

# **Comparação da análise morfológica de embriões humanos de processos de procriação medicamente assistida com o perfil molecular do meio de cultura**

**Joana de Sousa Emídio dos Santos**

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de

**Mestre em Engenharia Biomédica**

**Orientadores:** Prof.<sup>a</sup> Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)  
Dr. Miguel Gallardo (Maloclinic – Ginemed)

dezembro 2018

# **Comparação da análise morfológica de embriões humanos de processos de procriação medicamente assistida com o perfil molecular do meio de cultura**

**Joana de Sousa Emídio dos Santos**

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de

**Mestre em Engenharia Biomédica**

**Orientadores:** Prof.<sup>a</sup> Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado (ISEL)  
Dr. Miguel Gallardo (Maloclinic – Ginemed)

**Júri**

Prof. Doutor Miguel Minhalma (ISEL)  
Doutora Ana Fernandes Platzgummer (Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa)  
Prof.<sup>a</sup> Doutora Cecília Ribeiro da Cruz Calado, (ISEL)

dezembro 2018



*No fundo, todos temos necessidade de dizer quem somos e o que é que estamos a fazer e a necessidade de deixar algo feito, porque esta vida não é eterna e deixar coisas feitas pode ser uma forma de eternidade.*

José Saramago

# COMUNICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

## POSTER

1. Joana Santos, Lorena Venegas, Ana Reis, Pedro Ferreira, Luís Ramalhete, Miguel Gallardo, Cecília R. C. Calado. Diferenças entre os perfis moleculares do meio de cultura de embriões humanos mantidos em grupo ou individualmente. XXXVI Jornadas Internacionais de Estudos da Reprodução, Sociedade Portuguesa de Medicina de Reprodução, Figueira da Foz, Portugal, 4 a 5 de Maio de 2018.
2. Joana Santos, Lorena Venegas, Ana Reis, Pedro Ferreira, Ana Soares, Luís Ramalhete, Miguel Gallardo, Cecília R. C. Calado. Exploring the use of mid-infrared spectroscopy to detect development and implantation biomarkers in spent culture media of human embryos. XXXIV annual meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology, Barcelona, Spain, 1 a 4 de July 2018.

## AGRADECIMENTOS

Esta página é certamente insuficiente para agradecer a todos quantos contribuíram direta ou indiretamente para a elaboração desta tese.

Na impossibilidade de agradecer a todos pessoalmente, saliento em primeiro lugar a Prof.<sup>a</sup> Doutora Cecília Calado, minha orientadora, que desde a primeira hora incentivou e encorajou este trabalho e a quem estou particularmente grata pela incansável disponibilidade, atenção e suporte dado ao longo da realização desta tese.

Da mesma forma, agradeço infinitamente ao Dr. Miguel Gallardo, meu coorientador, por ter aceitado abraçar este projeto e pela preciosa colaboração nas diferentes fases da concretização do mesmo.

Quero ainda expressar a minha gratidão ao Laboratório de Engenharia e Saúde do Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, o qual resulta do Protocolo de Colaboração entre a Universidade Católica Portuguesa e o Instituto Politécnico de Lisboa. Agradeço também ao Instituto superior de Engenharia de Lisboa pelo acolhimento durante estes dois anos e, ao Instituto Politécnico de Lisboa pelo financiamento que possibilitou a realização deste trabalho experimental, através do financiamento dos projetos IDI&CA/IPL/2017/DrugsPlatf/ISEL, IDI&CA/IPL/2017/GenTox/ESTeSL e IDI&CA/IPL/2018/RenalProg/ISEL. E da mesma forma aos meus colegas de laboratório Helder Paz e Luís Ramalhete. Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Doutora Sandra Aleixo do ISEL pela disponibilidade na análise estatística.

Expresso também o meu reconhecimento à MALOCLINIC-Ginemed, em particular ao Dr. Fernando Sanchez e à Dra. Ana Paula Soares, por me ter concedido a oportunidade de realizar este projeto de investigação, disponibilizando os materiais e meios necessários para a realização do mesmo. Estou igualmente grata aos meus colegas de trabalho, Dra. Ana Braula Reis, Dra. Lorena Montero e Dr. Pedro Ferreira, pela colaboração e apoio incondicional ao longo da elaboração desta tese.

Quero também agradecer aos meus pais, Raul Sim Sim e Ana Paula Sim Sim, pela esmerada educação que me foi dada e por todo o sacrifício que realizaram ao longo dos anos com o objetivo de me proporcionar sempre um futuro melhor. O meu muito obrigado ao meu irmão Gonçalo por todas as palavras de carinho e incentivo nos momentos mais difíceis. Ao meu namorado, João Perdigão pelo carinho e paciência nos momentos mais difíceis.

Um bem-haja aos meus amigos e colegas de universidade que me apoiaram incondicionalmente durante este percurso académico e foram sempre um porto de abrigo nos momentos de maior adversidade, em especial à minha colega de mestrado, Marisa Machado, às minhas colegas de casa Rita e Filine, e à minha amiga Catarina Ferreira pelo apoio e companheirismo, ao longo destes dois anos.

## RESUMO

Apesar dos avanços na tecnologia de procedimentos de procriação medicamente assistida (PMA), a taxa de nados vivo em relação ao número de embriões transferidos é ainda bastante baixa. É assim crucial desenvolver uma nova técnica para prever a capacidade de o embrião implantar em relação à técnica convencional de análise da morfologia por microscopia ótica. A nova técnica deve ser não-invasiva, rápida, económica e simples de se aplicar em contexto clínico e, ao mesmo tempo, exceder a capacidade de previsão do método convencional. Neste âmbito, foi avaliada se a análise de meios de cultura *in vitro* do embrião por espectroscopia de infravermelho médio permitia prever: a morfologia do embrião ao dia 3 e 5 ou 6 de desenvolvimento; ao dia 3 a chegada do embrião a blastocisto; ao dia 5/6 a capacidade de nidificação do embrião. O projeto não interferiu com o procedimento de rotina da clínica de PMA, baseando-se numa análise retrospectiva, que correlacionou a classificação morfológica dos embriões e a eventual gravidez com o espectro do meio de cultura descartado. Utilizaram-se meios de cultura descartados de 123 embriões, obtidos ao dia 3 e ao dia 5 ou 6 de cultura, de 12 pacientes submetidas a tratamentos de PMA de fertilização *in vitro* ou injeção intracitoplasmática de esperma, utilizando-se óvulos de ciclos a fresco ou vitrificados de dadoras, e de embriões mantidos em cultura individual ou de grupo. Devido a esta grande diversidade de processos de PMA (por exemplo de cultura individual versus em grupo), houve sempre uma reduzida dimensão da amostra, limitando a análise estatística subsequente. Foram avaliados quer os espectros (pré-processados por correção de linha de base e de normalização), quer a 2ª derivada dos espectros. Foi observado uma elevada sensibilidade da análise de espectroscopia do meio de cultura em detetar no espectro variações metabólicas dos diferentes embriões. Por exemplo, foram observadas diferenças espectrais significativas entre embriões obtidos de óvulos não vitrificados e vitrificados. Visualizaram-se regiões espectrais características de embriões de cultura individual com boa e má qualidade ao dia 3 de desenvolvimento, e diferenças na 2ª derivada de espetros de meios de cultura de embriões que implantaram e que não implantaram. Dos estudos efetuados, foi possível identificar razões espectrais que permitiram discriminar a uma significância de 10% a qualidade dos embriões ao dia 3, e da chegada a blastocisto ao dia 5/6. A espectroscopia de infravermelho médio revela-se assim muito promissora para avaliar o estado metabólico do embrião.

