



LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

### **Seleção embrionária**

Filipa Carolina da Silva Nunes

---

**FEV'2017**



LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



FACULDADE DE  
**MEDICINA**  
LISBOA

# **TRABALHO FINAL**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**

---

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

### **Seleção embrionária**

Filipa Carolina da Silva Nunes

**Orientado por:**

Joaquim Nunes

---

**FEV'2017**

## Resumo/Abstract

Actualmente, observa-se um aumento do número de casais com problemas de infertilidade, o que se relaciona, entre outros factores, com o facto de muitos casais atrasarem o início da constituição de família. Como consequência verifica-se um maior recurso às técnicas de procriação medicamente assistida. Contudo, as técnicas de procriação medicamente assistida apresentam alguns riscos, sobretudo associados à gravidez múltipla. O aumento da gravidez múltipla no grupo que recorre a estas técnicas deve-se à transferência de mais do que um embrião, como prática comum nos diversos laboratórios de procriação assistida com o intuito de maximizar a hipótese de gravidez. Assim sendo, têm sido feitos múltiplos estudos de forma a otimizar a selecção embrionária, para que seja transferido um único embrião, com grande probabilidade de gerar um gravidez viável. Neste trabalho focam-se os diferentes métodos disponíveis para avaliação embrionária pré-implantação. Serão abordados os métodos não invasivos, como: avaliação morfológica; monitorização por *time-lapse*; avaliação da vascularização do folículo; avaliação da composição do fluido folicular; medição da respiração aeróbia, e os métodos invasivos, como: testes genéticos pré-implantação e análise da transcriptoma.

Nowadays there is an increasing number of couples with infertility problems, which is related to the fact that many couples, for different reasons, delay the beginning of their families. As a consequence, there is an increase use of assisted reproduction techniques. There are some risks associated with this technique, related to multiple pregnancy. The increase rate of multiple pregnancy in this group is related with the transfer of more than one embryo, which is a common practice in some laboratories to maximize the chances of pregnancy. There has been an increasing effort to study new approaches to optimize the embryo's selection and to maximize the success of single embryo transfer. In this work, I focus multiples methods used in embryo selection. The noninvasive methods are: morphologic evaluation; time-lapse monitoring; follicular vascularization evaluation; follicular fluid evaluation; oxygen consumption, and the invasive methods are: pre-implantation genetic screening and transcriptome analysis.

### ***Palavras-chave/Key words***

Fertilização in vitro; Selecção embrionária; Avaliação morfológica e cinética; Avaliação genética; Biomarcadores.

In vitro fertilization; Embryo selection; Morphological evaluation and kinetics; Genetic evaluation; Biomarkers.

O Trabalho Final exprime a opinião do autor e não da FML

**Objectivo:**

Com este trabalho pretende-se realizar uma revisão bibliográfica dos métodos de selecção embrionária existentes. Pretende-se contextualizar a infertilidade no panorama geral, focando a importância da transferência de um único embrião, de forma a minimizar o risco de gravidez múltipla. O trabalho está dividido em dois temas principais: os métodos não invasivos e os métodos invasivos de selecção embrionária. Nos métodos não invasivos aborda a avaliação morfológica, monitorização por *timelapse*, análise da vascularização e fluido folicular e medição da respiração aeróbia. Nos métodos invasivos aborda os diversos testes genéticos pré-implantação e a análise da transcriptoma.

**Métodos:**

A pesquisa de literatura foi feita utilizando o *Pubmed* com o uso das seguintes palavras chaves: *embryo selection; morphological criteria; follicular fluid analysis; oxygen consumption; time-lapse; preimplantation genetic screening; transcriptome analysis*.

**Resultados:**

Foram seleccionados artigos, preferencialmente, publicados nos últimos cinco anos e escritos em inglês. Foram consultadas referências citadas pelos artigos analisados.

## Índice

Introdução:.....	6
1. Métodos não invasivos .....	7
a. Avaliação morfológica .....	7
i. Avaliação morfológica no dia 1 após a fertilização.....	7
ii. Avaliação morfológica no dia 3 após a fertilização.....	9
iii. Avaliação morfológica no dia 4-5 após a fertilização .....	11
b. Time-lapse .....	12
c. Análise da vascularização folicular .....	15
d. Análise da composição do fluido folicular .....	16
e. Medição da respiração aeróbia .....	17
2. Métodos invasivos .....	18
a. Testes genéticos pré-implantação.....	18
i. Corpos polares .....	19
ii. Blastómeros .....	20
iii. Trofoectoderme .....	20
b. Análise da transcriptoma .....	21
Conclusão .....	22
Agradecimentos .....	23
Bibliografia:.....	24

## **Introdução:**

A Organização Mundial de Saúde define infertilidade como a incapacidade de atingir uma gravidez clínica após 12 ou mais meses de relações sexuais regulares desprotegidas.

Segundo a *American Society for Reproductive Medicine*, a infertilidade afecta 10%-15% dos casais (48.5 milhões de casais) em todo o mundo. Isto faz com que seja uma das doenças mais frequentes nos indivíduos na faixa etária dos 20 aos 45 anos. Destes, 19.2 milhões nunca engravidaram (Infertilidade primária) e 29.3 milhões não conseguem ter mais uma gravidez (Infertilidade secundária). O número de casais com problemas de infertilidade tem vindo a aumentar desde 1990, altura em que 42 milhões de casais não conseguiam engravidar.

Assim sendo, são muitos os casais que recorrem a técnicas de procriação medicamente assistida, nomeadamente a fertilização in vitro (FIV), uma técnica que já existe há mais de 30 anos e que é responsável pelo nascimento de cerca de 265 000 crianças por ano, mundialmente. (264 495 em 2008, 267 385 em 2009 e 271 882 em 2010).<sup>1</sup> Contudo as técnicas de procriação medicamente assistida apresentam alguns riscos associados à gravidez múltipla. Numa gravidez natural, a probabilidade de gravidez múltipla é de 1%<sup>2</sup> ao passo que, com o recurso às técnicas de procriação medicamente assistidas, esta probabilidade aumenta para 17.9% (Europa), 27.4% (USA) e 6.5% (Austrália/Nova Zelândia)<sup>3</sup>. Associado à gravidez múltipla, existe um risco superior de baixo peso à nascença e prematuridade, aumento do risco de complicações na gravidez como por exemplo a diabetes gestacional, anomalias placentares e complicações hipertensivas<sup>2</sup>. Assim sendo, o cenário ideal será transferir apenas um embrião para gerar apenas uma gravidez. Embora esse seja o cenário ideal, sabe-se que a taxa de implantação média numa mulher com idade inferior a 35 anos (baixo risco) é de 36.8%<sup>4</sup>. Ou seja, num grupo em que o prognóstico é favorável, a maioria dos embriões não implanta. O que justifica que na maioria dos casos se transfira mais do que um embrião para aumentar as hipóteses de sucesso, aumentando-se o risco de gravidez múltipla e de todas as complicações inerentes. Assim, torna-se pertinente otimizar a selecção de embriões, para que se garanta a transferência única de um embrião cuja probabilidade de se desenvolver num feto viável seja elevada.

Actualmente, a selecção de embriões é feita, essencialmente, com base na morfologia do embrião e do seu desenvolvimento em cultura. De tal forma que existe uma crescente investigação nesta área de forma a serem avaliadas novas características e biomarcadores que possam prever a sua probabilidade de implantação e de gerar uma gravidez de termo.

## Seleção de embriões

### 1. Métodos não invasivos

#### a. Avaliação morfológica

A avaliação da morfologia embrionária é o método tradicionalmente utilizado na seleção de embriões. Trata-se de um parâmetro facilmente avaliável, tendo sido o primeiro a ser utilizado nos primórdios da fertilização *in vitro*<sup>5</sup>. Os sistemas de avaliação morfológica dependem da fase do desenvolvimento em que é selecionado o embrião e dos critérios usados na sua avaliação<sup>6</sup>. Não existe um sistema de avaliação comum a todos os laboratórios de procriação medicamente assistida<sup>7</sup>.

