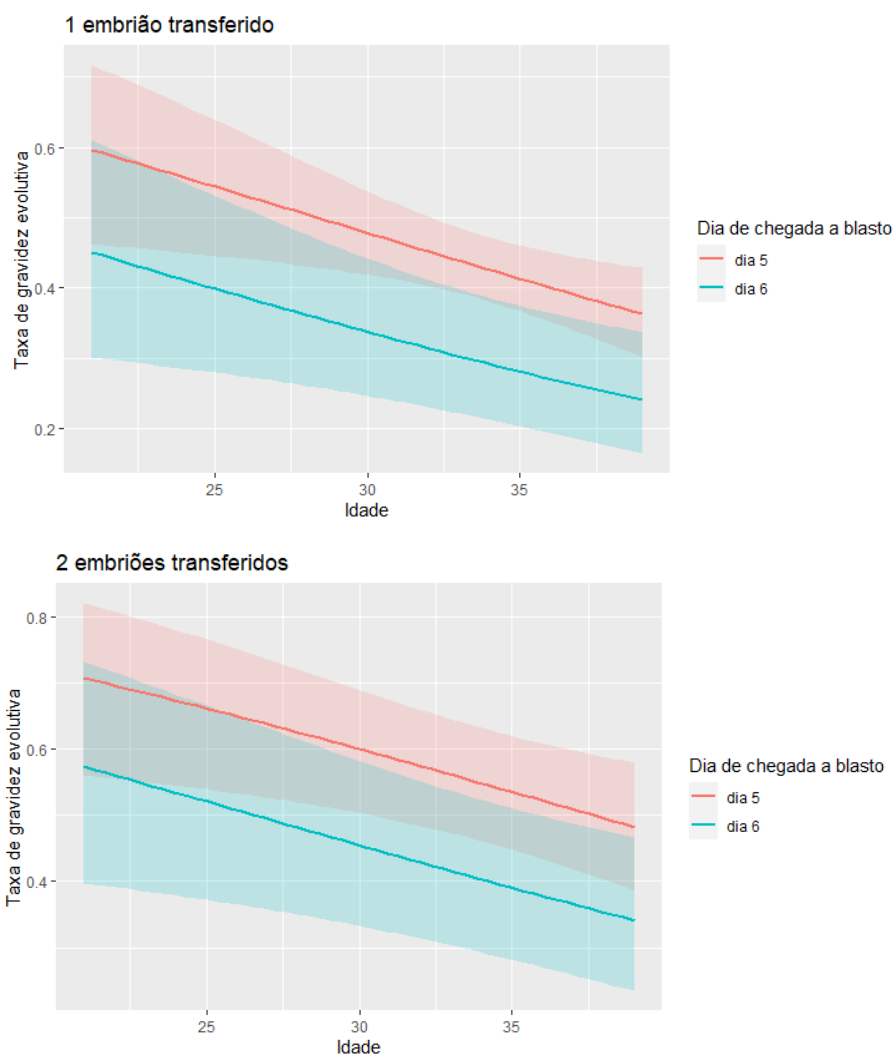


Figura 15- Relação entre a idade, o nº de embriões transferidos, o dia de chegada a blastocisto e a taxa de gravidez evolutiva

3.7 Análise de sensibilidade para os valores de progesterona

Tal como foi expresso na introdução, trabalhos prévios sugerem que valores menores de progesterona no dia TEC, não corrigidos (neste trabalho foram corrigidos com didrogesterona) estão associados a um pior resultado, sendo que a literatura consultada é divergente no que diz respeito ao impacto na taxa de gravidez evolutiva com valores de progesterona mais altos. Assim sendo é importante avaliar as taxas de gravidez evolutiva de acordo com a distribuição dos valores de progesterona.

Para esta análise de sensibilidade, os dados foram divididos em 5 grupos de acordo com os níveis de progesterona (Figura 16) e fez-se uma análise da taxa de gravidez evolutiva por quintil.

Não parece verificar-se uma tendência nos resultados, ainda que através de uma análise visual grosseira possa parecer que os grupos com valores de progesterona entre [10.5.12.8[apresentem uma menor taxa de gravidez, de gravidez evolutiva e uma maior taxa de aborto (Tabela 11 e Figura 17).

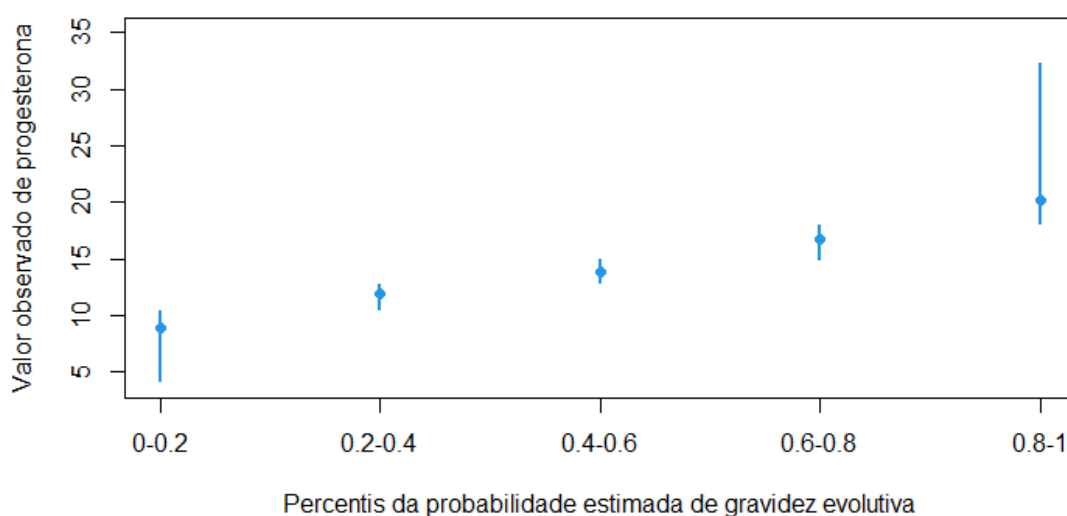


Figura 16- Distribuição dos valores de progesterona de acordo com a segmentação por 5 percentis

Tabela 11 - Resultados observados de acordo com o valor de progesterona no dia da TEC

Valores de Progesterona	Taxa de gravidez bioquímica	Taxa de gravidez evolutiva	Taxa de Aborto
[4.2-10.4[	64%	44%	31%
[10.5.12.8[	59%	35%	41%
[12.9-14.9[	70%	50%	29%
[15.0.18.0[	65%	46%	29%
[18.1.32.3[	63%	40%	36%

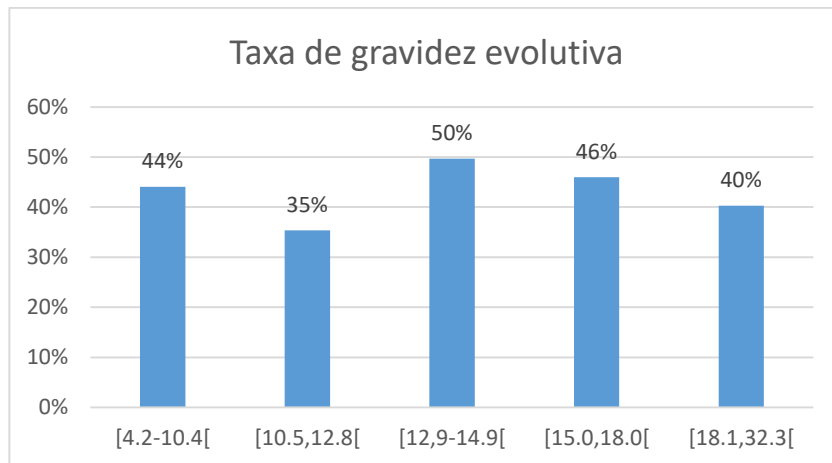


Figura 17- Taxa de gravidez evolutiva de acordo com o valor de progesterona no dia da TEC

3.8 Comparação dos resultados entre pacientes que utilizaram ou não utilizaram didrogesterona

Este era um dos objetivos primários do trabalho. Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no que diz respeito a gravidez evolutiva entre pacientes que utilizaram ou não didrogesterona (Tabela 12 e Figura 18).