**Palavras-chave:** Embrião, espectroscopia de FTIR, Fertilização *in vitro*.

## ABSTRACT

Despite the advances in medically assisted procreation (MAP), the rate of live births in comparison with the number of transferred embryos is still pretty low. With that in mind, it's crucial to develop a new technique to predict the ability of the embryo to implant in relation with the conventional technique of morphologic analysis by optical microscopy. The new technique must be non-invasive, fast, economic and simple to apply in clinical context and, at the same time, exceed the conventional method prediction capacity. On that matter, it was assessed if the in vitro culture environments analysis of the embryo by medium infrared spectroscopy allowed to predict: the embryo's morphology by day 3 and 5 or 6 of development; by day 3, the arrival of the embryo to the blastocyst: by day 5/6, the embryo's ability to nest. The project did not interfere with the clinic MAP routine procedure, it was based on a retrospective analysis, which correlate the morphologic classification of embryos and the eventual pregnancy with the discarded environment culture. Were used 123 embryos discarded environment cultures, obtained by day 3 and by day 5 or 6 of culture, of 12 patients under MAP treatments of in vitro fertilization or sperm intracytoplasmic injection, using fresh cycles or vitrified donor's ovules, and embryos which were kept in individual or group cultures. Do to this great diversity of MAP processes (for example, individual culture and group culture), there always was a reduced dimension of the sample, limiting the following statistical analysis. The specters were evaluated (pre-processed by base line and normalization correction), same as the second wave of specters. It was observed a high environment culture spectroscopic analysis sensibility in detecting the metabolic variations in the specter of different embryos. For example, there were observed specter significative differences between embryos from vitrified and non-vitrified ovules. It was visualized specter regions typical of individual embryo culture with good and bad quality by day 3 of development, and differences in the second wave of specters from environment cultures of embryos which implanted and did not implanted. From this investigation, it was possible to identify the specter reasons which allow to discriminate to a 10% significance the quality of embryos by day 3, and the arrival to the blastocyst by day 5/6. So, the medium infrared spectroscopy is very promising in the evaluation of the metabolic embryo state.

**Key-words:** Embryo, spectroscopy FTIR, in vitro fertilization.

# ÍNDICE

COMUNICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIV
ABREVIATURAS.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. ENQUADRAMENTO.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. EMBRIOGÉNESE.....	4
2.2. METABOLISMO DO EMBRIÃO.....	5
2.2.1 Metabolismo da Glucose, Piruvato e Lactato.....	7
2.2.2. Metabolismo de Aminoácidos .....	8
2.2.3. Amónia.....	8
2.3. TÉCNICAS DE PROcriação MEDICAMENTE ASSISTIDA.....	9
2.3.1. Estimulação ovárica.....	10
2.3.2. Punção Folicular.....	10
2.3.3. Fertilização <i>In vitro</i> .....	10
2.3.4. Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóides.....	11
2.3.5. Cultura de Embriões <i>in vitro</i> .....	12
2.3.6. Transferência e Vitriificação.....	12
2.3.7. Detecção da gravidez.....	13
2.4. TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO E SELEÇÃO EMBRIONÁRIA.....	14
2.4.1. Morfologia.....	16
2.4.2. Metabolismo.....	18
2.5. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	20
2.5.1. Vibrações moleculares.....	20
2.5.2. Espectroscopia de Infravermelho Médio.....	21
2.5.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.....	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
3.1 CULTURA EMBRIONÁRIA.....	23
3.2 CULTURA INDIVIDUAL E EM GRUPO DE EMBRIÕES.....	25
3.3. CARCATERÍSTICAS DOS CICLOS DE PROcriação MEDICAMENTE ASSISTIDA.....	26
3.4. ANÁLISE POR ESPETROSCOPIA FTIR.....	26

3.4.1. Aquisição Espectral.....	26
3.4.2. Pré-processamento dos espetros.....	27
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1. AMOSTRA BIOLÓGICA.....	29
4.1.1. Amostra Biológica Cultura Individual.....	29
4.1.2. Amostra Biológica Cultura de Grupo.....	32
4.1.3. Conclusão da análise convencional de cultura individual e de grupo.....	35
4.2. CULTURA INDIVIDUAL DE EMBRIÕES.....	35
4.2.1. Otimização do grau de diluição dos meios de cultura antes da aquisição espectral.....	35
4.2.2. Análise do espectro normal da cultura ao dia 3 e 5/6, para prever a qualidade do embrião.....	39
4.2.3. Análise da 2ª derivada do espectro do meio de cultura diluído de embriões de óvulos vitrificados versus não vitrificados.....	43
4.2.4. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluído, para discriminar a qualidade ao dia 3 e dia 5/6.....	43
4.2.5. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluídos do dia 3 e 5/6, de embriões de óvulos obtidos a fresco, para prever a qualidade do embrião.....	45
4.2.6. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluídos e obtidos ao dia 3 com qualidade A, de embriões de óvulos a fresco, para prever se o embrião atinge blastocisto.....	46
4.2.7. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura obtidos ao dia 3, para prever se o embrião transferido implanta.....	49
4.2.8. Análise das razões das bandas espectrais.....	53
4.3 CULTURA DE EMBRIÕES EM GRUPO.....	55
4.3.1. Análise do espectro e da 2ª derivada do espectro do meio de cultura em grupo de 2 ou 3 embriões ao dia 3 e 5/6 de desenvolvimento.....	55
4.3.2. Análise do espectro normal da cultura em grupo ao dia 3 e 5/6, com densidade de 3 e 2 embriões por gota de acordo com a qualidade.....	59
4.3.3. Análise da 2ª derivada do espectro de meio de cultura diluído de embriões obtidos de óvulos vitrificados versus não vitrificados.....	62
4.3.4. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura de grupo diluídos e obtidos ao dia 3 e 5/6, para prever a qualidade do embrião.....	63
4.3.5. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluídos e obtidos ao dia 3 com qualidade A, de embriões de óvulos obtidos a fresco, para prever se o embrião atinge blastocisto.....	64
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	67
6. BIBLIOGRAFIA .....	68
ANEXOS.....	75

## LISTA FIGURAS

<b>Figure 1.1.1</b> - Prevalência da infertilidade primária em 2010.....	1
<b>Figura 1.1.2</b> - Percentagem de ciclos de FIV/ICSI que resultaram em gravidez em 2015 em Portugal, e qual o risco de uma gravidez múltipla.....	2
<b>Figura 2.1.1</b> – Esquema dos estadios de desenvolvimento embrionário pré-implantação.....	5
<b>Figura 2.2.1</b> - A manipulação do embrião causa stress no mesmo e modifica geneticamente o embrião e o seu desenvolvimento.....	6
<b>Figura 2.2.2</b> – Diferenças no metabolismo do embrião na fase de clivagem e na fase de compactação e blastocisto.....	7
<b>Figura 2.3.1</b> - Desde o cúmulo-ovócito até à Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozoides. A e B) Complexo cúmulo-ovócito; C) Ovócito estadio MII decumulado; D) Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóide.....	11
<b>Figura 2.4.1</b> - Classificação de Blastocistos de A a D consoante a sua Massa Celular Interna e a Trofooctoderme.....	17
<b>Figura 2.5.1</b> - Tipos de movimentos de vibração molecular.....	21
<b>Figura 3.1.1</b> – Caixas de cultura embriotestada com gotas do meio de cultura G1 Plus (esquerda) e G2 Plus (direita) da <i>Vitrolife</i> . A linha horizontal divide as gotas que são usadas para lavagem do embrião (gotas acima da linha) e para a cultura em si (gotas abaixo da linha).....	23
<b>Figura 3.1.2</b> – Esquema sequencial do procedimento laboratorial de ICSI e FIV.....	24
<b>Figura 3.4.1</b> – Processo de aquisição de sinal. O processo inicia-se com a recolha de 25 µL de amostra, análise de FTIR e por ultimo o pré-processamento com o software Unscrambler X da CAMO.....	27
<b>Figura 4.1.1</b> – Espectros de meios G1 e G2 não utilizados em culturas e de meio de cultura do embrião G1-E6 obtidos ao dia 3 e 5, respetivamente.....	35
<b>Figura 4.2.1</b> - Espectros de meios de cultura individual de embriões ao dia 3 (A) e 5/6 (B). Os espectros representados a amarelo torrado foram obtidos de meios de cultura diluídos a 1/1,33 e os restantes sem diluir o meio. Os espectros a azul e vermelho no dia 3 estão saturados ou apresentam valores de absorvância em determinadas regiões superiores a 1. Estes últimos espectros estão representados pelas mesmas cores no dia 5/6. Os restantes espectros do dia 5/6 saturados estão representados a roxo ou a verde.....	37
<b>Figura 4.2.2</b> - Espectros de meios de cultura individual de embriões do dia 3 equivalentes às culturas representadas na Fig. 4.2.1 e referentes a embriões de qualidade A (linha verde), B (linha amarela) e C ou D (linha vermelha). A) Estão representados todos os espetros,	