#### i. Avaliação morfológica no dia 1 após a fertilização

Após a fusão dos gametas feminino e masculino forma-se o zigoto. Um dos primeiros passos na avaliação da qualidade de um embrião consiste na avaliação morfológica do zigoto (*pronuclear stage embryo quality*). Os zigotos são classificados através de um sistema de avaliação que tem em conta características como: número, equidade, tamanho e distribuição dos nucléolos, tamanho e alinhamento pronuclear, o tempo de clivagem pronuclear e a presença ou ausência de halo citoplasmático. Os principais sistemas de avaliação foram propostos por Scott e Tesarik, contudo estes sistemas têm vindo a sofrer alterações de forma a simplificar o processo de avaliação.

Inicialmente, em 1990, segundo Wright<sup>8</sup>, apenas o alinhamento dos nucléolos na junção dos dois pronúcleos era considerado critério de seleção para a transferência embrionária. Ao verificar-se a melhoria dos *outcomes* no grupo submetido à avaliação morfológica, começou a relacionar-se também a aparência do citoplasma com a qualidade do embrião. Em 1998 foi proposto por Scott<sup>9</sup>, um método que atribui uma classificação ao zigoto consoante a posição dos seus pronúcleos, alinhamento dos nucléolos e aparência do citoplasma. Os embriões com classificação superior a 15 estavam associados a maiores taxas de implantação e gravidez. Em 1999 Tesarik e Greco<sup>10</sup> classificaram os zigotos consoante o tamanho e número bem como distribuição dos nucléolos. Classificando os zigotos como padrão 0,1,2,3,4 e 5. Sendo o padrão 0 considerado o padrão normal e as restantes classificações consideradas desvios do padrão normal. Em 2000 Tesarik et al<sup>11</sup> propôs uma simplificação do sistema anterior, classificando os zigotos como padrão 0 ou não padrão 0. Os zigotos padrão 0, considerados morfológicamente adequados tinham as seguintes características: a diferença no número de nucléolos entre ambos os pronúcleos não excedia 3; a distribuição dos

nucléolos era a mesma em ambos os pronúcleos; a existência de, pelo menos, 3 nucléolos em cada pronúcleo.

No estudo realizado por Scott em 2003, citado no artigo de revisão de Nahid Nasiri<sup>6</sup>, foi proposta uma classificação baseada no tamanho e alinhamento nuclear bem como o número e distribuição de nucléolos, o Z-scoring. A avaliação é feita de Z1 a Z4. Os zigotos Z1 têm número igual de nucléolos alinhados na junção pronuclear. Os zigotos Z2 têm igual número de nucléolos (3 a 6) do mesmo tamanho e distribuídos de forma semelhante. Os zigotos Z3 têm o mesmo número de nucléolos nos dois núcleos, mas num dos núcleos os nucléolos têm diferentes tamanhos e encontram-se dispersos enquanto no outro núcleo os nucléolos têm o mesmo tamanho e encontram-se na junção pronuclear. Os zigotos Z4 apresentam nucléolos localizados periféricamente e com tamanhos muito diferentes.

Em 2005 foi proposto por Senn<sup>12</sup> um método de avaliação em que os zigotos são classificados consoante a proximidade, orientação e centralização dos pronúcleos, número e polarização dos nucléolos e halo citoplasmático, sendo depois feito o score cumulativo destes 6 parâmetros. Segundo este estudo, os padrões dos nucléolos e do halo citoplasmático parecem ser os melhores factores preditivos do sucesso da implantação dos zigotos. Foi Payne et al<sup>13</sup> que identificou, pela primeira vez em 1997, uma zona de citoplasma translúcido imediatamente antes da formação dos pronúcleos masculino e feminino. Esta região, em seguida, envolve todo o citocortex, formando um halo. Pensa-se que este fenómeno seja uma manifestação da translocação organizada através de microtúbulos de mitocôndrias e de outros componentes citoplasmáticos. Pensa-se que este *clustering* de mitocôndrias na região perinuclear esteja envolvido na regulação do ciclo celular através da mobilização de cálcio e libertação de ATP<sup>7</sup>. Em 2007 um estudo feito por Depa-Martynow et al<sup>7</sup> incluiu como critérios de avaliação morfológica: a presença de halo citoplasmático; tamanho e alinhamento pronuclear; número e distribuição dos nucléolos (z-scoring). Neste estudo verificou-se que a polarização dos nucléolos em ambos os pronúcleos de tamanho semelhante (Z1) e a existência de halo citoplasmático, associa-se a embriões de boa qualidade e com bom desenvolvimento. Já a ausência de polarização dos nucléolos nos embriões classificados como Z3 e Z4 é um indicador morfológico da ausência de polarização da cromatina, o que leva a um desenvolvimento mais lento e anormal, verificado neste estudo. Este estudo confirmou a utilidade da aplicação do z-score e da avaliação do halo citoplasmático, em conjunto com a avaliação morfológica no dia 3 após a fertilização, na selecção de embriões com grandes chances de implantar. Esta avaliação permite ajustar o número de embriões a transferir, reduzindo os riscos de

gravidez múltipla. Em 2009 um estudo feito por Brezinova<sup>14</sup> classificou os zigotos em dois grupos: O e Outros, baseado na morfologia pronuclear e na *early cleavage rate*. O padrão “O” consistia em zigotos que apresentavam o mesmo número de pequenos nucléolos nos pronúcleos ou grandes nucléolos com distribuição polar entre os dois pronúcleos. Os zigotos com alinhamento dos nucléolos assimétrico são classificados como “Outros”. O segundo critério avaliado neste estudo foi a primeira divisão mitótica, avaliada entre as 23-27h após a inseminação. Nesta altura, os embriões com 2 blastómeros são classificados como *early cleavage embryos* e os que não apresentam membranas nuclear intactas são classificados como *no early cleavage embryos*. Os resultados deste estudo indicam que os melhores *outcomes* são alcançados se ambos os sistemas de classificação forem usados e quando a classificação final é simultaneamente *early cleavage embryos* e padrão O. Os resultados deste estudo demonstraram que a *early cleavage rate* é melhor marcador independente do potencial de implantação do que a morfologia do zigoto.

#### ii. Avaliação morfológica no dia 3 após a fertilização

Após a formação do zigoto inicia-se a divisão celular, o embrião entra na *cleavage stage*. A divisão do zigoto origina várias células, os blastómeros. Durante esta fase, os blastómeros organizam-se numa massa compacta, a mórula. A *cleavage stage* termina com a formação do blastocisto. A avaliação morfológica dos embriões na *cleavage stage* é feita tendo em conta características como: o número de blastómeros, as irregularidades nos blastómeros, o grau de fragmentação (que consiste em porções de células do embrião que se separaram da porção nucleada da célula) e a multinucleação (quando mais de um núcleo é visualizado num dos blastómeros).