Tabela 12 - Comparação entre os grupo com e sem adição de didrogesterona. Teste Qui-quadrado

	n	Taxa de gravidez		Taxa de gravidez gravidez evolutiva		Taxa de Aborto	
		%	p-value	%	p-value	%	p-value
Com didrogesterona	181	63%	0.652	41%	0.485	35%	0.565
Sem didrogesterona	498	65%		44%		32%	

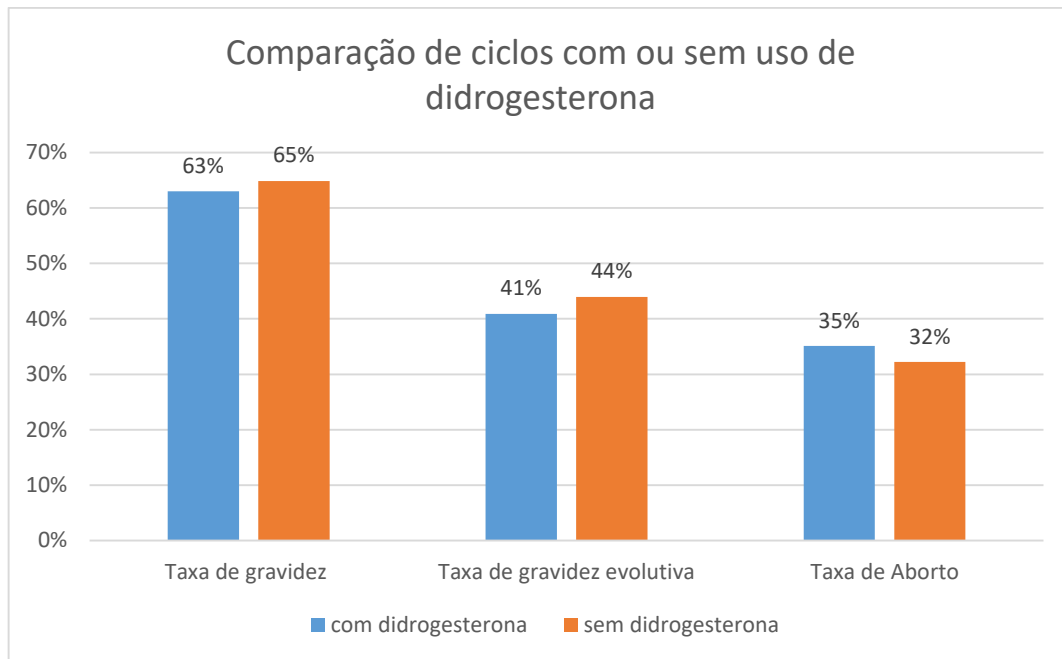


Figura 18- Comparação de ciclos com ou sem uso de didrogesterona

As diferentes variáveis foram comparadas entre os dois grupos (Tabela 13 e 14). Identificaram-se diferenças estatisticamente significativas entre ambos. O grupo com adição de didrogesterona tinha pacientes mais novas no dia da transferência (34.2 versus 34.9 anos), menor valor de progesterona (9.3 versus 16.2 ng/ml), maior peso (68.7 versus 63.7 kg), IMC superior, homens mais baixos e maior percentagem de homens que nunca fumaram. É importante referir que o critério para utilizar didrogesterona foi um valor de progesterona menor e que estas variáveis estão relacionadas com o valor de progesterona e explicam as diferenças encontradas. Na comparação entre variáveis categóricas verificaram-se diferenças nos hábitos tabágicos dos homens. Nenhuma destas variáveis se relacionou com desfecho na regressão multivariada apresentada acima.

Tabela 13 - Comparação dos resultados entre pacientes que utilizaram ou não utilizaram didrogesterona- variáveis contínuas (Teste t-Student).

	Sem adição de didrogesterona			Com adição de didrogesterona			
	media	mediana	Desvio padrão	media	mediana	Desvio padrão	p-value
Idade na TEC	34.9	36.0	3.77	34.2	35.0	4.45	,034
Espessura endometrial	9.7	9.7	1.76	9.8	9.7	1.78	,692
P4 transferência	16.2	15.4	3.80	9.3	9.6	1.95	<0,001
Duração de infertilidade	60.1	51.0	30.46	64.4	60.0	31.91	,110
Idade na colheita	34.1	35.0	3.79	33.5	34.0	4.37	,087
Peso Mulher	63.7	62.0	12.34	68.7	65.0	14.37	<0,001
Altura da mulher	162.7	163.0	6.41	163.2	163.0	7.19	,399
IMC da mulher	24.1	23.0	4.58	25.8	24.0	5.34	<0,001
Idade do homem	36.3	36.0	4.85	36.8	37.0	6.17	,277
Peso do homem	82.0	80.0	14.60	80.5	80.0	13.12	,214
Altura do homem	176.1	176.0	6.60	174.5	174.0	10.59	,025
IMC do homem	26.4	25.0	4.19	26.8	26.0	7.46	,360
Dose de gonadotrofinas	2578.3	2475.0	803.57	2485.1	2250.0	794.36	,181
Óvulos recolhidos	15.3	14.0	8.23	15.7	15.0	8.09	,607
óvulos utilizados	14.2	13.0	7.63	14.6	14.0	7.45	,548
2PN	9.6	8.0	5.55	9.7	8.0	5.47	,888

Tabela 14 - Comparação entre pacientes que utilizaram ou não utilizaram didrogesterona- variáveis categóricas (teste de Qui-Quadrado).

		sem adição de didrogesterona		com adição de didrogesterona		
	n total	n	%	n	%	p-value
Dia da transferência						
Blastocisto 5º dia	567	415	83%	152	84%	0.907
Blastocisto 6º dia	112	83	17%	29	16%	
Nº de embriões transferidos						
1 embrião	536	400	80%	136	75%	0.166
2 embriões	143	98	20%	45	25%	
Ciclo diferido						

		sem adição de didrogesterona		com adição de didrogesterona		
	n total	n	%	n	%	p-value
Ciclo não diferido	108	79	16%	29	16%	1
Ciclo diferido	571	419	84%	152	84%	
Mulher tem filhos						
Não	55	437	88%	150	83%	0.127
Sim	3	61	12%	31	17%	
Homem tem filhos						
Não	581	429	86%	152	84%	0.462
Sim	98	69	14%	29	16%	
Etnia da mulher						
Caucasiana	584	426	86%	158	87%	0.618
Não caucasiana	95	72	14%	23	13%	
Etnia do homem						
Caucasiana	598	441	89%	157	87%	0.506
Não caucasiana	81	57	11%	24	13%	
Causa de infertilidade						
Múltiplos factores femininos	171	124	25%	47	26%	0.534
Fator masculino	194	144	29%	50	28%	
Fatores feminino e masculino	85	61	12%	24	13%	
Infertilidade inexplicada	161	124	25%	37	20%	
Fator ovulatório	68	45	9%	23	13%	
Tipo de fecundação						
FIV	420	298	60%	122	67%	0.166
ICSI	236	181	36%	55	30%	
Misto FIV/ICSI	23	19	4%	4	2%	
Hábitos Tabágicos da Mulher						
Anteriores	132	97	19%	35	19%	0.614
Nunca	395	285	57%	110	61%	
Presentes	152	116	23%	36	20%	

		sem adição de didrogesterona		com adição de didrogesterona		
	n total	n	%	n	%	p-value
Hábitos Tabágicos do Homem						
Anteriores	142	118	24%	24	13%	0.010
Nunca	292	203	41%	89	49%	
Presentes	245	177	36%	68	38%	
Ordem TEC						
1	439	328	66%	111	61%	0.203
2	179	131	26%	48	27%	
3 ou mais	61	39	8%	22	12%	
Idade na colheita						
<35 anos	344	244	49%	100	55%	0.29
35-37 anos	176	136	27%	40	22%	
38-39 anos	159	118	24%	41	23%	

3.8.1 Sub-grupo de progesterona 10-12.5 ng(dl):

A análise de sensibilidade feita através de uma análise visual sugeriu que o grupo com valores de progesterona entre [10.5.12.8[poderá apresentar uma menor taxa de gravidez, de gravidez evolutiva e uma maior taxa de aborto.

Quando comparámos o grupo percentil 20-40 ([10.5.12.8[) contra todos os outros com o teste de Qui-Quadrado, verificamos que os resultados não são estatisticamente diferentes para $p < 0.05$. apesar de uma tendência para um pior resultado sobretudo para gravidez evolutiva (Tabela 15 e Figura 19).