saturados e não saturados. B) Apenas estão representados os espectros não saturados.....	40
<b>Figura 4.2.3</b> - Espectros de meios de cultura individual de embriões do dia 5/6 equivalentes às culturas representadas na Fig. 4.2.2, e referentes a embriões que atingiram blastocisto de qualidade A, B e C (linha verde), D (linha a amarelo torrado), e que não atingiram blastocisto (linha vermelha). A) Estão representados todos os espectros, saturados e não saturados. B) Apenas estão representados os espectros não saturados.....	41
<b>Figura 4.2.4</b> – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de embriões em cultura individual no dia 3 de desenvolvimento e obtidos de ovócitos vitrificados (a azul) e de ovócitos a fresco (a amarelo).....	43
<b>Figura 4.2.5</b> – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de embriões em cultura individual ao dia 3, de qualidade A ou B (verde) e qualidade D (vermelho), e do dia 5/6 que atingiram blastocisto com qualidade A, B ou C (azul), e que atingiram blastocisto de qualidade D ou que não atingiram blastocisto (vermelho).....	46
<b>Figura 4.2.6</b> – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de embriões em dia 3 de desenvolvimento com qualidade A, que ao dia 5/6 de desenvolvimento atingiram blastocisto (verde, n=2) ou que não atingiram blastocisto (vermelho, n=2).....	47
<b>Figura 2.4.7</b> – Segunda derivada de espectros de meios de cultura não diluídos de embriões ao dia 3 de desenvolvimento e que foram transferidos ao dia 5. Foram considerados dois embriões que após transferência resultaram numa gravidez bioquímica (verde, n=2) e dois embriões resultaram numa gravidez bioquímica (rosa, n=2).....	51
<b>Figura 2.4.8</b> – Segunda derivada de espectros de meios de cultura diluídos de embriões ao dia 3 de desenvolvimento e transferidos ao dia 5. Considerou-se um embrião que não deu origem a uma gravidez bioquímica (roxo, n=1) e um embrião que deu origem a gravidez bioquímica (verde, n=1).....	52
<b>Figura 4.3.1</b> - Espectros de meios de cultura ao dia 3, de embriões mantidos em grupos de 3 embriões por gota (azul) e 2 embriões por gota (vermelho). A) Estão representados todos os espectros, saturados e não saturados. B) Estão representados apenas os espectros não saturados.....	55
<b>Figura 4.3.2</b> - Espectros de meios de cultura ao dia 5/6 de embriões mantidos em grupo de 3 embriões por gota (verde) e 2 embriões por gota (amarelo). A) Estão representados todos os espectros, saturados e não saturados. B) Estão representados apenas os espectros não saturados.....	56
<b>Figura 4.3.3</b> – Análise da 2ª derivada de espectros de cultura de grupo com densidade de 3 e 2 embriões por gota. A) No dia 3 de desenvolvimento, estão representadas a gotas de cultura com densidade de 3 embriões por gota (azul) e densidade de 2 embriões por gota (vermelho).	

B) No dia 5/6 de desenvolvimento, estão representadas as gotas de cultura com densidade 3 embriões por gota (verde) e densidade de 2 embriões por gota (amarelo).....	57
<b>Figura 4.3.4</b> – Espectros de meios de cultura ao dia 3 e 5/6 de embriões em grupo de 3. A) No dia 3 de desenvolvimento comparou-se embriões de boa qualidade (verde) com embriões de má qualidade (rosa) (ver tabela 4.3.2). B) No dia 5/6 de desenvolvimento comparou-se embriões de boa qualidade (azul) com embriões de má qualidade(rosa).....	59
<b>Figura 4.3.5</b> – Espectros de meios de cultura ao dia 3 e 5/6 de embriões em grupo de 2. A) No dia 3 de desenvolvimento comparou-se gotas de boa qualidade (verde) com gotas de má qualidade (rosa) qualidade (ver tabela 4.3.2). B) No dia 5/6 de desenvolvimento comparou-se gotas de boa qualidade (azul) com gotas de má qualidade(rosa).....	60
<b>Figura 4.3.6</b> – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de 3 embriões ao dia 3 de desenvolvimento. Comparou-se a segunda derivada de meios de embriões obtidos de ovócitos a fresco (verde) com embriões de ovócitos vitrificados.....	62
<b>Figura 4.3.7</b> – Segunda derivada dos espectros de cultura em grupo de embriões, com uma densidade de 3 embriões por gota, ao dia 3 desenvolvimento. Comparou-se gotas com boa qualidade (verde), com gotas de má qualidade (rosa).....	64
<b>Figura 4.3.8</b> - Segunda derivada dos espectros de cultura em grupo de embriões, com uma densidade de 3 embriões por gota, ao dia 5/6 desenvolvimento. Comparou-se gotas de boa qualidade (azul) com gotas de má qualidade (rosa).....	64
<b>Figura 4.3.9</b> - Segunda derivada dos espectros de cultura em grupo de embriões, com uma densidade de 2 embriões por gota, ao dia 5/6 desenvolvimento. Comparou-se gotas de boa qualidade (azul, n=4), com gotas de má qualidade (rosa, n=3).....	65

## LISTA TABELAS

<b>Tabela 1.1.1</b> – Percentagem de embriões transferidos de ciclos de FIV/ICSI de acordo com a idade das mulheres, em 2015 em Portugal.....	2
<b>Tabela 2.4.1</b> – Classificação morfológica de embriões humanos em dia 2 e 3 de desenvolvimento tendo em conta o número de células, a percentagem de fragmentação celular e a simetria celular.....	16
<b>Tabela 2.4.2</b> – Classificação da Massa Celular Interna (MCI).....	16
<b>Tabela 2.4.3</b> – Classificação da Trofoectoderme (TE).....	17
<b>Tabela 2.4.4</b> – Tabela resumo dos estudos realizados com NIR.....	19
<b>Tabela 3.1.1</b> – Composição dos meios G1 PLUS e G2 PLUS da <i>Vitrolife</i> .....	25
<b>Tabela 3.2.1</b> – Distribuição dos embriões por cultura individual ou grupo, no dia 1 de desenvolvimento, consoante o número de embriões.....	26
<b>Tabela 3.3.1</b> – Razões espectrais de bandas específicas de cultura individual de embriões ao dia 3 e 5/6 de desenvolvimento.....	28
<b>Tabela 4.1.1</b> - Características de 56 embriões de cultura individual e provenientes de ovócitos doados (DON), ou seja doados vitrificados, e próprios (PROPRIOS) de ciclos a fresco após punção folicular de 12 mulheres (identificadas G01-G12). É indicada a respetiva qualidade dos embriões ao dia 3 e dia 5/6 de desenvolvimento e o seu destino: Descartado (D), Congelado (C) e Transferido (T) para o útero materno (T). Os embriões que apresentam (C-T) significa que foram criopreservados e transferidos noutra cultura. No caso dos embriões transferidos é indicado se houve ou não gravidez por análise clínica da Beta HCG, isto é se POSITIVA ou NEGATIVA. Houve embriões que atingiram blastocisto ao dia 5 de desenvolvimento (*). Os meios de cultura das pacientes G05 a G12 sofreram uma diluição de 1/1,33 de PBS antes da análise espectral.....	30
<b>Tabela 4.1.2</b> - Características de 65 embriões de cultura em grupo, com densidade de 3 ou 2 embriões por gota, e provenientes de ovócitos doados (DON), ou seja vitrificados, e próprios (PROPRIOS) de ciclos a fresco após punção folicular de 12 mulheres (identificadas G01-G12). É indicada a respetiva qualidade dos embriões ao dia 3 e dia 5/6 de desenvolvimento e o seu destino: Descartado (D), Congelado (C) e Transferido (T). Os embriões que apresentam (C-T) significa que foram criopreservados e transferidos noutra cultura. No caso dos embriões transferidos é indicado se houve ou não gravidez por análise clínica do enzima Beta HCG, isto é se POSITIVA ou NEGATIVA. Os meios de cultura das pacientes G05 a G12 sofreram uma diluição de 1/1,33 de PBS antes da análise espectral.....	33
<b>Tabela 4.2.1</b> - Resumo da qualidade dos embriões em cultura individual, no dia 3 e 5/6 de desenvolvimento.....	36
<b>Tabela 4.2.2</b> – Características dos 29 embriões transferidos das 12 pacientes incluídas no estudo. Os embriões transferidos foram mantidos em cultura individual (I) e grupo (G) e os	

embriões tiveram origem em ovócitos a fresco (FRESCO) e doados vitrificados (DON). Algumas pacientes tiveram mais do que uma transferência de embriões (1ª e 2ª) em que transferiram 1 ou 2 embriões, após a transferência o resultado de gravidez bioquímica foi ou positivo (POSITIVA) ou negativo (NEGATIVA), e foi confirmado pelo número de sacos observados na ecografia (0, 1 ou 2). As pacientes G09, G10 e G11 não é conhecido o número de sacos germinais. A amarelo encontram-se os embriões analisados na 2ª derivada do capítulo 4.2.7.....48