Segundo o *Advanced Fertility Center of Chicago* o embrião deve apresentar: 2 a 4 blastómeros às 48h após a aspiração oocitária e 7 a 10 blastómeros às 72h; os blastómeros devem ter tamanhos semelhantes (quanto maior for a diferença de tamanhos dos blastómeros, pior a qualidade do embrião); nenhum ou pouco grau de fragmentação, sendo que um grau de fragmentação >25% associa-se a um baixo potencial de implantação. A multinucleação está associada a alterações cromossómicas, contudo existem vários casos de sucesso com a transferência de embriões multinucleados. Geralmente, estes embriões são transferidos quando são os únicos disponíveis. Outros factores a considerar são: presença de vacúolos, granularidade e espessura da zona pelúcida. Em 2007 Depa-Martynow et al<sup>7</sup> classificou os embriões em 4 classes (A a D) tendo em conta o grau de fragmentação citoplasmática e o número de blastómeros. Classe A: embriões com pelo menos 7 blastómeros (7 a 9) e com, no máximo, 20% de fragmentação citoplasmática (maior qualidade); Classe B: Embriões com 7 a 9 células com mais de 20% de fragmentação;

Classe C: Embriões com 4 a 6 células com, no máximo, 20% de fragmentação; Classe D: embriões com 4 a 6 células e com mais de 20% de fragmentação (pior qualidade). Neste estudo correlacionou-se a morfologia pronuclear com a morfologia do embrião na *cleavage stage*. Verificou-se que a maioria dos embriões classe A tinham sido avaliados como Z1, aquando da avaliação pronuclear. A presença de halo citoplasmático aquando da avaliação pronuclear também se associou a melhores classificações na avaliação morfológica da *cleavage stage*. Em 2000 Desai et al<sup>15</sup> propôs um método de classificação que avalia características específicas desta fase como *pitting* citoplasmático, compactação, blastómeros de igual tamanho, expansão dos blastómeros e ausência de vacúolos. Para além do número celular e grau de fragmentação, parâmetros classicamente avaliados. Os embriões foram avaliados, inicialmente, tendo em conta o número de blastómeros e o grau de fragmentação. Em seguida eram dados pontos positivos se os embriões apresentassem boa expansão dos blastómeros, tamanhos celulares semelhantes, *pitting* citoplasmático, sinais de compactação e não apresentassem vacúolos. Foi assim obtido o score D3EQ, quanto maior o valor do score, melhor a qualidade do embrião e melhor o *outcome* clínico. O estudo feito por Pelinck et al em 2010, citado no artigo de revisão de Nahid Nasiri<sup>6</sup>, verificou que a característica que traduzia melhor qualidade embrionária era a presença de 4 células no dia 2, 8 células no dia 3 e menos de 10% de fragmentação e a ausência de blastómeros multinucleados. Em 2014, num estudo prospectivo feito por Rhenman et al<sup>16</sup> usando a transferência electiva de embriões, foi avaliada a influência das variáveis: número de blastómeros; proporção de blastómeros mononucleados; grau de fragmentação; variação de tamanho dos blastómeros; simetria da clivagem no *outcome*. O que se verificou foi que todas as variáveis estavam associadas ao aumento do número de nascimentos de um nado vivo, à excepção da simetria. A correlação entre as variáveis e o *outcome* pode ser descrita através de uma função linear, à excepção do número de blastómeros, que se associava ao aumento dos nascimentos de um nado vivo até 2 a 4 blastómeros, sendo que depois diminuía o número de nascimentos à medida que o número aumentava. Concluiu-se que a taxa de clivagem é o melhor preditor do *outcome* (Presença de 4 blastómeros no dia 2). A proporção de blastómeros mononucleados foi considerada um forte preditor da taxa de nados vivos. Ao passo que a multinucleação foi considerada o preditor mais desfavorável, marcador de anormalidades embriónicas e diminuição do potencial de implantação. Neste estudo, concluiu-se que as variáveis: número de blastómeros, grau de fragmentação e proporção de blastómeros mononucleados são consideradas variáveis independentes, logo verdadeiramente predictoras, do potencial de implantação do embrião.

### iii. Avaliação morfológica no dia 4-5 após a fertilização

Após a compactação e formação da mórula, forma-se uma cavidade preenchida por fluido, o blastocelo. Durante a cavitação, as células diferenciam-se em células da massa interna e células da trofoectoderme. As células da massa interna vão dar origem ao embrião, enquanto as células da trofoectoderme, que rodeiam o blastocelo, são responsáveis pela nutrição do embrião e vão dar origem a parte da placenta.

O prolongamento da cultura dos embriões até a fase de blastocisto tornou-se rotina em muitos laboratórios de procriação medicamente assistida. Esta prática, com início em 1999, apresenta várias vantagens pois permite selecionar embriões com o genoma activado, embriões com melhores valores preditivos de implantação com base na sua avaliação morfológica, em comparação com fases mais precoces do desenvolvimento e permite a redução do número de embriões a transferir sem comprometer o *outcome*<sup>45</sup>.

Como o prolongamento da cultura permite a diminuição do número de blastocistos a transferir, foram criados vários scores de avaliação morfológica, para que se transfira o blastocisto com maior potencial de implantação. Em 2000, Gardner et al<sup>17</sup> propôs um sistema de avaliação morfológica que classifica os três componentes do blastocisto. Os blastocistos são classificados de 1 a 6 consoante o grau de expansão do blastocelo e o *hatching status*: 1- grau mínimo de expansão; 6- hatched blastocysts. A massa celular interna só pode ser classificada nos blastocistos classificados de 3-6. A massa interna e a trofoectoderme são avaliadas em A, B e C: A – ótima morfologia; C – múltiplas irregularidades.

	<b>Grupo I</b> 2 blastocistos>3AA	<b>Grupo II</b> 1 blastocisto>3AA	<b>Grupo III</b> Blastocistos<3AA
Taxa de gravidez	86.8%	69,6%	43,8%

Tab. 1 – Resultados obtidos no estudo de Gardner et al em 2010. (P <0.001)

Neste estudo foi verificada uma relação, estatisticamente significativa, entre o *score* atribuído ao embrião e o *outcome*.

## b. Time-lapse

A monitorização por *time-lapse* caracteriza-se pela captura de imagens frequentes do embrião em desenvolvimento, sem alterações no meio de cultura do mesmo. Permite avaliar de forma sequencial o processo de desenvolvimento do embrião, com obtenção de imagens a cada 5 a 20 minutos<sup>18</sup>.

Podem ser aplicados diferentes métodos para executar esta técnica, dependendo do estudo. O seguinte exemplo demonstra um método de monitorização por *time-lapse*, utilizado no estudo de Goodman et al<sup>19</sup> em 2016. Neste estudo, os embriões do grupo submetido a avaliação por *time-lapse* foram cultivados no *Embryoscope*. Foram avaliados, inicialmente, tendo em conta as características morfológicas. Após serem classificados como morfológicamente adequados, adicionaram-se *timings* específicos de intervalos mitóticos, *timings* de compactação e cavitação, avaliação contínua de anomalias na clivagem e multinucleação. Os marcadores cinéticos específicos avaliados foram: tempo para desaparecimento pro-nuclear ou singamia (tPNf), tempo para se formarem 2 células (t2), 3 células (t3), 4 células (t4), 5 células (t5), 8 células (t8) e mais de 9 células ou compactação parcial (t9), tempo para mórula (tMor), início da blastulação (Tsb: definido como a primeira imagem em que o fluido intracelular na mórula pode ser identificado), blastocisto (tBL: definido quando uma região em forma de crescente pode ser visualizada no fluido) e blastocisto expandido (tEBL: identificado quando a expansão do blastocisto é notada). Parâmetros cinéticos adicionais foram calculados, incluindo: Duração do segundo ciclo (cc2; t3-t2), terceiro ciclo celular (cc3; t5-t3), intervalos entre 4 e 5 células (t4int; t5-t4) e entre 2 e 5 células (t5-t2) e o tempo para completar divisões síncronas s1 (t2 – tPNf), s2 (t4-t3) e s3 (t8-t5). Anomalias da clivagem, incluindo *reverse cleavage* (RCLV: reabsorção de um blastómero depois da confirmação visual prévia), clivagem desigual directa (DUC: evidência de um blastómero dividir-se directamente em três) e divisão irregular e a presença de multinucleação (MU: mais de um núcleo por célula na fase de 2-4 células, registo baseado no número de células afectado e o número de núcleos por célula) foram avaliados continuamente e registados. Em seguida, o score é feito pela soma de pontos negativos e positivos: **Pontos negativos:** cc2 < 5 horas (-1), presença de multinucleação (-0.5), presença de divisão irregular (-0.5); **Pontos positivos:** t5 45.8-57.0 HPI (+1), s2 0.0-0.1 horas (+1), s3 1.4-7.0 (+1), tSB < 100 HPI (+1) \*HPI: horas após a fertilização.