Tabela 15 - Comparação entre o grupo com progesterona [10.5.12.8[e os restantes (teste de Qui-quadrado)

	N	Taxa de gravidez		Taxa de gravidez gravidez evolutiva		Taxa de Aborto	
		%	p-value	%	p-value	%	p-value
Restantes	546	66%	0.190	45%	0.051	33%	0.145
[10.5.12.8[	133	59%		36%		41%	

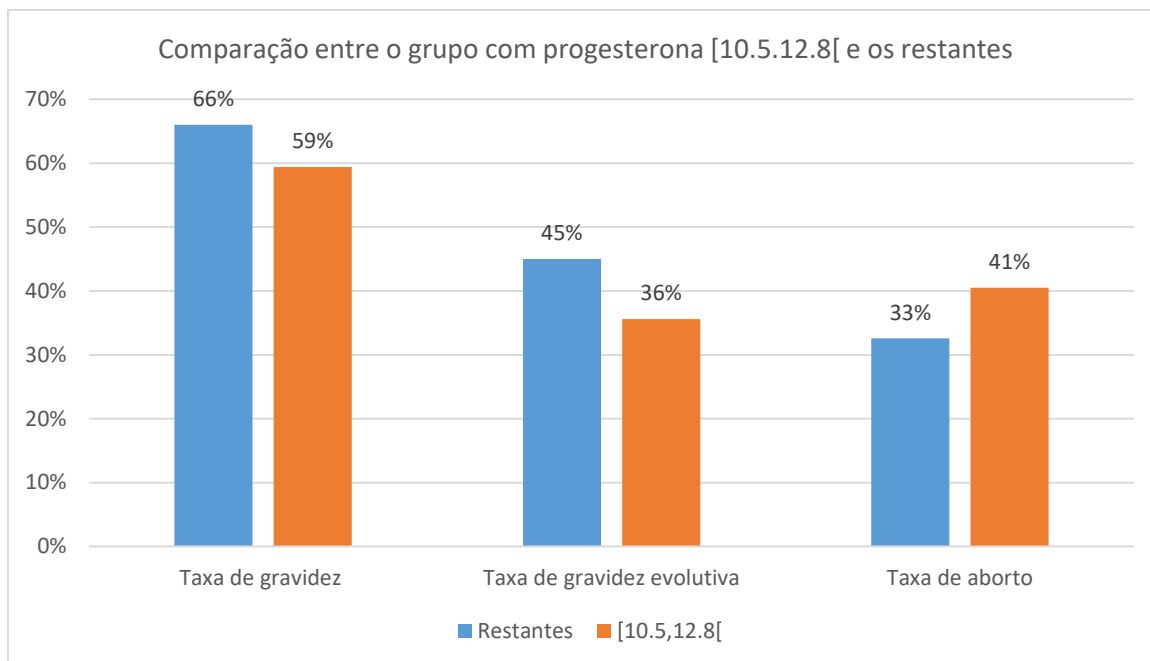


Figura 19- Comparação das taxas de gravidez evolutiva entre o grupo com progesterona [10.5.12.8[e os restantes (teste de Qui-quadrado)

Do ponto de vista temporal, entre Junho de 2020 e Dezembro de 2020 as pacientes com níveis de progesterona inferiores a 10.0 ng/ml foram suplementadas com didrogesterona. No entanto após janeiro de 2021 a suplementação alargou-se até níveis de 12.5ng/ml.

Por este motivo decidiu-se avaliar os resultados das pacientes com níveis de progesterona entre 10.0ng/ml e 12.5ng/ml de acordo com a administração ou não de didrogesterona.

Identificaram-se 132 casos pertencentes a este intervalo, 58 sem adição de didrogesterona e 74 com. Como se pode verificar através da Tabela 16, não se verificaram alterações estatisticamente significativos, no teste de Qui-Quadrado. Os resultados podem ser visualmente comparados na Figura 20.

Tabela 16 - Resultados comparativos entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5 ng/ml[(teste de Qui-Quadrado)

	n	Taxa de gravidez		Taxa de gravidez gravidez evolutiva		Taxa de Aborto	
		%	p-value	%	p-value	%	p-value
Sem adição de didrogesterona	58	53%	0.489	38%	0.865	29%	0.464
Com adição de didrogesterona	74	59%		36%		39%	

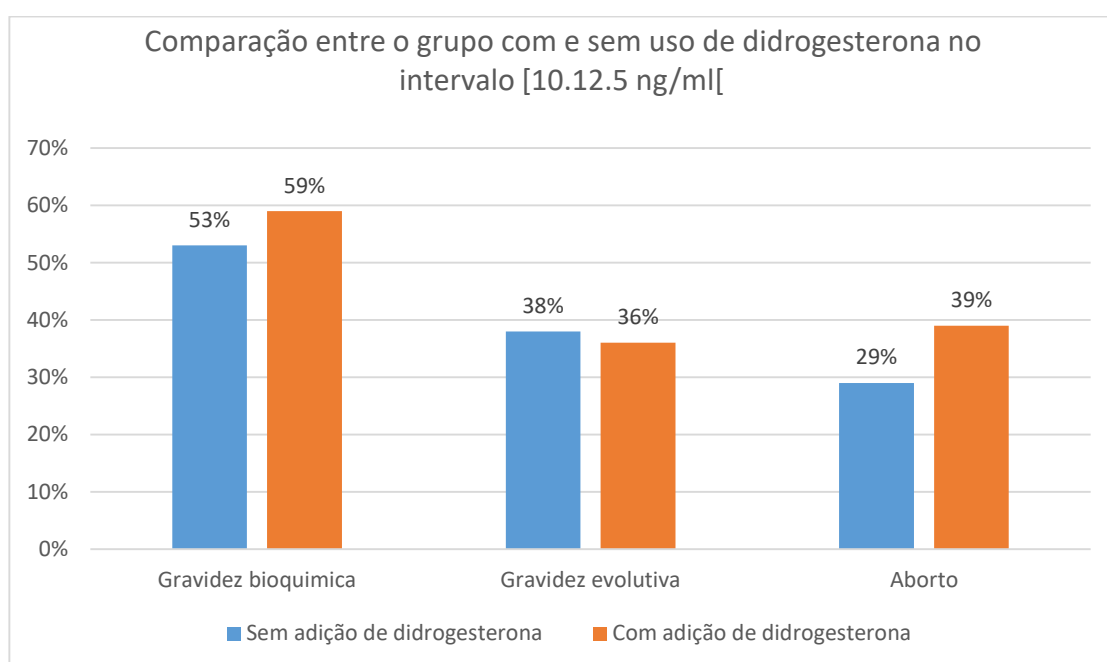


Figura 20- Comparação entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5[ng/ml

Os dois grupos foram comparados para avaliar diferenças entre eles (Tabela 17 e 18). Apenas se encontrou diferença na dose de gonadotrofinas utilizada (2787 versus 2433 UIs), na percentagem de ciclos diferidos (71% versus 86%), nos hábitos tabágicos do homem e na ordem das transferências e na idade da colheita categorizada.

Tabela 17- Comparação entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5[ng/ml, variáveis quantitativas (teste de t de Student)

	sem adição de didrogesterona (n=58)			com adição de didrogesterona (n=74)			
	média	mediana	Desvio padrão	média	mediana	Desvio padrão	p-value
Idade na TEC	34.9	35	3.45	34	34.0	4.50	,117
Espessura endometrial	9.5	9.5	1.59	10	9.7	1.95	,563
P4 transferência	11.3	11.35	0.75	11	11.1	0.78	,195
Duração de infertilidade	63.4	56.5	32.50	59	51.0	29.10	,360
Idade na colheita	34.1	34.5	3.42	33	33.5	4.51	,149
Peso Mulher	68.6	65	14.45	67	63.0	14.07	,468
Altura Mulher	162.6	161.5	6.75	163	163.5	6.62	,611
IMC mulher	26.0	26	5.62	25	24.0	5.09	,325
Idade homem	36.3	36.5	4.42	37	37.5	5.83	,465
Peso homem	81.5	78	13.25	79	80.0	11.49	,243
altura homem	175.3	175	5.90	174	175.0	13.78	,550
IMC homem	26.5	26	3.57	27	25.0	10.66	,766
Dose de gonadotrofinas	2787	2775	872	2433	2250	833	,019
Óvulos recolhidos	12.6	11	6.65	15	15.0	8.93	,064
óvulos utilizados	12.0	11	6.22	14	12.5	7.87	,125
2PN	8.1	7	4.28	9	8.0	5.70	,130