**Tabela 4.2.3** – Valores de p de testes estatísticos de Mann-Whitney aplicados a diversas razões de bandas espectrais de meios de cultura individual do dia 3.....53

**Tabela 4.2.4** – Valores de p de testes estatísticos de Mann-Whitney aplicados a diversas razões de bandas espectrais de meios de cultura individual do dia 5/6.....53

**Tabela 4.3.1** – Classificação e distribuição dos embriões em cultura em grupo, com densidade de 3 e 2 embriões por gota de meio de cultura.....54

**Tabela 4.3.2** – Classificação das gotas de cultura de grupo, consoante a classificação dos embriões que nela permaneceram em cultura. No dia 3 de desenvolvimento tempos a verde as gotas com boa qualidade e a rosa as gotas com má qualidade. No dia 5/6 de desenvolvimento, a azul as gotas com boa qualidade e a rosa as gotas com má qualidade.....58

## ABREVIATURAS

ATP – Adenosina Trifosfato

CCs - Células de Cúmulos

CNPMA - Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida

DMSO - Dimetilsulfóxido

FIV – Fertilização *In Vitro*

GnRH -Hormona libertadora de gonodotrofinas

hCG – Hormona Gonadotropina coriônica humana

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High-performance liquid chromatography*

HTF – Fluido Tubárico humano, do inglês *Human Tubaric Fluid*

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides, do inglês *Intracytoplasmic sperm injection*

LH - Hormona folicular luteinizante

MCI –Massa Celular Interna

MIRS – Espetroscopia de Infravermelho Médio, do inglês *Mid InfraRed Spectroscopy*

NIRS – Espetroscopia de Infravermelho Próximo, do inglês *Near InfraRed Spectroscopy*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em cadeia polimerase do inglês *polymerase chain reaction*

PGD- Diagnóstico genético pré-implantacional, do inglês *preimplantation genetic diagnosis*

PGS – Triagem genética pré-implantacional, do inglês *preimplantation genetic screening*

PMA – Procriação Medicamente Assistida

PVP – Polivinilpirrolidone, do inglês *Polyvinylpyrrolidone*

SET – Transferência de embrião único, do inglês *Single Embryo Transfer*

TE – Torfoectoderme

TEC – Transferência de Embriões Congelados

TESE – Extração testicular de esperma, do inglês *Testicular Sperm Extraction*

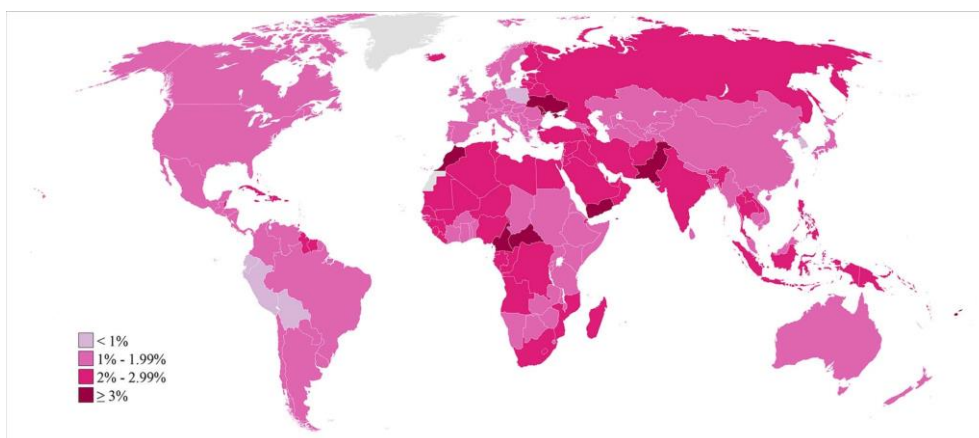
ZP - Zona Pelúcida



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. ENQUADRAMENTO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é “uma doença do sistema reprodutivo definida pela falha em obter uma gravidez clínica após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares sem proteção”<sup>1</sup>. Estimou-se que em 2010 48,5 milhões de casais no mundo inteiro eram inférteis (**Figura 1.1.1**), sendo que este número tem vindo a aumentar não só devido ao crescimento populacional como também pela mudança de hábitos de vida<sup>2</sup>. Como solução a este problema surgiram os tratamentos de procriação medicamente assistida (PMA) que não só podem ajudar casais com problemas de infertilidade, como também oferecem a possibilidade a casais homoparentais e monoparentais de terem filhos. A 25 de Julho de 1978, nasceu Louise Brown, o primeiro bebé obtido por fertilização *in vitro* no mundo. Em 1992, houve a primeira gravidez bem-sucedida obtida de microinjeção intracitoplasmática de esperma (ICSI) realizada por Gianpiero Palermo e Andre-Van-Steirteghem em Bruxelas<sup>3</sup>.



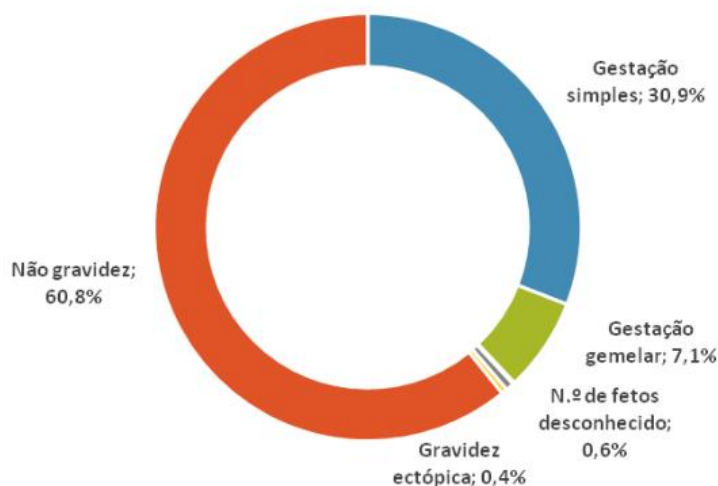
**Figure 1.1.1** - Prevalência da infertilidade primária em 2010 <sup>2</sup>.

A proporção de mulheres com infertilidade secundária, ou seja, que já tiveram uma gravidez anterior evolutiva, diminuiu, desde 1990 de 3,9% para 3,0% em mulheres entre os 20 e 44 anos, provenientes de todas as regiões do mundo. A percentagem de mulheres com infertilidade primária, ou seja, que ainda não tiveram uma gravidez evolutiva, apresentou uma diminuição pouco significativa de 1,6% em 1990 para 1,5% em 2010<sup>2</sup>. Segundo o relatório do Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA), em 2015 em Portugal a percentagem de transferência de um embrião único foi de 29,9%, de dois embriões 68,5% e de três embriões 1,6%, sendo que tendencialmente transfere-se apenas um embrião a

mulheres até aos 42 anos (**Tabela 1.1.1**)<sup>5</sup>. Apesar de ser notória uma evolução nas taxas de gravidezes evolutivas após tratamentos de PMA, existe ainda falha de implantação na maioria dos casais, de 60,8% (**Figura 1.1.2**). Apesar de as técnicas de procriação medicamente assistidas terem evoluído, a taxa de sucesso ainda é muito abaixo dos 50%<sup>4</sup>. O insucesso acontece em muitos casos por causas desconhecidas, o que leva a múltiplas transferências de embriões, tornando-se um risco para a mulher, e um fardo emocional e financeiro para os casais.

**Tabela 1.1.1** – Percentagem de embriões transferidos de ciclos de FIV/ICSI de acordo com a idade das mulheres, em 2015 em Portugal<sup>5</sup>.