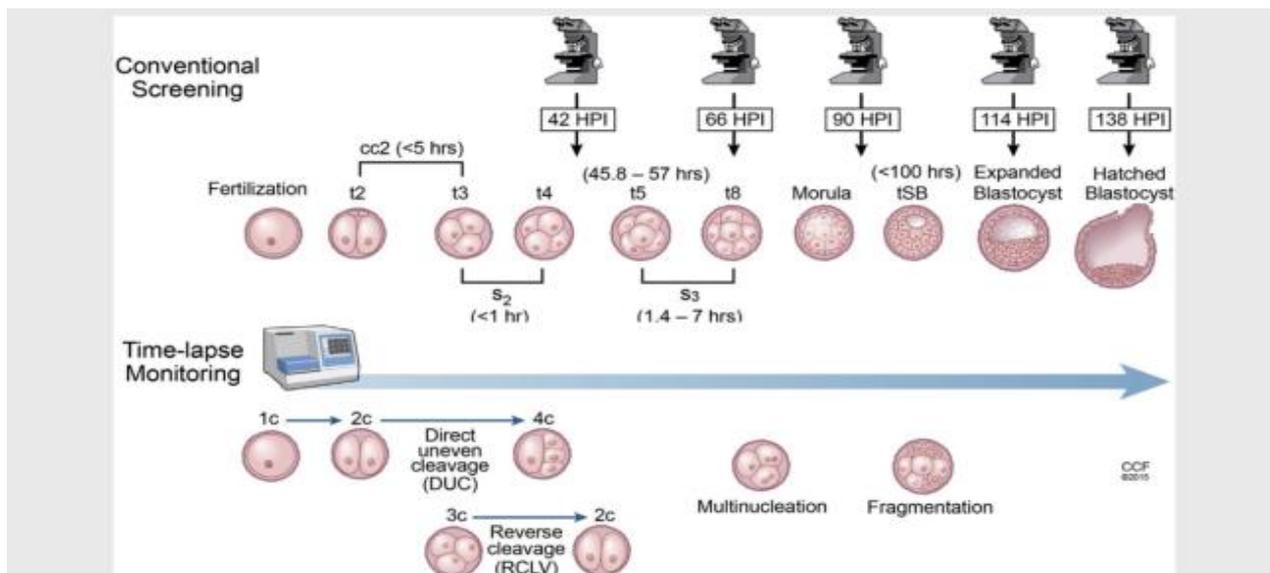


Fig. 1 – Monitorização convencional vs monitorização por *time-lapse*

Com a monitorização por *time-lapse*, num estudo feito por Conaghan et al em 2013, citado no artigo de revisão de Daniel J. Kaser<sup>18</sup>, verificou-se uma melhoria na selecção de blastocistos e redução da variabilidade intra e inter observador em comparação à avaliação morfológica. Contudo, os estudos feitos nesta área não demonstram evidência suficiente que suporte a aplicação desta técnica na prática clínica. Os estudos caracterizam-se por serem muito heterogéneos quanto aos métodos utilizados, *timings* de avaliação e resultados. Por exemplo, em 2014, num estudo feito por Rubio et al<sup>20</sup>, foi comparada a monitorização feita por *time-lapse* em relação à avaliação morfológica convencional. Neste estudo observou-se uma melhoria dos *outcomes* reprodutivos, sendo estatisticamente significativa o aumento na taxa de gravidez evolutiva e a diminuição no número de abortos. Este estudo apresentou como limitação não ser possível averiguar a influência da melhoria das condições de cultura nos *outcomes* clínicos. Enquanto que, em 2016, num estudo feito por Goodman et al<sup>19</sup>, não foi verificado melhoria significativa dos *outcomes* clínicos com a adição dos parâmetros morfocinéticos. Apenas parâmetros como: ausência de multinucleação, *timing* da blastulação e *score* morfocinético foram associados a um aumento da taxa de implantação dos blastocistos. Embora não se justifique a utilização desta monitorização como rotina, a mesma pode ser usada de forma experimental por cada laboratório até que exista evidência que suporte o seu uso na prática clínica.

Na revisão sistemática de Daniel J. Kaser e Catherine Racowsky<sup>18</sup>, os autores propõem maior uniformidade nos estudos futuros. Propõem que o *outcome* avaliado seja a implantação de um feto viável (8 semanas), uma vez que a perda fetal pode ser confundido com infertilidade de factor uterino ou aneuploidia. Propõem que no futuro se utilize uma única nomenclatura para os vários *timings* de avaliação e estabelecem como prioridades: criação de um programa de monitorização das crianças nascidas após a monitorização por *time-lapse*, devido à exposição prolongada a *low intensity light* e energia electromagnética; avaliação relativa do custo-eficácia; determinação do *test performance* (Especificidade, sensibilidade e número necessário para tratar por TLM vs avaliação morfológica convencional, com a implantação como *end-point*); correlação dos parâmetros de *time-lapse* com o *screening* de aneuploidias através de *comprehensive chromosome screening*; validação de marcadores da monitorização por *time-lapse* relevantes em vários pacientes e tipos de ciclo (Mús respondedoras, esquema de antagonista GnRH, cultura após descongelamento, etc.)

Proposed nomenclature	Developmental measure	Milestone
$t_0$	Spermatozoön entry into oocyte (IVF or ICSI)	Time of sperm injection into oocyte (ICSI) or at which sperm head binds to oolemma (IVF)
$t_{2pb}$	Extrusion of the 2 <sup>nd</sup> polar body	Time that 2 <sup>nd</sup> polar body is first encircled by a complete membrane
$t_{2pn}$	Appearance of the two pronuclei	Time that two pronuclei are first visualized
$t_{2pn.a}$	Abuttal of the two pronuclei	Time that two pronuclei first remain in contact before onset of dissolution
$t_1$	Disappearance of the two pronuclei	Time that both pronuclei are no longer visible
$t_{cf1}, t_{cf2}, t_{cf3} \dots$	Identification of the 1 <sup>st</sup> , 2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> etc. cytokinesis furrow	Time at which the 1 <sup>st</sup> , 2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> etc. cytokinesis (cleavage) furrow is clearly distinguishable
$t_2, t_3, t_4 \dots t_{16}$	Formation of 2-cell stage, 3-cell stage, 4-cell stage, etc. through the 16-cell stage	Time at which newly formed cells are completely separated by confluent membranes
$t_c$	Start of compaction	Time at which membranes of adjacent blastomeres start to become indistinguishable
$t_m$	Formation of morula	Time at which the membranes of all blastomeres are no longer distinguishable
$t_{cav}$	Start of cavitation	Time at which a pocket of fluid is first identified between blastomeres
$t_{b.e}$	Formation of early blastocyst	Time at which a single pocket of fluid (the blastocoelic cavity) first occupies less than half the volume of the embryo
$t_{b.xg}$	Formation of expanding blastocyst	Time at which the blastocoelic cavity first occupies more than half the volume of the embryo
$t_{b.f}$	Formation of full blastocyst	Time at which the blastocoelic cavity first occupies the entire volume of the embryo
$t_{b.xd}$	Formation of expanded blastocyst formation	Time at which the embryo first becomes fully expanded
$t_{b.hg}$	Formation of hatching blastocyst	Time at which the trophectoderm starts to herniate through the zona pellucida
$t_{b.hd}$	Formation of hatched blastocyst	Time at which the blastocyst completes escapement from the zona pellucida
$t_{b.c1}, t_{b.c2}, t_{b.c3} \dots$	Identification of blastocyst contractions	Time at which the 1 <sup>st</sup> , 2 <sup>nd</sup> , 3 <sup>rd</sup> etc. contraction of the blastocyst occurs (i.e. time of maximum shrinkage during one contraction event)
$t_i$	Time interval	The time required for the embryo to reach a more advanced stage from a specified earlier stage*
$d$	Duration	This is a special case of the more general term, time interval, and indicates the time passed between two consecutive developmental stages*

Fig. 2 - Nomenclatura dos vários timings proposta por Daniel J. Kaser e Catherine Racowsky<sup>18</sup>.