Tabela 18 - Comparação das gravidezes entre o grupo com e sem uso de didrogesterona no intervalo [10.12.5[ng/ml, variáveis qualitativas (teste Qui-Quadrado)

		sem adição de didrogesterona		com adição de didrogesterona		
	n total	n	%	n	%	p-value
Dia da transferência						
Blastocisto 5º dia	107	49	84%	58	78%	0.503
Blastocisto 6º dia	25	9	16%	16	22%	
Nº de embriões transferidos						
1 embrião	100	47	81%	53	72%	0.227

		sem adição de didrogesterona		sem adição de didrogesterona		
	n total	n	%	n	%	p-value
2 embriões	32	11	19%	21	28%	
Ciclo diferido						
Ciclo não diferido	27	17	29%	10	14%	0.031
Ciclo diferido	105	41	71%	64	86%	
Mulher com filhos						
Não	119	55	95%	64	86%	0.145
Sim	13	3	5%	10	14%	
Homem com filhos						
Não	114	54	93%	60	81%	0.072
Sim	18	4	7%	14	19%	
Etnia da mulher						
Caucasiana	114	49	84%	65	88%	0.616
Não caucasiana	18	9	16%	9	12%	
Etnia do homem						
Caucasiana	119	51	88%	68	92%	0.56
Não caucasiana	13	7	12%	6	8%	
Causa de infertilidade						
Múltiplos factores femininos	38	19	33%	19	26%	0.086
Fator masculino	34	17	29%	17	23%	
Fatores feminino e masculino	17	7	12%	10	14%	
Infertilidade inexplicada	30	14	24%	16	22%	
Fator ovulatório	13	1	2%	12	16%	
Tipo de fecundação						
FIV	91	40	69%	51	69%	0.967
ICSI	37	16	28%	21	28%	
Misto FIV/ICSI	4	2	3%	2	3%	
Hábitos Tabágicos da Mulher						

		sem adição de didrogesterona		sem adição de didrogesterona		
	n total	n	%	n	%	p-value
Anteriores	28	14	24%	14	19%	0.672
Nunca	76	31	53%	45	61%	
Presentes	28	13	22%	15	20%	
Hábitos Tabágicos do Homem						
Anteriores	23	16	28%	7	9%	0.019
Nunca	60	25	43%	35	47%	
Presentes	49	17	29%	32	43%	
Ordem TEC						
1	84	40	69%	44	59%	0.021
2	35	17	29%	18	24%	
3 ou mais	13	1	2%	12	16%	
Idade na colheita						
<35 anos	74	29	50%	45	61%	0.026
35-37 anos	73	21	36%	12	16%	
38-39 anos	25	8	14%	17	23%	

Fez-se uma outra avaliação: segmentou-se o grupo de pacientes que fizeram didrogesterona em dois grupos pela mediana (9.6 ng/ml) (Tabela 19). Utilizando o teste de Qui-quadrado não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A Figura 21 ilustra graficamente as observações realizadas.

Tabela 19 - Resultados comparativos das gravidezes entre pacientes que utilizaram Didrogesterona de acordo com o valor de progesterona (teste Qui-Quadrado)

		Gravidez bioquímica		Gravidez gravidez evolutiva		Aborto	
	n	%	P- value	%	P- value	%	p-value
[4.2.9.6]	90	65.6%	0.539	42.2%	0.763	35.6%	0.907
[9.6.12.4]	91	60.4%		39.6%		34.5%	

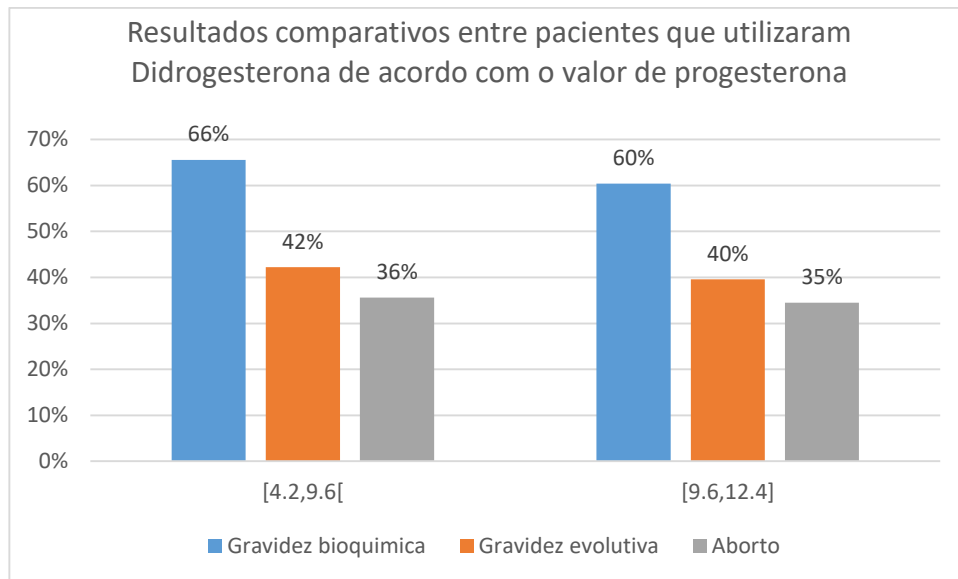


Figura 21- Resultados comparativos entre pacientes que utilizaram Didrogesterona de acordo com o valor de P4

De acordo com estas duas avaliações não parece haver diferenças nas taxas de gravidez, gravidez evolutiva ou aborto nos ciclos com valores de progesterona entre 10 e 12.5ng/ml com ou sem suplementação com didrogesterona.

4 DISCUSSÃO

4.1 Considerações iniciais

Nos últimos anos assistiu-se a um aumento marcado no número de TECs resultantes de ciclos FIV/ICSI. Pela sua comodidade a aparente não inferioridade nos resultados os ciclos hormonalmente substituídos são frequentemente utilizados. No entanto, a literatura recente sugere que os resultados finais (gravidez, gravidez evolutiva ou parto) podem estar relacionados com os níveis de progesterona observados a meio da fase lútea. Nos ciclos substituídos o valor de progesterona observado é dependente por um lado do tipo e dose de medicação administrada e por outro de variáveis inerentes ao paciente.

Vários trabalhos são consistentes a demonstrar que valores menores de progesterona (abaixo do percentil 30) estão associados a resultados inferiores. Por exemplo, no trabalho de Labarta et al. [37] a taxa de gravidez evolutiva foi cerca de 30% inferior neste grupo de pacientes, valor semelhante ao obtido no trabalho de Gaggiotti-Marre [35] quando comparado o 1º quartil da distribuição da P4, com os outros.

Com base nestes e noutros estudos [31] [15] tornou-se importante avaliar se é possível prever quais as pacientes que terão valores de progesterona baixos e se existe uma estratégia que permita melhorar os resultados em pacientes pertencentes a este grupo.

Este trabalho utilizou dados do CIRMA de 679 ciclos realizados entre Junho de 2019 e Março de 2022. Nesta amostra, todas as pacientes utilizaram a mesma dose de progesterona. Esta hormona foi medida sistematicamente na manhã do sexto dia de toma, imediatamente antes da transferência de embriões. Todas as pacientes com níveis inferiores a 10 ng/ml foram suplementadas com DYD e uma parte das pacientes com valores entre 10-12.5ng/ml foi também suplementada. Com base nesta amostra procurou-se avaliar como ocorre a distribuição dos valores de progesterona no dia da transferência de blastocistos e avaliar se variáveis como o peso, o IMC, a idade, o tabagismo ou a etnia da mulher podem influenciar os valores séricos de progesterona. Procurou-se determinar se é possível prever com rigor quais as pacientes que terão níveis baixos de progesterona, evitando uma análise adicional.

Por outro lado, foi também objetivo do estudo avaliar se o resultado dos ciclos em que se fez suplementação com didrogesterona é diferente dos ciclos com valores de progesterona considerados normais.

4.2 Análise global dos dados - Gravidez evolutiva

Dos 679 casos considerados, verificou-se uma taxa de global de gravidez de 64% e uma taxa de gravidez evolutiva de 43%, com uma taxa de aborto de 33%.

Numa análise univariada verificou-se que quer a idade da mulher no dia da colheita de ovócitos quer a espessura do endométrio eram significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre ciclos com e sem gravidez evolutiva, favorecendo mulheres mais jovens e endométrios mais espessados. Relativamente às variáveis categóricas verificou-se uma diferença estatisticamente significativa para o dia da transferência favorável ao 5º dia e para transferências de 2 versus 1 embrião.