FIV/ICSI	Número de embriões transferidos						TOTAL	
	1		2		3			
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
<30	127	39,1	198	60,9	0	0,0	325	100,0
30-34	409	31,1	898	68,2	9	0,7	1316	100,0
35-37	336	29,0	814	70,2	10	0,9	1160	100,0
38-39	279	30,3	628	68,3	13	1,4	920	100,0
40-42	94	22,4	306	72,9	20	4,8	420	100,0
43-44	18	17,8	69	68,3	14	13,9	101	100,0
>=45	12	48,0	11	44,0	2	8,0	25	100,0
<b>TOTAL</b>	<b>1275</b>	<b>29,9</b>	<b>2924</b>	<b>68,5</b>	<b>68</b>	<b>1,6</b>	<b>4267</b>	<b>100,0</b>



**Figura 1.1.2** - Percentagem de ciclos de FIV/ICSI que resultaram em gravidez em 2015 em Portugal, e qual o risco de uma gravidez múltipla<sup>5</sup>

Nos últimos anos a ciência tem procurado desenvolver técnicas que ajudem não só numa melhor compreensão do desenvolvimento embrionário, mas também que promovam a

escolha do embrião mais apto para transferir, ou seja que permita a seleção do embrião com maior probabilidade de dar origem a uma gravidez <sup>6</sup>. Estas novas técnicas, devem ser não-invasivas, rápidas, económicas e simples de se aplicar em contexto clínico, e ao mesmo tempo exceder a capacidade de predição convencional baseada na análise das características morfológicas dos embriões. Têm sido desenvolvidas diversas técnicas baseadas na análise do meio de cultura onde o embrião é mantido, por exemplo através da genómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica <sup>7,8</sup>. A análise metabolómica baseada em espectroscopia de infravermelho próximo (NIR, do inglês *Near InfraRed*) apresentou em alguns estudos resultados promissores, no entanto, existem alguns estudos que não observam benefícios da técnica NIR em relação com observação morfológica dos embriões <sup>9</sup>. Uma técnica alternativa à espectroscopia NIR, que poderia aumentar o poder de previsão e a robustez deste método, é a espectroscopia de infravermelho médio (MIR, do inglês *Mid InfraRed*) que fornece um espectro mais informativo sobre a composição molecular da amostra, mantendo a simplicidade da análise.

## 1.2. OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo promover o aumento da eficiência de métodos de PMA, baseados em Fertilização *In Vitro* (FIV) e ICSI, por desenvolvimento de um novo método não-invasivo, baseado na análise de espectroscopia MIR do meio de cultura *in vitro* do embrião humano, que permite prever a qualidade do embrião ao longo da cultura e da sua capacidade de nidificação no útero materno. O método a desenvolver deve ser rápido, económico e simples de implementar em contexto clínico. Para conseguir isso, deve ser realizado um estudo retrospectivo com base na análise dos meios de cultura descartados, considerando a qualidade dos embriões e no caso destes serem transferidos a gravidez bioquímica. O projeto não deve interferir com as decisões relativas à seleção de embriões ou no fluxo de trabalho normal dos procedimentos de PMA. Pretende-se realizar um estudo seguro e sem risco para os participantes, contribuindo para o futuro aumento da eficiência dos tratamentos de PMA.

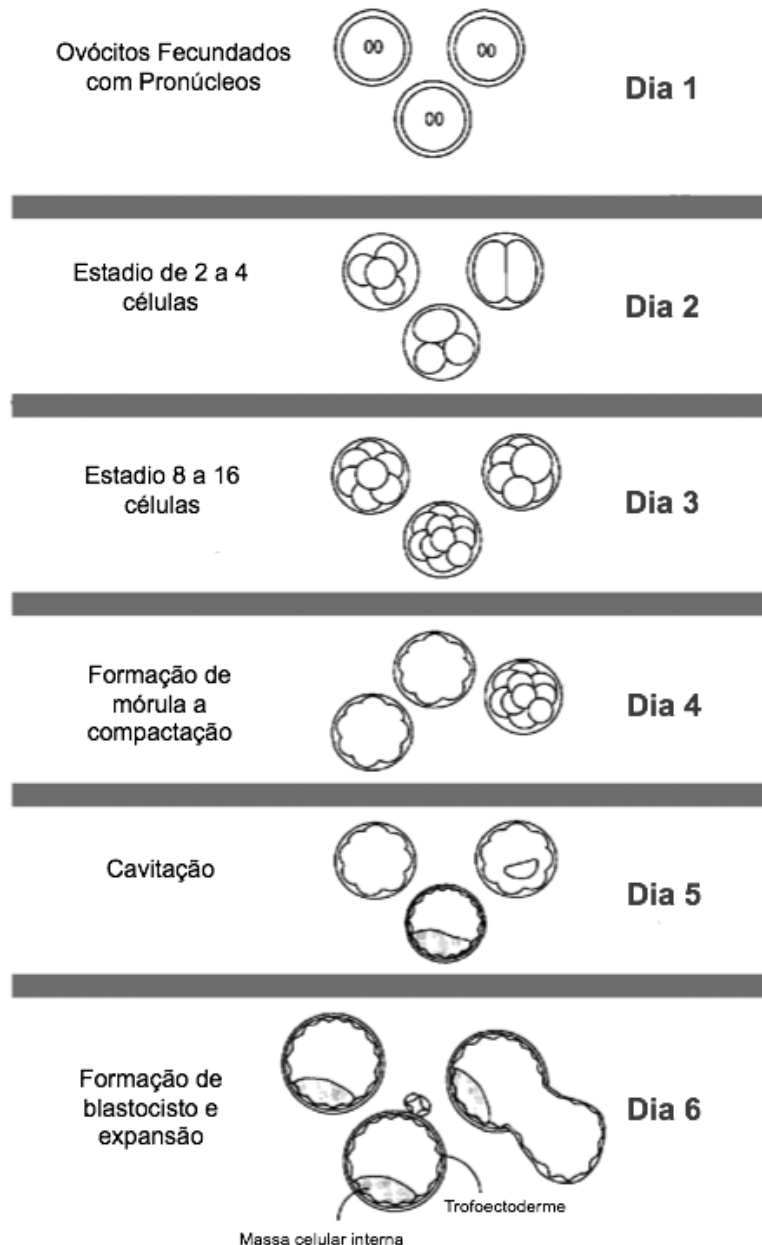
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A seleção do embrião com maior potencial de implantação é o principal alvo da PMA. Atualmente a técnica de seleção embrionária mais utilizada na prática corrente laboratorial é a análise morfológica. Para a análise morfológica ser bem sucedida é necessária uma boa compreensão do desenvolvimento embrionário, do metabolismo e da regulação parácrina e autocrina do embrião com o meio de cultura envolvente <sup>10</sup>.

### 2.1. EMBRIOGÉNESE

As primeiras oito semanas desde a primeira divisão celular do ovócito são denominadas de embriogénese <sup>11</sup>. Após a fecundação, o embrião humano inicia a fase de clivagem. Nas 24 horas após a fecundação realiza-se a primeira divisão mitótica que dá origem a duas células filhas idênticas. Durante a primeira divisão celular uma grande parte do citoplasma ovocitário, que é dividido entre os blastómeros, contém percussores e organelos essenciais para a síntese proteica e para o metabolismo celular. Os genes maternos expressos regulam as divisões celulares, a síntese proteica e o metabolismo do embrião até à ativação do genoma embrionário, que começa nos embriões humanos aproximadamente entre as divisões celulares de 4 a 8 células (**Figura 2.1.1**)<sup>12,13</sup>.

Até ao estadio de 8 a 16 células os blastómeros são esféricos e aparentemente idênticos. Após esta fase de divisão celular o embrião inicia-se a fase de compactação caracterizada pela conexão física entre os blastómeros. Durante o estadio de clivagem até à pré-compactação, as células são totipotentes, ou seja têm a capacidade de dar origem a qualquer tipo de linha celular e levar à formação de um novo embrião, como qualquer célula do embrião e da placenta <sup>14</sup>. Durante o processo de compactação em que se maximiza o contacto celular e minimiza o espaço intercelular, é expressa a E-caderina e são formadas as junções de oclusão. Este conjunto de ações forma um epitélio primitivo que cobre o embrião, denominado por trofoectoderme (TE), que é considerado o primeiro processo de diferenciação celular. A Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase é ativada na membrana basal criando um gradiente iónico que permite a formação de uma cavidade, o blastocele. Dentro do blastocele um aglomerado de cerca de 80 células indiferenciadas forma a massa celular interna (MCI) que futuramente vai dar origem ao feto. Após a formação da cavidade, continuam a ocorrer divisões celulares, principalmente na TE, e há um aumento da ação das aquaporinas permitindo a entrada de mais fluido no blastocele e consecutivamente provocando a sua expansão<sup>15,12,13</sup>.