### c. Análise da vascularização folicular

O desenvolvimento de um embrião viável relaciona-se com a qualidade e a capacidade de desenvolvimento do oócito. Pensa-se que a hipóxia intrafolicular, relacionada com um desenvolvimento inapropriado da microvasculatura perifolicular, pode provocar diminuição do metabolismo e diminuir o pH intracelular, reduzir a fertilização, aumentar as alterações citoplasmáticas e cromossómicas, que resulta em embriões com blastómeros multinucleados e com limitações na capacidade de desenvolvimento<sup>21</sup>.

Chui et al<sup>22</sup> verificou, pela primeira vez em 1997, uma forte associação entre o grau de vascularização perifolicular (avaliado por ecografia+doppler) e o potencial de implantação do embrião, taxa de fertilização e gravidez. Neste estudo os *outcomes* foram melhores em oócitos obtidos de folículos com maior grau de vascularização perifolicular. Vários estudos realizados nos anos seguintes apresentam resultados semelhantes em que os folículos com maior vascularização contêm oócitos que quando fertilizados têm melhores taxa de gravidez<sup>23 24</sup>. Palomba S. et al<sup>21</sup>, em 2005, num estudo em que foi avaliada uma população com bom prognóstico, mulheres jovens não obesas com FSH basal baixo, não se obtiveram dados com relevância clínica, não havendo diferenças entre os grupos submetidos a selecção oocitária por *doppler* e o grupo submetido à selecção convencional. Ragni G. et al<sup>25</sup>, em 2007, concluiu que a vascularização folicular não prediz a chance de gravidez no grupo experimental avaliado (mulheres submetidas a *estimulação ovárica controlada* e ciclos de inseminação intrauterina). A diferença de resultados em relação os estudos anteriores, pode ser devido ao recrutamento de um grupo populacional diferente, diferentes protocolos de estimulação ovárica (neste estudo foram usadas doses mais baixas e em 2001, Bahl et al, no seu estudo relacionou doses maiores de gonadotrofinas com maior vascularização perifolicular) e a vascularização folicular pode estar mascarada na inseminação intra-uterina por factores confundentes que afectem o transporte do esperma e do embrião, aspiração oocitária e a fertilização *in vivo*. Stephen JR et al<sup>26</sup>, em 2008, fez a avaliação da vascularização folicular aquando da aspiração oocitária através da ultrassonografia, usando a técnica de imagem *power doppler*. Os folículos foram avaliados de 1 a 4, tendo em conta o seu grau de vascularização – pouco vascularizados (grau 1 e 2) e muito vascularizados (grau 3 e 4). Verificou-se um aumento da taxa de gravidez nos embriões que derivaram de folículos que apresentavam grau 3 e 4 de vascularização. Os autores apresentaram como vantagem o facto desta técnica não acrescentar complexidade ao processo, podendo vir a ser útil na prática clínica. Palomba S.<sup>27</sup>, em 2008, verificou diferenças nos resultados, tendo em conta os níveis de FSH de uma população com idade materna avançada (>40 anos). Em pacientes com baixos níveis de FSH (<10,9 UI/L) os resultados em relação ao número de

oócitos fertilizados, qualidade embrionária (*grade 4 and 3 of cleaved embryos*), número de *arrested embryos*, taxa de implantação e taxa de gravidezes correntes foi maior no grupo experimental do que no grupo de controlo. Em doentes com níveis elevados de FSH (>10,9 UI/L) não se verificou diferença no *outcome* clínico do grupo experimental e do grupo de controlo.

Concluindo, a análise da vascularização folicular pode ser útil em grupos selecionados como em mulheres mais velhas, com níveis basais de FSH baixos e com boa reserva ovárica. Não deve ser aplicada numa população indiferenciada e em grupos de bom prognóstico, uma vez que não apresenta diferenças significativas de resultados entre os grupos experimental e de controlo. No grupo de mau prognóstico com níveis basais de FSH elevados a principal limitação deve-se ao número reduzido de oócitos obtidos, que não permite que sejam tiradas conclusões da utilidade desta técnica.

#### d. Análise da composição do fluido folicular

O desenvolvimento do oócito está relacionado com o fluido folicular que o nutre. Assim a análise deste fluido é um passo lógico para o desenvolvimento de novos métodos não invasivos de selecção de oócitos. O fluido folicular é um bioproducto da aspiração oocitária, o que faz com que seja um produto ideal de análise. A composição deste fluido é fundamental para o crescimento e desenvolvimento do folículo e pode constituir um indicador importante para aferir se determinado oócito fertilizado vai desenvolver-se até à *cleavage stage*<sup>28</sup>.

Martina Wallace et al<sup>29</sup>, em 2012, verificou que a prolina e *branched-chain amino acids* estavam aumentados no grupo de estudo em que os oócitos atingiram o desenvolvimento e terminaram em gravidez. No grupo de oócitos que não atingiu a *cleavage stage* a concentração de glicose e HDL estava aumentada, enquanto que as concentrações de lactato, a colina, glicerofosocolina e fosfocolina estavam diminuídos. O’Gorman et al<sup>30</sup>, em 2013, identificou 21 ácidos gordos que compõem o fluido folicular. Havendo diferença, estatisticamente significativa, nas concentrações de 9 dos ácidos gordos, entre os grupos em estudo. Os ácidos gordos mais abundantes presentes no fluido folicular são os ácidos palmítico, oleico, linoleico, araquidónico e esteárico. No grupo de oócitos que atingiu a *cleavage stage* verificou-se um aumento do ácido esteárico, ácido oleico, ácido araquidónico e ácido dihomo- $\gamma$ -linoleico, sendo que os dois últimos são necessários em processos de síntese de eicosinóides, regulação da endocitose e exocitose, modulação e canais iónicos, inibição da DNA polimerase e na expressão genética. No grupo que não atingiu a *cleavage stage* verificou-se um aumento do ácido palmítico. O aumento do ácido palmítico está associado à apoptose das células da granulosa e piora a capacidade de

esteroidogénese, que é uma função crítica no suporte do desenvolvimento folicular no ovário e na maturação oocitária. Embora os autores tenham verificado uma forte correlação positiva entre os perfis metabólicos e os *outcomes* do embrião, o estudo foi feito numa amostra muito pequena (108 amostras) e por isso foi sugerida maior investigação desta correlação.

#### e. Medição da respiração aeróbia

O consumo de oxigénio tem sido avaliado como possível biomarcador para avaliar a viabilidade dos embriões. Pode ser avaliado através de várias técnicas como: a microespectrofotometria (técnica que faz a medição do espectro de amostras microscópicas, utilizando diferentes comprimentos de onda de radiação electromagnética), foi o primeiro método usado em 1986; a microscopia electroquímica (avalia o comportamento electroquímico das interfaces líquido/sólido, líquido/gasoso e líquido/líquido); *loop mediated isothermal amplification* (é uma técnica de amplificação isothermal dos ácidos nucleicos); o respirómetro (técnica que permite avaliar continuamente o consumo de oxigénio de cada embrião através da introdução de um eléctrodo no meio de cultura)<sup>31</sup>.