De acordo com os resultados obtidos fez-se uma análise multivariada onde foi evidente que a idade da mulher no dia da colheita, a medida do endométrio, o dia de chegada a blastocisto e o nº de embriões transferidos se relacionaram com o desfecho favorável de gravidez evolutiva. Apesar dos resultados obtidos a qualidade do ajuste não foi adequada, tal como não se obteve um valor adequado com o teste de Hosmer e Lemeshow sugerindo que o modelo não é adequado para explicar os dados.

A análise multivariada do trabalho de Zhang [54], que incidiu sobre 1853 ciclos concluiu que a idade da mulher, o IMC, o nº de embriões transferidos e a espessura endometrial contribuíam para explicar o resultado final. Os valores de progesterona não foram avaliados, nem foram avaliados o dia de chegada a blastocisto. O aumento da idade há muito que é associada a um desfecho pior. A taxa de embriões aneuploides parece ser menor em mulheres entre 26 e 30 anos, sendo que aumenta gradualmente de uma forma não linear após os 30 anos [55]. Poderão também verificar-se alterações a nível endometrial em mulheres mais velhas.

Ainda que rodeado de alguma controvérsia, vários trabalhos concluem a favor de uma relação entre a espessura endometrial e um resultado favorável. Háyashi [56] numa coorte de 938 ciclos encontrou uma correlação positiva, com uma tendência linear. O endométrio irá receber e permitir os primeiros passos do desenvolvimento embrionário,

pelo que é plausível que do ponto de vista biológico tenha um papel importante no sucesso do tratamento.

Por outro lado tem sido relativamente consensual que embriões que atingiram o nível de blastocisto ao 5º dia de desenvolvimento estão associados a melhor resultado. O trabalho de Tubbing *et al.* mostra uma taxa de parto de 34% versus 16% [57]. Conclusão semelhante teve Yerushalmi [58], com taxas de parto de 26.9% versus 14.8%. Outros sugerem que esta diferença pode estar explicada sobretudo por diferenças na qualidade dos embriões e que a taxa seria semelhante se se comparasse apenas embriões de boa qualidade [59]. Aqui é importante realçar que a qualidade embrionária não foi um dos parâmetros avaliados neste trabalho.

A transferência de 2 embriões versus 1 é um fator tradicional de sucesso [60]. Nos últimos anos, sobretudo em pacientes mais jovens e de bom prognóstico o número de transferências de embriões únicos tem aumentado, sobretudo com o objetivo de limitar o número de gravidezes gemelares pelos riscos inerentes.

4.3 Variação nos níveis de progesterona

De acordo com o descrito acerca da farmacocinética da progesterona administrada por via vaginal, esta pode ser monitorizada a partir do 2º dia de administração, dado que atinge o seu valor estável (*steady state*) 6 horas após a sua aplicação, mantendo-se durante 24 horas [23] [24]. No entanto, estes estudos são habitualmente realizados em pacientes com IMC entre 20-25 kg/m².

Este estudo incluiu 679 pacientes, submetidos à mesma dose de medicação e durante o mesmo período de tempo. Foi possível verificar uma variabilidade grande nos resultados observados, com valores de progesterona que variaram entre um mínimo de 4.2 e um máximo de 32.3 ng/ml, uma média de 14.4 ± 4.6 e mediana de 13.9 ng/ml, seguindo uma distribuição gama. Estes valores são ligeiramente superiores aos obtidos nos estudos de Labarta [37] e [35]. No primeiro a média variou entre 12.9 ± 8.6 ng/ml versus 11.5 ± 5.4 ng/ml de acordo com a hora da última toma de progesterona, enquanto no segundo a média foi de 11.3 ± 5.1 ng/ml. A variação verificada pode estar relacionada com características próprias dos pacientes ou possivelmente com os métodos laboratoriais utilizados. Por este motivo, sempre que possível optou-se por avaliar o impacto da

variação dos valores de progesterona em termos relativos (percentis) e não em termos absolutos.

Para avaliar a relação entre a variação dos níveis de progesterona e as variáveis relacionadas fez-se inicialmente uma avaliação de correlação entre as variáveis. Verificou-se uma correlação negativa muito fraca, mas estatisticamente significativa ($p < 0.05$) com o peso (-0.233), IMC (-0.232). Para a regressão logística multivariada consideraram-se as variáveis inerentes à mulher: idade no dia da transferência, peso, hábitos tabágicos e etnia. Verificou-se que um peso menor, etnia caucasiana e idade maior estão relacionados de forma positiva com o valor de progesterona. Apesar da qualidade do ajuste ser adequado, os intervalos de confiança obtidos para as razões de chances das diferentes variáveis torna a sua utilidade do ponto de vista clínico limitada..

Trabalhos anteriores relacionam o maior peso com um valor menor de progesterona circulantes [37]. O trabalho de González-Foruria [61] mostrou que o peso, ciclo prévio com valor de progesterona baixa e hora da colheita de sangue podem ajudar a explicar o valor de progesterona obtido. As variações poderão estar relacionadas com capacidade de absorção ou de eliminação diferente entre pacientes, por exemplo uma mucosa mais fina nas mulheres mais velhas pode ajudar a explicar uma melhor absorção [62]. A diferente distribuição de massa gorda associada ao peso pode ser outro dos fatores [63], [32].

4.4 Comparação dos resultados entre ciclos com e sem didrogesterona adicionada

Os ciclos foram divididos em 5 grupos - quintis de acordo com os valores séricos de progesterona (Figura 15). Não se verificou uma tendência clara nos dados. No entanto o pior resultado foi verificado no intervalo [10.5.12.8[ng/ml.

Seguidamente foram feitas duas avaliações, uma primeira onde se compararam os ciclos com recurso a didrogesterona contra os que não utilizaram este fármaco e outra procurou avaliar o grupo com pior desempenho - o 2º quintil.

A primeira avaliação concluiu que a taxa de gravidez bioquímica, gravidez evolutiva ou de aborto eram estatisticamente semelhantes.

As variáveis entre os dois grupos foram comparadas, verificando-se que o grupo com adição de didrogesterona tinha pacientes mais novas no dia da transferência (34.2

versus 34.9 anos), progesterona menor (9.3 versus 16.2 ng/ml), peso (68.7 versus 63.7 kg) e IMC superior. A altura dos homens era também inferior. Na comparação entre variáveis categóricas verificaram-se diferenças nos hábitos tabágicos dos homens.

Recorde-se que a didrogesterona foi adicionada nos ciclos com valores de progesterona mais baixos e que os níveis de progesterona são dependentes do peso e do IMC pelo que estas diferenças se encontram pelo menos parcialmente justificadas. A altura do homem e os hábitos tabágicos não se mostraram relevantes para explicar a gravidez evolutiva, na avaliação uni ou multivariada.

Daqui conclui-se que não parecem existir diferenças nos resultados entre pacientes com ou sem utilização de DYD. Este seria o resultado esperado, uma vez que com a utilização deste fármaco é espectável que a quantidade de progesterona a atuar no endométrio passe a ser a adequada para ter um efeito ótimo.

A ideia de suplementar ciclos com valores considerados baixos de progesterona foi já publicada. Cédric-Durnerin *et al.* [34], utilizou um nível de corte de 10 ng/ml em casos com recurso a progesterona vaginal, Brady *et al.*, com recurso a progesterona intramuscular e com valor de corte de 20 ng/ml [32].

Em ambos os casos foi aumentada a dose do fármaco utilizado e não adicionado um diferente. Em nenhum destes casos se verificou uma melhoria dos resultados.

Dois trabalhos mais recentes sugerem uma estratégia diferente, em que mantém a medicação iniciada e adicionam outra de acordo com os valores de progesterona observados antes da transferência embrionária. Labarta *et al.* [64] publicaram um estudo retrospectivo em que demonstram que pacientes com valores de progesterona baixo (9.2ng/ml) na sua coorte quando suplementados com progesterona sub-cutânea na dose de 25 mg/dia (550 casos, correspondentes a 29.7% da amostra) têm resultados semelhantes aos que têm um valor superior (44.9 versus 45.2 % de gravidez evolutiva). Por outro lado, esta taxa é superior aos obtidos num controlo histórico (38%) de pacientes semelhantes que não foram suplementados, ainda que estes grupos possam apresentar algumas diferenças.