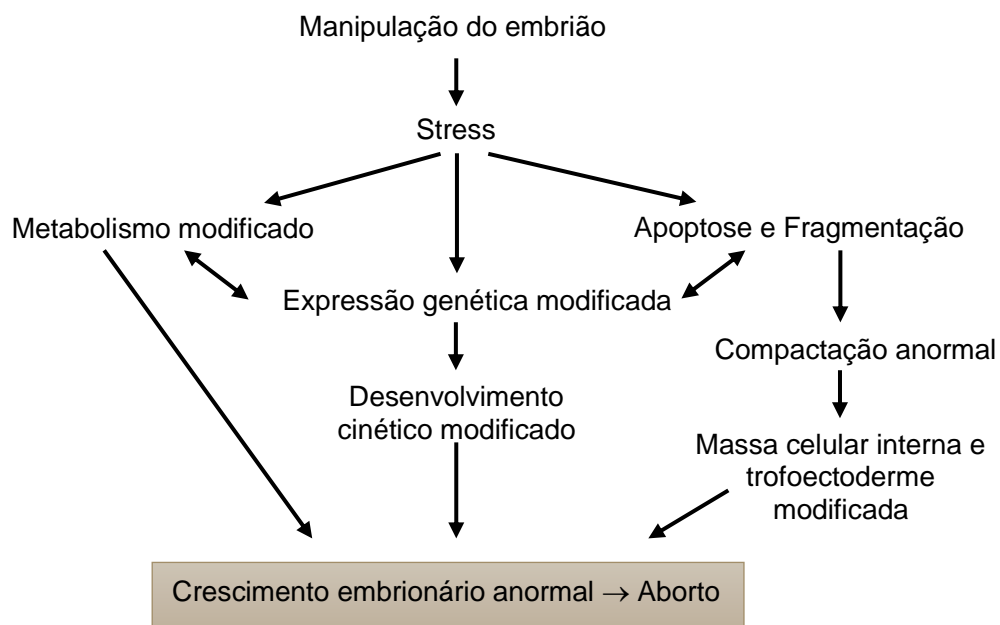
**Figura 2.1.1** – Esquema dos estádios de desenvolvimento embrionário pré-implantação <sup>15</sup>.

## 2.2. METABOLISMO DO EMBRIÃO

Nos estádios iniciais de clivagem celular do embrião, existe produção de Adenosina Trifosfato (ATP) sustentada pela oxidação de piruvato, lactato e aminoácidos <sup>16</sup>. Durante este período o outro método de produção de energia na forma de ATP é a cadeia respiratória, contudo como as necessidades energéticas do embrião são menores há menos consumo de oxigénio e por consequência menor produção de radicais livres de oxigénio. Desde a fase de

compactação até à formação de blastocisto existe um aumento da necessidade energética do embrião devido ao transporte ativo de iões  $\text{Na}^+$  realizada pela ATPase K na TE. Também neste período existe uma elevada absorção nutricional por parte do blastocisto, aumentando o consumo de glucose e, conseqüentemente como resultado da glicólise há a excreção elevada de lactato <sup>17,16</sup>.

Em relação ao metabolismo do embrião em FIV, são diversas as causas de alterações no metabolismo do embrião em relação a embriões obtidos por processos de fecundação normais, algumas destas alterações são devido à prática laboratorial. Há estudos que defendem que a manipulação do embrião em laboratório causa *stress* no mesmo e conseqüentemente modifica a sua atividade metabólica (**Figura 2.2.1**). Estas mudanças no metabolismo podem afetar a expressão genética e provocar um crescimento fetal anormal <sup>18</sup>. Por exemplo, a hormona Gonadotropina Coriônica humana (hCG), uma das hormonas mais importantes na deteção da gravidez bioquímica, produzida pela trofoectoderme do embrião após a implantação, é também detetada no meio de cultura do embrião. Há estudos que correlacionam a análise da concentração de hCG do meio de cultura com a probabilidade de sucesso de implantação, e que observam que embriões desvitrificados excretam diferentes concentrações desta hormona para o meio <sup>19</sup>.

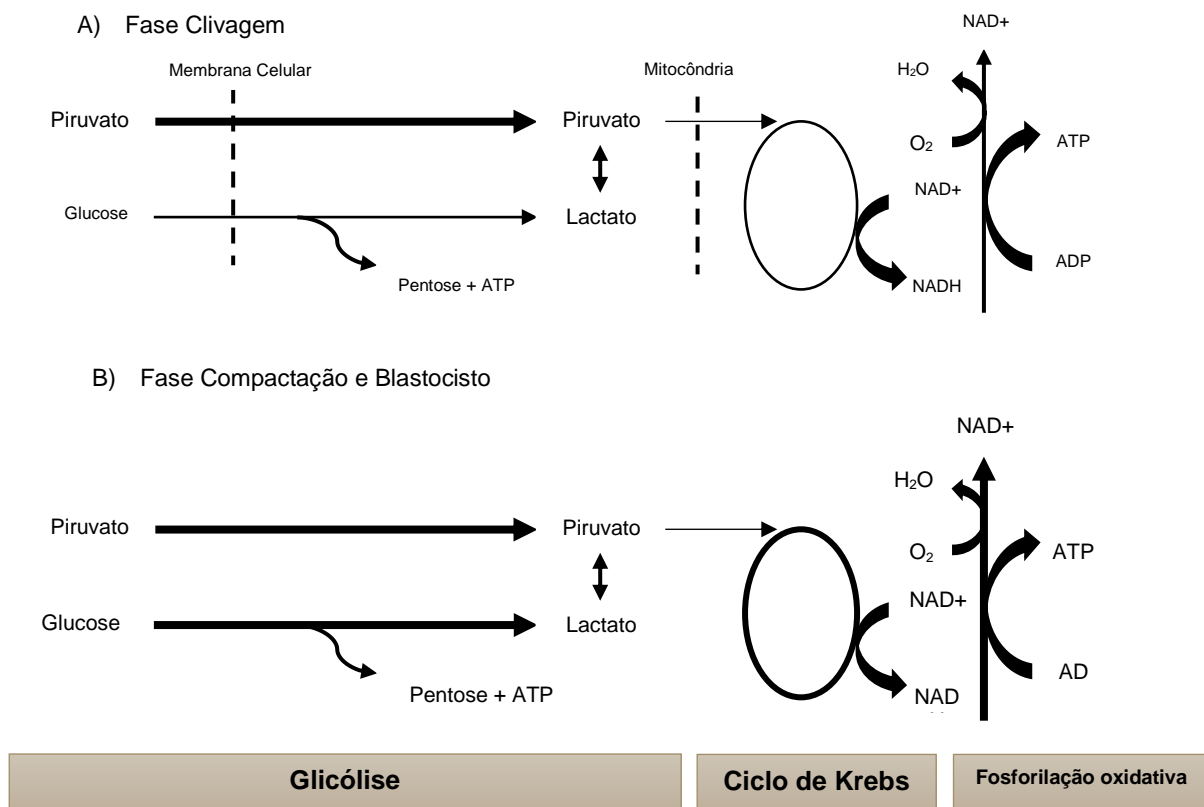


**Figura 2.2.1** - A manipulação do embrião causa stress no mesmo e modifica geneticamente o embrião e o seu desenvolvimento, adaptado de Sites et al. <sup>18</sup>.

### 2.2.1. Metabolismo da Glucose, Piruvato e Lactato

O ovócito é cercado por células que têm a capacidade de produzir piruvato e lactato a partir de glucose, este processo cria uma alta concentração de piruvato e lactato em torno do ovócito fertilizado. Sendo estes os substratos mais utilizados para a produção de ATP desde a fertilização até à fase de pós compactação. Estima-se que a concentração de piruvato nesta fase ronda os 0,32 mmol / L, lactato 10,5 mmol / L e de glucose 0,5 mmol / L<sup>20</sup>.

No estadio de clivagem a taxa de produção de ATP é baixa, uma vez que o embrião nesta fase não necessita de muita energia, e os substratos mais utilizados no ciclo dos ácidos tricarboxílicos são o piruvato e o lactato (**Figura 2.2.2.**). Após a compactação o embrião aumenta a sua necessidade energética (maior consumo de ATP), e o consumo de glucose <sup>21</sup>.



**Figura 2.2.2** – Exemplos de diferenças no metabolismo do embrião na fase de clivagem e na fase de compactação e blastocisto, adaptado de Thompson <sup>21</sup>.

A absorção de glucose em embriões em estadio de clivagem é relativamente baixa, contudo aumenta na transição de mórula para blastocisto. Este aumento está diretamente associado ao potencial de desenvolvimento e à viabilidade do embrião. Embriões que atingem blastocisto metabolizam glucose duas vezes mais que os embriões que não atingiram

blastocistos, sendo que também os embriões de má qualidade também consomem menos glicose que os embriões com melhor qualidade <sup>22,20</sup>.