Tejera et al<sup>32</sup>, em 2015, combinou a monitorização por *time-lapse* com medições de oxigénio, através de um respirómetro, para investigar a potencial correlação entre a morfocinética do embrião e a sua actividade metabólica. Neste estudo, o consumo de oxigénio foi superior na primeira divisão de embriões que tiveram melhores taxas de implantação. Verificou-se que embriões com maiores consumos de oxigénio tiveram melhor desenvolvimento e, com isto, melhor competência na implantação. Apesar destes resultados, são precisos mais estudos para que se possa estabelecer uma correlação entre as variáveis.

## 2. Métodos invasivos

### a. Testes genéticos pré-implantação

A avaliação genética pré-implantação (*Preimplantation genetic screening*) é uma variante do diagnóstico genético pré-implantação (*Preimplantation genetic diagnosis*), que é uma técnica utilizada em casais com alterações cromossômicas para que estes não transmitam essas alterações à descendência.

A PGS consiste na biópsia de células do embrião numa fase inicial da cultura e na avaliação dos seus cromossomas antes de se proceder à transferência dos mesmos. É uma técnica usada para avaliar a existência de aneuploidias cromossômicas nos embriões seleccionados. Uma vez que a aneuploidia é a alteração cromossômica mais frequente do embrião e a causa mais frequente de aborto espontâneo, colocou-se a hipótese de que ao seleccionarmos os embriões euploides, aumentamos o sucesso dos tratamentos de infertilidade<sup>33</sup>. Sabe-se que o sucesso dos tratamentos de infertilidade está dependente da idade materna, podendo estar relacionado com o aumento de aneuploidias verificado nos oócitos de mulheres com idade superior a 35 anos. Por outro lado, foi verificado que as aneuploidias são mais frequentes em oócitos de mulheres inférteis do que em mulheres da mesma idade sem problemas de fertilidade<sup>34</sup>. A PGS tem indicação primária para os casos de idade materna avançada, falha recorrente na implantação, abortos recorrentes e infertilidade masculina grave<sup>33</sup>.

#### **Técnica utilizada e os seus resultados:**

Esta técnica pode ser efectuada através da punção de três tipos de células: os corpos polares do oócito, os blastómeros (*cleavage stage*) e as células da trofoectoderme do blastocisto. Os diferentes tipos de punção vão influenciar a precisão da técnica e o seu potencial impacto no *outcome* clínico<sup>35</sup>.

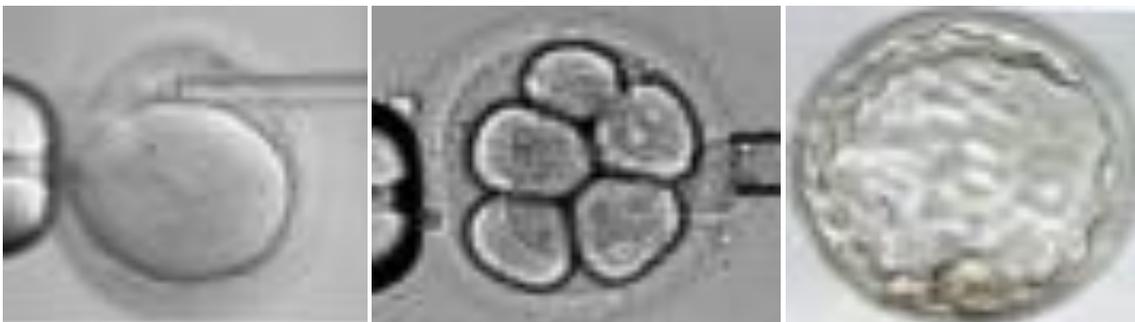


Fig 3: Oócito; Embrião na *cleavage stage*; Blastocisto.

Uma vez obtido o material para análise, este pode ser analisado através de várias técnicas laboratoriais como a *fluorescence in situ hybridization* (FISH) e a *comprehensive chromosome screening*.

A FISH foi a primeira técnica a ser usada, em 1992. Embora na altura se esperasse uma melhoria dos *outcomes* clínicos através da selecção embrionária com esta técnica, uma série de estudos controlados randomizados nos anos seguintes, verificaram que a PGS baseada na FISH não melhorou a taxa de nascimentos<sup>36 37</sup>. Pensa-se que isto ocorra devido: ao número reduzido de cromossomas avaliados, esta técnica avalia os cromossomas 13, 15, 16, 17, 18, 21, 22, X, Y; à fase precoce em que é feita a biópsia do embrião, no 3º dia após a fertilização – *cleavage stage*, e ao mosaicismo, que é mais prevalente nesta fase do embrião em que é feita a biópsia<sup>38</sup>. Os resultados negativos fizeram com que, hoje em dia, a *European Society for Human Reproduction* (ESHRE) recomende a utilização de *comparative genomic hybridisation*, alternativa à PGS com a técnica FISH na *cleavage stage*, uma vez que esta técnica não revelou efeitos benéficos nos estudos analisados<sup>39</sup>. Existe uma grande esperança na aplicação da PGS utilizando técnicas de *comprehensive chromosome screening*<sup>36</sup>.

### **Tipo de célula analisado:**

#### **i. Corpos polares**

Em 2015, Feichtinger M. et al avaliou os corpos polares dos oócitos através de *comprehensive chromosome screening: array comparative genomic hybridization* (aCGH), verificando um aumento do número de nados vivos no grupo submetido à PGS dos corpos polares. A biópsia foi feita 2-3 horas após a aspiração oocitária. A selecção do grupo submetido a biópsia dos corpos polares foi feita em casos de falência sucessiva na implantação ou cuja idade materna fosse avançada. O grupo submetido a PGS era constituído por 111 pacientes cuja idade estava compreendida entre os 35 e 45 anos, sendo a média 39,5 anos. O grupo de controlo era constituído por 240 pacientes com idades compreendidas em os 35 e 45 anos, sendo a média 38,4 anos. No grupo submetido à PGS, 29 dos 110 embriões transferidos resultaram em nados vivos, o que equivale a uma taxa de nados vivos de 26,4%/embrião e 35,7%/paciente. No grupo de controlo, 60 dos 403 embriões transferidos resultaram em nados vivos, o que equivale a uma taxa de nados vivos de 14,9%/embrião e 22,7%/paciente. Os resultados deste estudo sugerem que a avaliação cromossómica dos corpos polares dos oócitos melhora a taxa de nados vivos em comparação com a ausência de avaliação de aneuploidias.

Esta técnica apresenta várias vantagens em relação à biópsia dos outros tipos celulares: pode ser feita no dia da fertilização, evitando o congelamento dos embriões; o mosaicismo não tem impacto no diagnóstico de aneuploidias nos corpos polares; não há necessidade de manipular o embrião nas fases mais avançadas do desenvolvimento. Contudo apresenta algumas limitações uma vez que não permite a identificação de aneuploidias de origem paterna (Constituem 3-4% das aneuploidia)<sup>40</sup>.

#### ii. Blastómeros

Em 2013, Keltz M. et al verificou melhoria nas taxas de êxito no grupo submetido à análise cromossômica dos blastómeros. A avaliação cromossômica foi feita por *array comparative genomic hybridization* (aCGH). A biópsia do blastómero é feita no dia 3 após a fertilização, na *cleavage stage*. A selecção do grupo submetido a biópsia dos blastómeros foi feita tendo em conta a idade materna avançada, falha recorrente de FIV (2 ou mais) e perda recorrente na gravidez (2 ou mais), contudo este grupo era considerado de bom prognóstico, tendo em conta: FSH, hormona anti-mulleriana e a reserva ovárica. Verificou-se um aumento na taxa de implantação (52,63% vs 19,15%) e no número de gravidez (61,54% vs 32,49%), diminuição do número de abortos (11,11% vs 26,01%), havendo também uma diminuição do número de embriões transferidos e, consequentemente, uma diminuição no número de gravidezes gemelares (8,33% vs 34,38%)<sup>41</sup>.