Outro estudo, este prospetivo, mais recente [65], em que todas as pacientes com níveis de progesterona inferiores a 10.6ng/ml (cerca de 37.8% a amostra) foram suplementados com progesterona sub-cutânea 25mg/dia, iniciada um dia antes da transferência. Verificaram uma taxa de gravidez evolutiva no grupo intervenção de 49.6%

versus 43.6% (sem diferença estatisticamente significativa). Não foram feitas sub-análises.

A segunda avaliação comparou o 2º quintil com os outros e verificou que a taxa de gravidez evolutiva era inferior (36% versus 45%) ainda que não estatisticamente significativa ($p=0.051$). Curiosamente este quintil junta muitos casos que foram submetidos a estratégias diferentes do ponto de vista temporal. Entre Junho de 2020 e Dezembro de 2020 as pacientes com níveis de progesterona inferiores a 10.0 ng/ml foram suplementadas com didrogesteron e após janeiro de 2021 a suplementação alargou-se até níveis de 12.5ng/ml.

Por este motivo decidiu-se avaliar os ciclos dos 132 pacientes pertencentes a este intervalo de acordo com a administração ou não de didrogesteron (58 sem adição de didrogesteron e 74 com). Não se verificaram diferenças entre os grupos no contexto.

Ainda assim optou-se por fazer uma análise diferente. Dividiu-se o grupo que fez didrogesteron adicional em 2 de acordo os níveis de progesterona ([4.2,9.6[, [9.6,12.4]). Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tal como a progesterona vaginal a administração de didrogesteron também está associada a uma variabilidade plasmática do seu metabolito 20 α -dihydrodydrogesteron. O trabalho de Neumann [66] recorreu a uma suplementação lútea apenas com didrogesteron 10mg (tid). Concluíram que a taxa de gravidez evolutiva estava significativamente reduzida nos ciclos do primeiro quartil 8% versus 27% nas restantes. Infelizmente o doseamento da 20 α -dihydrodydrogesteron exige requisitos laboratoriais especiais que não estão facilmente disponíveis, o que torna difícil a sua utilização na prática clínica.

Por outro lado Alsbjerg [67] publicou um trabalho com estratégia um pouco diferente em que as pacientes submetidas a ciclos hormonalmente substituídos foram simultaneamente suplementadas com progesterona vaginal e rectal. A medição analítica foi feita alguns dias depois da transferência embrionária, o que significa que todas as pacientes foram submetidas a um protocolo semelhante e nenhuma estratégia de correção foi realizada. Observaram uma relação não linear entre os níveis de progesterona e a taxa de gravidez evolutiva de forma que níveis inferiores a 8.8 ng/ml ou superiores a 14.2ng/ml tiveram resultados piores (36% versus 39% versus 53%, com $p=0.08$). A regressão logística que foi feita ajustada para idade materna, IMC, qualidade do blastocisto e dia de

chegada a blastocisto e mostrou uma razão de chance para gravidez evolutiva de 0.48 (0.18 to 1.24; $p = 0.13$) se progesterona inferior a 8.8ng/ml e OR de 0.53 (0.30 to 0.97; $p = 0.04$) se valores acima de 14.5 ng/ml.

Lan N Vuong [60] publicou uma estudo prospetivo não randomizado com dois grupos de pacientes, um fez suporte lúteo apenas com progesterona vaginal micronizada 400 mg bi-diária (732 pacientes) e outro além da progesterona adicionou DYD oral bi-diário (632 pacientes). No global, os investigadores concluíram que a taxa de parto foi globalmente superior no grupo progesterona vaginal + DYD (46.3% versus 41.3%, com $p=0.06$), e menor taxa de aborto ($p=0.009$). Os resultados de ambos os grupos foram subdivididos de acordo com quantis de valor de progesterona observados um dia antes da transferência. Aqui não se observaram diferenças estatisticamente significativas, no entanto a taxa de parto foi de 49.5% versus 40.6% no 1º quantil (0.873 a 10.9 ng/ml), 46.3% versus 42.8% no 2º (10.9 a 13.9 ng/ml), 49.7% versus 44% no 3º (13.9 a 18.2 ng/ml) e 39.4% versus 38% no 4º (18.2 a 207 ng/ml). De uma forma simplista parece verificar-se uma diferença maior para níveis de progesterona mais baixa e por outro lado não se verifica uma diminuição aparente nos resultados para pacientes com valores de progesterona altos suplementados com DYD. No entanto é importante realçar que os pacientes desta amostra apesar de apresentarem uma mediana igual à da amostra desta tese, apresentaram valores de progesterona que parecem dispares nos extremos.

4.5 Considerações finais

Na prática, é muito difícil tirar conclusões definitivas. Parece claro que níveis muito baixos de progesterona plasmática no dia da transferência beneficiam de suplementação. No entanto, este trabalho sugere, com algum suporte na literatura que poderá existir um valor máximo de progesterona, a partir do qual o suporte adicional tenha que ser ajustado. O facto de ser muito difícil avaliar níveis plasmáticos do metabolito da didrogesterona- o 20α -dihidrodidrogesterona e o facto de se conhecer muito pouco entre a ação conjunta deste metabolito associado à progesterona vaginal podem atrasar a resposta a esta questão. Por outro lado, o facto de se verificarem diferenças entre populações e entre métodos de análise também podem contribuir para acrescentar algumas dúvidas.

Como pontos fortes deste estudo salienta-se o facto dos dados terem sido obtidos a partir de um único centro, durante um período de tempo contínuo que se prolongou por

33 meses. Todos os pacientes foram sujeitos ao mesmo protocolo com exceção do critério para adicionar didrogesteronona que diferiu de acordo com 2 fases temporais. A avaliação laboratorial foi também realizada no mesmo centro.

No que respeita ao tamanho da amostra este é um dos maiores trabalhos conhecidos que aborda esta temática.

Como pontos negativos do trabalho refere-se o facto de se tratar de um estudo retrospectivo e por este motivo existir sempre alguma heterogeneidade entre os grupos e sub-grupos formados. Tentou-se avaliar e corrigir alguns dos vieses inerentes a este tipo de estudo, nomeadamente quando se avaliaram as variáveis associadas a um desfecho positivo e quando se fez uma análise de sensibilidade. Trabalhos anteriores sugerem que o intervalo entre a última toma de progesterona vaginal e a hora do doseamento podem ter impacto no valor observado. Ainda que todos os pacientes tenham seguido o mesmo protocolo e que os doseamentos tenham sido feitos à mesma hora, não foi confirmada a hora da última toma.

Por outro lado, o facto de existir uma parte da amostra que foi submetida a um protocolo diferente- pacientes com níveis de progesterona entre 10.0 e 12.4 ng/ml em que umas foram expostas a didrogesteronona pode constituir um viés quando procuramos analisar o uso deste fármaco neste grupo específico. Outro ponto importante é que os níveis plasmáticos de didrogesteronona não foram avaliados, sendo que à data parece que a sua absorção pode também ser muito variável e desta forma contribuir de forma positiva ou negativa de acordo com as características das pacientes.

O resultado final ideal a ser avaliado deve ser o parto e não a gravidez evolutiva. No entanto, considerando sobretudo as perdas de seguimento e a proximidade entre a taxa de parto e a taxa de gravidez evolutiva após as 10 semanas esta variável é frequentemente utilizada neste tipo de estudos.

Como perspetivas futuras poderá ser importante estudar o impacto de níveis mais altos de progesterona no desfecho final e em estudos futuros dosear a didrogesteronona e relacioná-la com os valores plasmáticos de progesterona e o resultado final. O desenho de um estudo prospetivo deste tipo exige uma população considerável, recursos próprios também importantes e monitorização contínua que permita múltiplas avaliações temporais por forma a interromper o estudo se se verificar que determinadas associações estão associadas a um desfecho negativo.

5 CONCLUSÕES

Os valores de progesterona observados seguem uma distribuição gama, com média 14.4 e desvio padrão de 4.6 ng/ml.

As variáveis: idade da mulher no dia da transferência, a etnia e o peso podem ajudar a explicar as variações nos valores de progesterona observados. Uma idade menor, a etnia caucasiana e um peso maior favorecem valores de progesterona menores. No entanto a variabilidade associada é grande pelo que dificilmente estes fatores podem ser utilizados na prática clínica para a tomada de decisões.

A medida do endométrio, o dia de chegada a blastocisto e o número de embriões transferidos relacionaram-se de forma positiva com a possibilidade de gravidez evolutiva.