A concentração de piruvato utilizado por blastocistos é superior à concentração de glicose, contudo existe um declínio de absorção de piruvato neste estadio. Assim sendo, os meios de cultura sequenciais na fase de clivagem apresentam supressão de glicose até à pré-compactação e remoção da supressão durante o desenvolvimento pós-compactação até blastocisto <sup>21</sup>. A produção de lactato aumenta ao longo do desenvolvimento do embrião resultado do aumento do consumo da glicose <sup>23</sup>.

### **2.2.2. Metabolismo de Aminoácidos**

Os aminoácidos apresentam um papel importante no desenvolvimento embrionário pré-implantação, nomeadamente como percussores biossintéticos, como tampão do pH intracelular, como antioxidantes e como fontes de energia. São também uma peça fundamental na sinalização e diferenciação celular e na regulação de toda a atividade metabólica do embrião<sup>22,20</sup>. A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High-performance liquid chromatography*) é a técnica mais utilizadas na análise de aminoácidos excretados e absorvidos pelos embriões humanos <sup>24</sup>. Por exemplo, Houghton et. al.<sup>25</sup> realizaram um estudo em que analisaram o meio de cultura de 221 embriões humanos de 52 ciclos de fertilização in vitro com ICSI, através de HPLC. Os embriões foram cultivados individualmente em gotas de 4 µL até ao dia 2 de desenvolvimento, momento em que foram transferidos. Os autores observaram que os embriões que atingem blastocisto apresentam maior consumo de glutamina, arginina e metionina e menor de alanina e asparagina nos dias 2 e 3 de desenvolvimento<sup>25</sup>. A glicina atua como tampão do pH intracelular do embrião, e a glutamina e o asparto como fonte de energia na fase de clivagem <sup>20</sup>.

### **2.2.3. Amónia**

A L-glutamina, um dos aminoácidos usados no meio de cultura de embriões, ao longo do desenvolvimento embrionário é metabolizado em amónia. O embrião afeta assim a concentração de amónia no meio que o rodeia, provocando perturbações no seu desenvolvimento <sup>26</sup>. Garder D.K. et al. <sup>27</sup> realizaram um estudo em que compararam o desenvolvimento de um grupo controlo de embriões humanos cultivados em condições normais, em 7 µL de meio G1 e G2 (*Vitrolife, Sweden*) em 5%O<sub>2</sub>, 6% CO<sub>2</sub> e 89% de N<sub>2</sub>, com um grupo de embriões humanos cultivados, nas mesmas condições, mas expostos a maiores concentrações de amónia. Observaram que as concentrações elevadas de amónia afetam

negativamente o desenvolvimento do embrião, decrescendo a taxa de chegada a blastocisto. Estes autores observaram também que o excesso de amónia no meio afeta a expressão de 390 genes que estão envolvidos no metabolismo, comunicação celular e manutenção celular<sup>27</sup>. Virant-Klun et. al.<sup>28</sup> também avaliaram a influencia da concentração de amónia no desenvolvimento do embrião, num estudo que incluiu 281 embriões humanos de ciclos de fertilização *in vitro* que foram cultivados em 0,5 mL de meio sequencial M1 e M2 (*Universal IVF Medium, Medi-Cult*). O objetivo do estudo foi após a cultura dosear a concentração de amónia no meio e relacionar com o desenvolvimento do embrião. Para tal, após a cultura foram recolhidos, ao dia 4 de desenvolvimento, 0,25 mL de meio, sendo a concentração de amónia quantificada por análises químicas. Os autores observaram que dos embriões que apresentavam concentrações mais elevadas de amónia no meio de cultura ( $\geq 119 \mu\text{mol/L}$ ) ao dia 4 de desenvolvimento 43% atingiam blastocisto, enquanto que os embriões que apresentavam uma concentração normal de amónia no meio de cultura ( $< 119 \mu\text{mol/L}$ ) atingiram 69% blastocisto<sup>28</sup>.

### 2.3. TÉCNICAS DE PROcriação Medicamente Assistida

A avaliação do fator de infertilidade tem como base a história clínica dos pacientes e testes de diagnóstico médico, e tem como objetivo é entender a causa e indicar o tratamento mais indicado<sup>2</sup>. Existem dois tipos de infertilidade primária e secundária, primária quando a mulher é incapaz de gerar um filho, sendo ou pela incapacidade de engravidar ou por abortos consecutivos, e secundária em que após já ter tido uma gravidez que resultou em parto não consegue voltar a engravidar<sup>1</sup>.

A PMA envolve a manipulação de gametas femininos, gametas masculinos e embriões. Geralmente, o procedimento inicia-se com uma estimulação ovárica na mulher seguida da recuperação dos cúmulos oocitários através de uma punção folicular. Existem dois tipos de procedimentos de fertilização, a FIV clássica, que é o procedimento mais aproximado do processo natural, e a ICSI, na qual o espermatozoide é injetado dentro do ovócito. Os tratamentos podem ser executados em ovócitos da mulher a fresco, ovócitos da mulher vitrificados ou em ovócitos de dadora vitrificados ou a fresco<sup>24</sup>. Os embriões resultantes podem ficar em evolução em cultura *in vitro* até atingir o estado de blastocisto que acontece geralmente ao dia 5 ou 6 de desenvolvimento, sendo que durante o período de evolução existem três destinos possíveis: transferido para o útero, descartado ou criopreservado.

### 2.3.1. Estimulação ovárica

O agonista da hormona libertadora de gonodotrofinas (GnRH) é usado para gerar uma hipofisectomia reversível, que suprime a secreção da hormona folicular luteinizante (LH). Este efeito é adquirido em aproximadamente 2-3 semanas, sendo posteriormente administradas gonadotrofinas para estimular a foliculogenese. O uso do análogo de GnRH com a gonadotrofina proporciona a maturação folicular e ovocitária. Quando os folículos atingem o tamanho de 16 mm são considerados maduros e, como tal, é necessário desencadear a ovulação cessando a administração tanto do antagonista da GnRH como da gonadotrofina, e introduzindo injeções de . Após 36 horas da injeção de hCG é realizada a ultrassonografia transvaginal <sup>29</sup>.

### 2.3.2. Punção Folicular

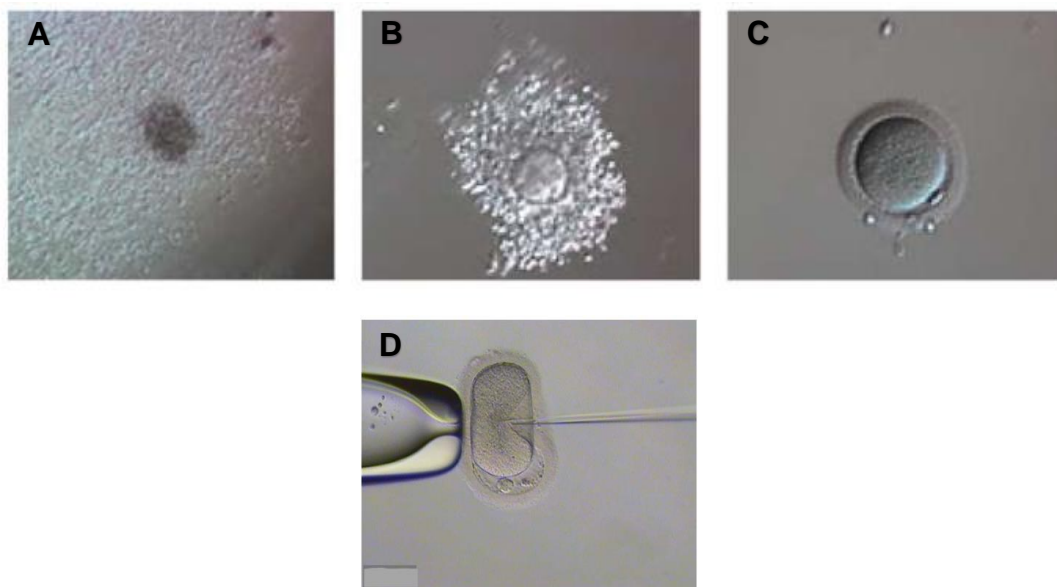
Após as 36 horas da injeção da hCG os cúmulos-ovócito são recolhidos através de um procedimento cirúrgico com sedação ou anestesia geral. Habitualmente é realizado com uma agulha fina, associada a uma seringa, que perfura a parede da vagina até aos ovários e aspira o líquido folicular com os complexos cúmulos-ovócito. O conteúdo recolhido é observado ao microscópio por um embriologista. Os cúmulos são depois lavados para eliminar o líquido folicular e o sangue, e posteriormente mantidos em cultura em condições de temperatura, humidade e gasificação controladas (a 37 °C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, e 90% de humidade) <sup>29</sup>.