#### iii. Trofoectoderme

Em 2013, Scott Jr T. et al, num estudo randomizado controlado, verificou melhoria dos *outcomes* clínicos na fertilização *in vitro* do grupo submetido à análise cromossômica das células da trofoectoderme. A avaliação cromossômica das células da trofoectoderme foi feita através da técnica PCR quantitativa em tempo real (qPCR - rapid quantitative real-time polymerase chain reaction). O estudo foi feito em casais com bom prognóstico: Idade materna entre os 21 e 42 anos; máximo de um ciclo de FIV falhado; cavidade endometrial normal; níveis basais de FSH  $\leq 15$  IU/L; contagem folicular  $\geq 8$ ; disponibilidade do ejaculado do parceiro masculino. No grupo em estudo, os embriões morfológicamente adequados foram submetidos a biópsia no dia 5, avaliação cromossômica e transferência uterina no dia 6. No grupo de controlo, os embriões foram transferidos no dia 5. Verificou-se que a taxa de implantação foi significativamente maior no grupo submetido à PGS (79,8%) em relação ao grupo de controlo (63,2%). Verificou-se também um aumento de gravidezes que evoluíram até ao parto no grupo avaliado através da PGS (66,4%) em relação ao grupo de controlo (47,9%). Este estudo fornece evidência classe I em como a avaliação da aneuploidia usando a PCR quantitativa em tempo real como técnica de avaliação cromossômica, em células da trofoectoderme melhora a implantação e número de gravidezes de termo<sup>42</sup>.

Concluindo, existem ainda falhas que devem ser colmatadas na aplicação da PGS na selecção de embriões, uma vez que a biópsia é feita numa só célula do embrião e a mesma pode não ser representativa de todo embrião, originando resultados falsos positivos e falsos diagnósticos<sup>38</sup>. Por outro lado, a remoção de uma célula para biópsia numa fase precoce do embrião pode estar associada a alterações nefastas para o embrião, tendo influência negativa na gestação<sup>40</sup>. Assim, no futuro é importante investigar que grupos beneficiam da PGS e em que fase devem ser feitas as biópsias das diversas células.

#### b. Análise da transcriptoma

A transcriptoma define-se como o conjunto de todas as moléculas de RNA de uma determinada célula ou população de células.

Vários estudos comprovaram a existência de alterações genéticas específicas, determinadas por transcrição reversa seguida por PCR, e a qualidade do oócito e embrião. Contudo a avaliação por PCR é muito restrita, pois avalia um número reduzido de genes por ócito/embrião. A análise da transcriptoma de oócitos normais e aneuploides (determinação feita por *comparative genomic hybridization* dos corpos polares correspondentes) identificou várias diferenças ao nível da expressão dos genes relacionados com a segregação cromossómica durante a meiose. A análise da transcriptoma de células do *cumulus oophorus* (CC) e células da granulosa (GC), utilizando *microarrays* ou transcrição reversa seguida de PCR, identificou vários genes candidatos a biomarcadores. A expressão de genes como PTX3 correlaciona-se positivamente com a competência oocitária, enquanto que os genes PTGS2 e STAR se relacionam negativamente. A expressão de genes como GREM1, BCL2L11, PGK1 e NFIB, correlaciona-se com a qualidade do embrião. No total foram identificados, por *microarrays*, cerca de 630 genes cujo padrão da transcriptoma se correlaciona com o *outcome* do embrião e da gravidez<sup>43</sup>. Embora tenha sido feito um esforço para identificar um perfil de mRNA que determinasse a competência do oócito, não existem resultados completamente claros em relação a estas associações<sup>44</sup>.

PTX3 - Associado ao processo de inflamação.

PTGS2 - codifica a enzima ciclo-oxigenase 2

STAR - Codifica a proteína de transporte StAR. Regula a o transporte de colesterol para o interior da mitocôndria, sendo o passo limitante na esteroidogénese.

GREM1 - Codifica a proteína Gremlin que é um inibidor da via de sinalização TGF beta.

BCL2L11- Associado à apoptose em resposta a anormalidades celulares.

PCK1 - Associado à produção de energia.

NFIB - Regula vários processos na fase inicial do desenvolvimento embrionário.

## Conclusão

Hoje em dia, um dos principais objectivos dos laboratórios de técnicas de procriação medicamente assistida é seleccionar o embrião com maior potencial de implantação. Neste sentido, foram aplicados vários métodos, invasivos e não invasivos, que avaliam a morfologia, cinética, genética e biomarcadores dos embriões.

Actualmente, a avaliação morfológica continua a ser o método mais utilizado. A avaliação morfológica pode ser feita em diferentes fases de desenvolvimento do embrião, o que vai influenciar os critérios e os *scores* utilizados. Na fase de zigoto, o número, equidade e alinhamento dos nucléolos, o tamanho e alinhamento pronuclear são as principais características avaliadas. A taxa de clivagem entre 23 e 24 horas e a presença de halo citoplasmático constituem as características dos embriões de boa qualidade. A ausência de polarização dos nucléolos associa-se a um desenvolvimento embrionário mais lento e anormal. Na *cleavage stage*, o número, equidade e irregularidades dos blastómeros, o grau de fragmentação e a multinucleação são as características principais avaliadas. A existência de *pitting* citoplasmático, compactação, expansão dos blastómeros e a ausência de vacúolos associam-se a boa qualidade embrionária. Concluiu-se que o parâmetro que melhor prediz o *outcome* é a taxa de clivagem, ou seja, a existência de 2 a 4 blastómeros às 48 horas. Na fase de blastocisto, o grau de expansão do blastocelo e *hatching status*, a ausência de irregularidades na massa interna e na trofoectoderme são as características que melhor se associam a bons *outcomes*. Em relação à monitorização por *time-lapse*, verificou-se que a ausência de multinucleação, *timing* de blastulação inferior a 100 horas após fertilização e a aplicação dos *scores* morfocinéticos se associa a melhores taxas de implantação dos blastocistos. Contudo, estes resultados não foram verificados por todos os estudos, havendo resultados díspares entre os vários estudos. Assim, esta técnica ainda não é recomendada na prática clínica, mas é proposta a sua utilização no âmbito experimental. Em relação à avaliação da vascularização folicular, esta pode ser útil em grupos seleccionados de mulheres mais velhas, com níveis basais de FSH baixos e boas reservas ováricas. Não deve ser aplicado num grupo indiferenciado e de bom prognóstico. Quanto à avaliação da composição do fluido folicular, os estudos analisados foram feitos em grupos pequenos e, embora possa existir uma relação entre a concentração de determinadas substâncias e o *outcome* clínico, são necessários mais estudos nesta área para comprovar esta correlação. Em relação à medição da respiração aeróbia, verificou-se que embriões com maior consumo de oxigénio tinham melhores *outcomes*, contudo esta correlação carece de confirmação por mais estudos.

Em relação aos métodos invasivos de selecção embrionária, nomeadamente a *preimplantation genetic screening*, concluiu-se que deve ser feita através da técnica de *comprehensive chromosome screening*, não sendo aconselhada a técnica FISH. Em relação ao tipo de célula a avaliar, verificou-se que a biópsia dos corpos polares apresenta algumas vantagens na detecção de aneuploidias, contudo não permite avaliar a existência de aneuploidias de origem paterna. Já nos grupos submetidos a biópsia dos blastómeros, verificou-se melhoria dos *outcomes* clínicos, embora se desconheça os impactos da remoção de um blastómero no futuro da gestação. Quanto à biópsia de células da trofoectoderme verificou-se evidência classe I na associação desta técnica de avaliação a aumentos na implantação e no número de gravidezes de termo. Em relação à análise da transcriptoma, não existem resultados claros quanto à existência de um perfil de mRNA que determine a competência oocitária.