A didrogesteronona foi administrada em cerca de 26.7% dos casos, sempre em casos com valores de progesterona inferiores a 12.5ng/ml. Não se verificaram diferenças no desfecho avaliado- gravidez evolutiva entre pacientes com e sem administração de didrogesteronona. No entanto, fica por esclarecer se a adição de didrogesteronona a pacientes com valores acima de 10.3 ng/ml terá ou não um efeito positivo.

6 BIBLIOGRAPHY

- [1] WHO-ICMART revised glossary, LINK: definition of infertility.
- [2] “Fertility Matters – What is at stake across Europe regarding fertility for the years to come”, Fertility Europe estimation, 2013.
- [3] ART in Europe, 2017: results generated from European registries. C. Wyns, Ch De Geyter, C. Calhaz-Jorge, M.S. Kupka, T. Motrenko, J. Smeenk, C. Bergh, A. Tandler-Schneider, I.A. Rugescu, S. Vidakovic, V. Goossens. 2021, Human Reproduction Open, pp. Vol.00, No.0, pp. 1–17.
- [4] Relatório de Actividade em PMA. s.l. : CNPMA, 2021.
- [5] Johnson, Martin H. A short history of in vitro fertilization (IVF). 2019, Int. J. Dev. Biol., pp. 63: 83-92.
- [6] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. 1978, Lancet, p. 12;2:366.
- [7] Devroey P, Polyzos NP, Blockeel C. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. An OHSS-Free Clinic by segmentation of IVF treatment. 2011, Hum Reprod , pp. 26:2593–7.
- [8] Coates A, Kung A, Mounts E, Hesla J, Bankowski B, Barbieri E, Ata B, Cohen J, Munné S. Optimal euploid embryo transfer strategy, fresh versus frozen, after preimplantation genetic screening with next generation sequencing: a randomized controlled trial. 2017, Fertil Steril. , pp. 107:723-30.e3. .
- [9] Blesa D, Ruiz-Alonso M, Simón C. Clinical management of endometrial receptivity. 2014, Semin Reprod Med , pp. 32:410–413.
- [10] Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. 1999, N Engl J Med. , pp. Jun 10;340(23):1796-9.
- [11] Hull, M.G., Savage, P.E., Bromham, D.R. The value of a single serum progesterone measurement in the midluteal phase as a criterion of a potentially fertile cycle (‘ovulation’) derived from treated and untreated conception cycles. 1982, Fertil. Steril., pp. 37: 355–360.
- [12] Jordan, J., Craig, K., Clifton, D.K., Soules, M.R Luteal phase defect: the sensitivity and specificity of diagnostic methods in common clinical use .. 1994, Fertil. Steril., pp. 62: 54–62.

- [13] Murray MJ, Meyer WR, Zaino RJ, Lessey BA, Novotny DB, Ireland K, Zeng D, Fritz M. A critical analysis of the accuracy, reproducibility, and clinical utility of histologic endometrial dating in fertile women. 2004, *Fertil Steril*, pp. 81:1333–43.
- [14] Kofinas JD, Blakemore J, McCulloh DH, Grifo J. Serum progesterone levels greater than 20 ng/dl on day of embryo transfer are associated with lower live birth and higher pregnancy loss rates. 2015, *J Assist Reprod Genet*, pp. Sep;32(9):1395-9.
- [15] Yovich JL, Conceicao JL, Stanger JD, Hinchliffe PM, Keane KN. Mid-luteal serum progesterone concentrations govern implantation rates for cryopreserved embryo transfers conducted under hormone replacement. 2015, *Reprod Biomed Online*, pp. Aug;31(2):180-91.
- [16] Basnayake SK, Volovsky M, Rombauts L, Osianlis T, Vollenhoven B, Healey M. Progesterone concentrations and dosage with frozen embryo transfers - What's best? . 2018, *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, pp. Oct;58(5):533-538.
- [17] Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT analyzer. 2006, *Clin Chem Lab Med*, pp. ;44(7):883–887.
- [18] Groenewoud, E.R., Cohlen, B.J., Macklon, N.S. Programming the endometrium for deferred transfer of cryopreserved embryos: hormone replacement versus modified natural cycles. 2018, *Fertil. Steril.*, pp. 109: 768–774.
- [19] Yarali H, Polat M, Mumusoglu S, Yarali I, Bozdag G. Preparation of endometrium for frozen embryo replacement cycles: a systematic review and meta-analysis. 2016, *J Assist Reprod Genet* , pp. 33:1287–1304.
- [20] El-Toukhy T, Coomarasamy A, Khairy M, Sunkara K, Seed P, Khalaf Y, Braude P. The relationship between endometrial thickness and outcome of medicated frozen embryo replacement cycles.. 2008, *Fertil Steril* 2008;89: 832–839, pp. 89: 832–839.
- [21] Neumann K, Depenbusch M, Schultze-Mosgau A, Griesinger G. Characterization of early pregnancy placental progesterone production by use of dydrogesterone in programmed frozen-thawed embryo transfer cycles. 2020, *Reprod Biomed Online*, pp. 40 (5):743-751.
- [22] Csapo AI, Pulkkinen MO, Wiest WG. Effects of luteectomy and progesterone replacement therapy in early pregnant patients. 1973, *Am J Obstet Gynecol*, pp. 115:759–765.
- [23] Nahoul K, Dehennin L, Jondet M, Roger M Profiles of plasma estrogens, progesterone and their metabolites after oral or vaginal administration of estradiol or progesterone.. 1993, *Maturitas*, pp. May;16(3):185-202.
- [24] Paulson RJ, Collins MG, Yankov VI. Progesterone pharmacokinetics and pharmacodynamics with 3 dosages and 2 regimens of an effervescent micronized progesterone vaginal insert. 2014, *J Clin Endocrinol Metab*, pp. Nov;99(11):4241-9.

- [25] Jing S, Li XF, Zhang S, Gong F, Lu G, Lin G. Increased pregnancy complications following frozen-thawed embryo transfer during an artificial cycle. 2019, *Journal of assisted reproduction and genetics*, pp. 36: 925-933.
- [26] E, Ginström and C., E Wennerholm U-B Khatibi A Petzold M Bergh. Neonatal and maternal outcome after frozen embryo transfer: increased risks in programmed cycles. 2019, *Am J Obstet Gynecol*, pp. Aug;221(2):126.e1-126.e18.
- [27] Gellersen B, Brosens JJ. Cyclic decidualization of the human endometrium in reproductive health and failure. 2014, *Endocr Rev*, pp. 35:851-905.
- [28] van der Linden, M., Buckingham, K., Farquhar, C., Kremer, J.A., Metwally, M. Luteal phase support for assisted reproduction cycles. 2015, *Cochrane Database Syst. Rev*.
- [29] Griesinger G, Tournaye H, Macklon N, Petraglia F, Arck P, Blockeel C, van Amsterdam P, Pexman-Fieth C, Fauser BC. Dydrogesterone: pharmacological profile and mechanism of action as luteal phase support in assisted reproduction. 2019, *Reprod Biomed Online*, pp. Feb;38(2):249-259.
- [30] Rashidi BH, Ghazizadeh M, Nejad EST, et al. Oral dydrogesterone for luteal support in frozen-thawed embryo transfer artificial cycles: A pilot randomized controlled trial. 2016, *Asian Pac J Reprod.* , pp. 5: 490–494.
- [31] Labarta E, Mariani G, Holtmann N, Celada P, Remohí J, Bosch E. Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study. 2017, *Human Reproduction*, pp. Dec 1;32(12):2437-2442.
- [32] Brady PC, Kaser DJ, Ginsburg ES, Ashby RK, Missmer SA, Correia KF, Racowsky C. Serum progesterone concentration on day of embryo transfer in donor oocyte cycles.. 2014, *J Assist Reprod Genet* , pp. 31:569–575.
- [33] Alsbjerg B, Thomsen L, Elbaek HO, Laursen R, Povlsen BB, Haahr T, Humaidan P. Progesterone levels on pregnancy test day after hormone replacement therapy-cryopreserved embryo transfer cycles and related reproductive outcomes. 2018, *Reproductive BioMedicine Online*, pp. Nov;37(5):641-647.
- [34] Cédric-Durnerin I, Isnard T, Mahdjoub S, Sonigo C, Seroka A, Comtet M, Herbemont C, Sifer C, Grynberg M. Serum progesterone concentration and live birth rate in frozen–thawed embryo transfers with hormonally prepared endometrium. 2019, *Reprod Biomed Online*, pp. Mar;38(3):472-480.
- [35] Gaggiotti-Marre S, Martinez F, Coll L, Garcia S, Álvarez M, Parriego M, Barri PN, Polyzos N, Coroleu B. Low serum progesterone the day prior to frozen embryo transfer of euploid embryos is associated with significant reduction in live birth rates. 2019, *Gynecol Endocrinol*, pp. May;35(5):439-442.
- [36] Labarta E, Mariani G, Holtmann N, Celada P, Remohí J, Bosch E Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in

oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study.. 2017, Human Reproduction, pp. Dec 1;32(12):2437-2442. .

- [37] Labarta E, Mariani G, Paoletti S, Rodriguez-Varela C, Vidal C, Giles J, Bellver J, Cruz F, Marzal A, Celada P, Olmo I, Alama P, Remohi J, Bosch E. Impact of low serum progesterone levels on the day of embryo transfer on pregnancy outcome: a prospective cohort study in artificial cycles with vaginal progesterone. 2021, Human Reproduction, pp. Vol.36, No.3, pp. 683–692.
- [38] Alyasin A, Agha-Hosseini M, Kabirinasab M, Saeidi & Maryam H, Nashtaei S. Serum progesterone levels greater than 32.5 ng/ml on the day of embryo transfer are associated with lower live birth rate after artificial endometrial preparation: a prospective study. 2021, Reproductive Biology and Endocrinology volume , pp. 19, 24 .
- [39] Stanczyk, F.Z., Hapgood, J.P., Winer, S., Mishell, D.R.Jr. Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects. 2013, Endocr. Rev. , pp. 34: 171–208.
- [40] Rižner, T.L., Brožič, P., Doucette, C., Turek-Etienne, T., Muller-Vieira, U., Sonneveld, E., van der Burg, B., Bocker, C., Husen, B. Selectivity and potency of the retroprogesterone dydrogesterone in vitro. 2011, Steroids, pp. 76: 607–615.
- [41] Georg Griesinger, Christophe Blockeel, Herman Tournaye. Oral dydrogesterone for luteal phase support in fresh in vitro fertilization cycles: a new standard? 2018, Fertil Steril, pp. May;109(5):756-762.
- [42] Griesinger G, Blockeel C, Kahler E, Pexman-Fieth C, Olofsson JJ, Driessen S, Tournaye H. Dydrogesterone as an oral alternative to vaginal progesterone for IVF luteal phase support: A systematic review and individual participant data meta-analysis. 2020, PLoS One, p. Nov 4;15(11):e0241044.
- [43] Ott J, Egarter C, Aguilera A. Dydrogesterone after 60 years: a glance at the safety profile. 2021, Gynecol Endocrinol, pp. Dec 20:1-9.
- [44] Metello J, Tomás C, Ferreira P, Bravo I, Branquinho M, Santos-Ribeiro S. Impact of Plasmatic Progesterone on the Day of Frozen Embryo Transfer in Hormone-induced Cycles. 2021, Rev Bras Ginecol Obstet, pp. Aug;43(8):608-61.
- [45] Zarei A, Sohail P, Parsanezhad ME, Alborzi S, Samsami A, Azizi M. Comparison of four protocols for luteal phase support in frozen-thawed Embryo transfer cycles: a randomized clinical trial. 2017, Arch Gynecol Obstet, pp. 295:239–246.
- [46] The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. 2011, Hum Reprod., pp. Jun;26 (6):1270-83.
- [47] S. S. Shapiro and M. B. Wilk, "An analysis of variance test for normality (complete samples)," Biometrika, vol. 52 (3–4), no. : 591–611, 1965.
- [48] V. Rohatgi, "Statistical Inference," Dover Publications, 2003.

- [49] H. Levene, "Robust tests for equality of variances," in *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling*, Stanford University Press, 1960.
- [50] A. Agresti, *Categorical Data Analysis.*, Wiley.
- [51] P. a. N. J. McCullagh, (1989) *Generalized Linear Models.*, London: Chapman and Hall, 1989.
- [52] Fox J, Weisberg S. *An R Companion to Applied Regression.* s.l. : Sage Publications, 2011.
- [53] Hosmer D., Lemeshow S. *Applied Logistic Regression.* Nova York : Wiley, 2013.
- [54] Zhang, Q., Wang, X., Zhang, Y. et al. Nomogram prediction for the prediction of clinical pregnancy in Freeze-thawed Embryo Transfer. 2022, *BMC Pregnancy Childbirth*, pp. 22,629.
- [55] Franasiak J., Forman E., Hong K., Werner M., Upham K., Treff N., Scott Jr. R. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. 2014, *Fertility and Sterility*, pp. VOLUME 101, ISSUE 3, P656-663.E1, MARCH 01,.
- [56] Hayashi N, Enatsu N, Iwasaki T, Otsuki J, Matsumoto Y, Kokeguchi S, Shiotani M. Predictive factors influencing pregnancy rate in frozen embryo transfer. 2020, *Reprod Med Biol.*, pp. Mar 11;19(2):182-188.
- [57] Tubbing, A., Shaw-Jackson, C., Ameye, L. et al. Increased live births after day 5 versus day 6 transfers of vitrified-warmed blastocysts. 2018, *J Assist Reprod Genet*, pp. 35, 417–424.
- [58] Yerushalmi, G.M., Shavit, T., Avraham, S. et al. Day 5 vitrified blastocyst transfer versus day 6 vitrified blastocyst transfer in oocyte donation program. 2021, *Sci Rep*, pp. 11, 10715.
- [59] Yang, H., Yang, Q., Dai, S. et al. Comparison of differences in development potentials between frozen-thawed D5 and D6 blastocysts and their relationship with pregnancy outcomes. 2016, *J Assist Reprod Genet*, pp. 33, 865–872.
- [60] Vuong L, Pham T, Le K, Ly T, Le Ho, Nguyen D, Ho V, Dang V, Phung T, Norman R, Mol B, Ho T. Micronized progesterone plus dydrogesterone versus micronized progesterone alone for luteal phase support in frozen-thawed cycles (MIDRONE): a prospective cohort study. 2021, *Human Reproduction*, pp. Volume 36, Issue 7, July 2021, Pages 1821–1831.
- [61] González-Foruria I, Gaggiotti-Marre S, Álvarez M, Martínez F, García S, Rodríguez I, Coroleu B, Polyzos N. Factors associated with serum progesterone concentrations the day before cryopreserved embryo transfer in artificial cycles. 2020, *RBMO*, pp. Volume 40, issue 6, 797-804.
- [62] Levy, T., Yairi, Y., Bar-Hava, I., Shalev, J., Orvieto R., Ben-Rafael, Z. Pharmacokinetics of the progesterone-containing vaginal tablet and its use in assisted reproduction.. 2000, *Steroids, Progestins, Progesterone Receptor Modulators and Progesterone Antagonists*, pp. 65:645-649.

- [63] Edelman, A.B., Cherala, G., Stanczyk, F.Z. Metabolism and pharmacokinetics of contraceptive steroids in obese women: a review. 2010, *Contraception* , pp. 82: 314–323.
- [64] Labarta E, Mariani G, Rodríguez-Varela C, Bosch E. Individualized luteal phase support normalizes live birth rate in women with low progesterone levels on the day of embryo transfer in artificial endometrial preparation cycles. 2022, *Fertil Steril*, pp. Jan;117(1):96-103.
- [65] Álvarez M, Gaggiotti-Marre S, Martínez F, Coll L, García S, González-Foruria I, Rodríguez I, Parriego M, Polyzos N, Coroleu B. Individualised luteal phase support in artificially prepared frozen embryo transfer cycles based on serum progesterone levels: a prospective cohort study. 2021, *Human Reproduction*, pp. , Volume 36, Issue 6, June 2021, Pages 1552–1560.
- [66] Neumann K, Masuch A, Vonthein R, Depenbusch M, Schultze-Mosgau A, Eggersmann T, Griesinger G. Dydrogesterone and 20 α -dihydrodydrogesterone plasma levels on day of embryo transfer and clinical outcome in an anovulatory programmed frozen-thawed embryo transfer cycle: a prospective cohort study. 2022, *Hum Reprod*, pp. May 30;37(6):1183-1193.
- [67] Alsbjerg B, Thomsen L, Elbaek HO, Laursen R, Povlsen BB, Haahr T. Can combining vaginal and rectal progesterone achieve the optimum progesterone range required for implantation in the HRT-FET model? 2020, *Reprod BioMed Online*, pp. ;40:805–811.

Impacto da utilização de didrogesterona em ciclos com níveis de progesterona baixos no dia da transferência de embriões congelados