### **Agradecimentos**

Pais, irmão, Bruno, amigos, Dr. Joaquim Nunes e Prof. Doutor Carlos Calhaz Jorge.

## **Bibliografia:**

1. Dyer, S. *et al.* International committee for monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology 2008, 2009 and 2010???. *Hum. Reprod.* **31**, 1588–1609 (2016).
2. Grafodatskaya, D., Cytrynbaum, C. & Weksberg, R. The health risks of ART. *EMBO Rep.* **14**, 129–35 (2013).
3. Geyter, C. De *et al.* Assisted reproductive technology in Europe , 2012 : results generated from European registers by ESHRE †. **31**, 1638–1652 (2016).
4. Cohen, J., Alikani, M. & Bisignano, A. Past performance of assisted reproduction technologies as a model to predict future progress : a proposed addendum to Moore ' s law. *Reprod. Biomed. Online* **25**, 585–590 (2012).
5. Montag, M., Toth, B. & Strowitzki, T. New approaches to embryo selection. *Reprod. Biomed. Online* **27**, 539–546 (2013).
6. Nasiri, N. & Eftekhari-Yazdi, P. An overview of the available methods for morphological scoring of pre-Implantation embryos in in vitro fertilization. *Cell J.* **16**, 392–405 (2015).
7. Depa-Martynow, M., Jedrzejczak, P. & Pawelczyk, L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo quality in in vitro fertilization program. *Folia Histochem. Cytobiol.* **45**, 87–91 (2007).
8. Wright, G. *et al.* Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum. Reprod.* **5**, 109–15 (1990).
9. Scott, L. A. & Smith, S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum. Reprod.* **13**, 1003–1013 (1998).
10. Tesarik, J. & Greco, E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* **14**, 1318–1323 (1999).
11. Tesarik, J. *et al.* Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum. Reprod.* **15**, 1396–9 (2000).

12. Senn, A. *et al.* Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum. Reprod.* **21**, 234–239 (2006).
13. Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F. & Matthews, C. D. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* **12**, 532–541 (1997).
14. Brezinova, J., Oborna, I., Svobodova, M. & Fingerova, H. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome--a comparison of two scoring systems. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **7**, 9 (2009).
15. Desai, N. N., Goldstein, J., Rowland, D. Y. & Goldfarb, J. M. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum. Reprod.* **15**, 2190–2196 (2000).
16. Rhenman, A. *et al.* Which set of embryo variables is most predictive for live birth? A prospective study in 6252 single embryo transfers to construct an embryo score for the ranking and selection of embryos. *Hum. Reprod.* **30**, 28–36 (2015).
17. Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T. & Schoolcraft, W. B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.* **73**, 1155–1158 (2000).
18. Kaser, D. J. & Racowsky, C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Hum. Reprod. Update* **20**, 617–631 (2014).
19. Goodman, L. R., Goldberg, J., Falcone, T., Austin, C. & Desai, N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* **105**, 275–285.e10 (2016).
20. Rubio, I. *et al.* Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: A randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil. Steril.* **102**, 1287–1294 (2014).
21. Palomba, S. *et al.* Clinical use of the perifollicular vascularity assessment in IVF cycles: A pilot study. *Hum. Reprod.* **21**, 1055–1061 (2006).
22. Chui, D. K., Pugh, N. D., Walker, S. M., Gregory, L. & Shaw, R. W. Follicular vascularity--the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an in-vitro

- fertilization programme: a preliminary study. *Hum. Reprod.* **12**, 191–6 (1997).
23. Borini, A. *et al.* Perifollicular vascularity and its relationship with oocyte maturity and IVF outcome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **943**, 64–7 (2001).
  24. Costello, M. F. *et al.* Power Doppler ultrasound assessment of ovarian perifollicular blood flow in women with polycystic ovaries and normal ovaries during in vitro fertilization treatment. *Fertil. Steril.* **83**, 945–954 (2005).
  25. Ragni, G. *et al.* Follicular vascularity is not predictive of pregnancy outcome in mild controlled ovarian stimulation and IUI cycles. *Hum. Reprod.* **22**, 210–214 (2007).
  26. Robson, S. J., Barry, M. & Norman, R. J. Power Doppler assessment of follicle vascularity at the time of oocyte retrieval in in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.* **90**, 2179–2182 (2008).
  27. Palomba, S. *et al.* Perifollicular vascularity assessment for selecting the best oocytes for in vitro fertilization programs in older patients. *Fertil. Steril.* **90**, 1305–1309 (2008).
  28. Wallace, M. *et al.* An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid , oocyte developmental potential , and implantation outcome. *Fertil. Steril.* **97**, (2012).
  29. Wallace, M. *et al.* An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertil. Steril.* **97**, (2012).
  30. O’Gorman, A. *et al.* Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence. *Reproduction* **146**, 389–395 (2013).
  31. Nel-Themaat, L. & Nagy, Z. P. A review of the promises and pitfalls of oocyte and embryo metabolomics. *Placenta* **32**, S257–S263 (2011).
  32. Tejera, A. *et al.* Combination of metabolism measurement and a time-lapse system provides an embryo selection method based on oxygen uptake and chronology of cytokinesis timing. *Fertil. Steril.* **106**, 119–126.e2 (2016).
  33. Kane, S. C., Willats, E., Bezerra Maia e Holanda Moura, S., Hyett, J. & da Silva Costa, F. Pre-Implantation Genetic Screening Techniques: Implications for Clinical Prenatal

- Diagnosis. *Fetal Diagn. Ther.* **3168**, (2016).
34. Lintsen, A. M. E. *et al.* Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: A national prospective study. *Hum. Reprod.* **22**, 2455–2462 (2007).
  35. Cimadomo, D. *et al.* The Impact of Biopsy on Human Embryo Developmental Potential during Preimplantation Genetic Diagnosis. *Biomed Res. Int.* **2016**, (2016).
  36. Rubio, C. *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: Two randomized trials. *Fertil. Steril.* **99**, 1400–1407 (2013).
  37. Moayeri, M., Saeidi, H., Modarresi, M. H. & Hashemi, M. The effect of preimplantation genetic screening on implantation rate in women over 35 years of age. *Cell J.* **18**, 13–20 (2016).
  38. Bolton, V. N., Leary, C., Harbottle, S., Cutting, R. & Harper, J. C. How should we choose the ‘best’ embryo? A commentary on behalf of the British Fertility Society and the Association of Clinical Embryologists. *Hum. Fertil. (Camb).* **7273**, 1–9 (2015).
  39. De Rycke, M. *et al.* ESHRE PGD Consortium data collection XIII: Cycles from January to December 2010 with pregnancy follow-up to October 2011. *Hum. Reprod.* **30**, 1763–1789 (2015).
  40. Feichtinger, M. *et al.* Increasing live birth rate by preimplantation genetic screening of pooled polar bodies using array comparative genomic hybridization. *PLoS One* **10**, 1–13 (2015).
  41. Keltz, M. D. *et al.* Preimplantation Genetic Screening (PGS) with Comparative Genomic Hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages. *J. Assist. Reprod. Genet.* **30**, 1333–1339 (2013).
  42. Scott, R. T. *et al.* Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: A randomized controlled trial. *Fertil. Steril.* **100**, 697–703 (2013).
  43. Assou, S. *et al.* Dynamic changes in gene expression during human early embryo development: from fundamental aspects to clinical applications. *Hum. Reprod. Update* **17**,

272–290 (2011).

44. Animes, S. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis : progress and challenges. **20**, 103–116 (2014).
45. Borut Kovačič and Veljko Vlaisavljević (2012). Importance of Blastocyst Morphology in Selection for Transfer, *Advances in Embryo Transfer*, Dr. Bin Wu (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/37891. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-embryo-transfer/importance-of-blastocyst-morphology-in-selection-for-transfer>