### 2.3.3. Fertilização *In Vitro*

A FIV é recomendada nos casos clínicos em que não existe um fator de infertilidade masculino, isto é, em que os espermatozoides são de boa qualidade (normozoospermicos). A amostra de sémen a fresco ou congelada é capacitada por gradientes de densidade e *swim-up*. O gradiente de densidade tem como objetivo eliminar células e espermatozoides apoptóticos. Seguem-se duas lavagens com meio G-IVF e para finalizar, é colocado meio para os espermatozoides móveis progressivos se separarem dos outros, o *swim-up*. Após a capacitação é feita uma contagem do número de espermatozoides móveis progressivos por mL, sendo que o objetivo é inseminar 100 000 espermatozóides/mL. Após 2-4 horas da punção folicular os complexos cúmulo-ovócito e o volume de esperma capacitado corrigido são colocados juntos na caixa específica de FIV que contem 4 poços, cada um deles com 500 µL de meio G-IVF (Vitrolife, Sweden) e 500 µL de óleo mineral (Vitrolife, Sweden). Os gametas permanecem incubados juntos durante 16-20 horas, para que ocorra fecundação <sup>30</sup>.

### 2.3.4. Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides

A ICSI é recomendada para pacientes que têm uma percentagem inferior ao normal de espermatozoides móveis no ejaculado (astenozoospermia), ou que têm uma concentração de espermatozoides inferior a 15 milhões por mL (oligozoosperma ou criptozoospermia) ou uma percentagem de espermatozoides com morfologia normal inferior a 4% (teratozoospermia). A amostra de sêmen deve ser tratada consoante a sua origem, se fresca, congelada ou de biópsia testicular (TESE, do inglês *Testicular Sperm Extraction*), ou de acordo com as suas características de concentração, mobilidade e percentagem de formas normais. Assim, a amostra pode ser processada com gradientes de densidade, utilizada, por exemplo, em casos para aumentar a concentração espermática; com concentração e ressuspensão, utilizada em casos de baixa concentração espermática; e *swim-up*. Duas horas após a punção folicular, os ovócitos são decumulados enzimaticamente, ou seja, são retiradas todas as células do cúmulo, através de uma breve exposição à enzima hialuronidase. Após a decumulação todos os ovócitos com estadio MII da meiose, são aptos para a ICSI (**Figura 2.3.2**). Na microinjeção são selecionados para injetar os espermatozoides com melhor mobilidade e morfologia. O ovócito é orientado com o glóbulo polar às 11 horas e a agulha de ICSI entra no ovócito com o espermatozoide às 16 horas. Após a microinjeção, os ovócitos permanecem incubados durante 16-20 horas<sup>30,31</sup>.



**Figura 2.3.1** -Desde o cúmulo-ovócito até à Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóides<sup>32, 31</sup>. A e B) Complexo cúmulo-ovócito; C) Ovócito estadio MII decumulado; D) Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóide.

### **2.3.5. Cultura de Embriões *In Vitro***

O embrião pode permanecer em cultura até ao dia 5 ou 6 de desenvolvimento, numa estufa a 37 °C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, e 90% de humidade. Os embriões podem ser cultivados em meio de cultura único, isto é não há troca de meio ao longo do tempo, ou sequencial, onde há troca de meio ao longo do tempo <sup>33</sup>.

A cultura de embriões humanos tem sofrido muitas alterações ao longo do tempo de forma a melhorar o desenvolvimento do embrião e aumentar a taxa de embriões que atingem blastocisto. Estudos apontam que a cultura em grupo de embriões influencia positivamente o desenvolvimento dos embriões, uma vez que há uma modificação do microambiente devido à excreção e depleção de vários metabolitos no meio envolvente <sup>34,35</sup>. Contudo, há também quem defenda que os embriões em cultura de grupo não só podem esgotar os substratos presentes no meio, como os embriões com baixa qualidade podem influenciar negativamente o desenvolvimento dos embriões circundantes. Assim sendo, na cultura de grupo existem um possível benefício em agrupar os embriões consoante a sua qualidade <sup>34</sup>. Recentemente Virant-Klun <sup>28</sup> relatou que o aumento da concentração de amónia na cultura de grupo ao dia 4 de desenvolvimento diminui a taxa de chegada a blastocisto no dia 5 de desenvolvimento.

O principal problema na análise de resultados de cultura em grupo é o facto de cada grupo de investigação estabelecer diferentes volumes de cultura e diferente densidade embrionária, tornando difícil a comparação de resultados. Investigadores, como Tao Tao <sup>34</sup>, defendem que a cultura em grupo de embriões agrupados de acordo com a sua qualidade no dia 3 de desenvolvimento promovem a taxa de desenvolvimento a blastocisto em comparação com os embriões que são agrupados aleatoriamente. Thomas Ebner, observou um aumento da taxa de chegada a blasto em embriões em cultura em grupo relativamente a embriões de cultura individual, após uma cultura *in vitro* de 30 µL de meio de cultura com distribuição aleatória de embriões <sup>35</sup>. Existem, no entanto, estudos que não observaram diferenças significativas na taxa de chegada a blastocisto de embriões que permaneceram em cultura de grupo, relativamente a embriões em cultura individual <sup>36,37,38</sup>.

### **2.3.6. Transferência e Vitrificação**

Os ciclos podem ter transferência de embriões a fresco, ou seja, a senhora é estimulada, é feita a punção folicular e os embriões são transferidos nesse ciclo. Ou, em alguns casos, como por exemplo na hiperestimulação ovárica em que existe uma resposta excessiva aos medicamentos usados para o crescimento dos óvulos, todos os embriões são

criopreservados e posteriormente é programado outro ciclo de transferência de embriões congelados (TEC).

Após a fecundação os embriões haploides e triploides são descartados e apenas os diploides com dois pronúcleos visíveis continuam em cultura. Os embriões que ficam em cultura são habitualmente transferidos no dia 3 ou 5 de desenvolvimento, sendo que tendencialmente dá-se preferência à transferência de embriões em dia 5 de desenvolvimento, estadio de blastocisto. Os embriões excedentários, que não são transferidos, são criopreservados no dia 3, 5 ou 6 de desenvolvimento.

A seleção do embrião para a transferência é efetuada através da análise morfológica. O embrião que apresentou uma fecundação normal (diploide), que desenvolveu regularmente, e que apresenta ao dia 3 ou 5 a melhor qualidade comparativamente a outros embriões, é considerado apto para a transferência<sup>39</sup>. No momento da transferência o embrião é aspirado através de um cateter, e posteriormente inserido vaginalmente de forma a ser depositado no endométrio da mulher de forma eco-guiada. Os embriões excedentários são então vitrificados, por exemplo segundo o método descrito por Kuwayama<sup>40</sup>. Neste método, o embrião é colocado numa solução de equilíbrio (ES) à temperatura ambiente, se o embrião for de dia 3 de desenvolvimento permanece 8-10 minutos neste meio, e de dia 5 ou 6 de desenvolvimento permanece 10-12 minutos. A solução ES é composta por 7,5% de etilenoglicol (EG) e 7,5% de dimetilsulfido (DMSO). Após o tempo de equilíbrio o embrião é transferido para a solução de vitrificação (VS) por 1 minuto. Esta solução é composta por 15% de EG, 15% DMSO e 0,5M de sacarose. Após um minuto no meio VS o embrião é colocado numa *Cryotop* e imediatamente submergido em azoto líquido a -196°C<sup>41,40</sup>.

### **2.3.7. Deteção da gravidez**

Existem dois tipos de exames que nos permitem verificar se existe gravidez após a transferência embrionária, a análise (de sangue) da hormona Coriónoca Humana, usualmente denominada Beta hCG, que indica se existe ou não gravidez a nível bioquímico, e a ecografia onde se avalia a existência de saco germinativo com placa cardíaca e batimentos, confirmando-se a gravidez bioquímica, ou seja, indica se a gravidez evoluiu assim como o número de embriões que implantaram.

A análise da Beta hCG é realizada através de uma dosagem da hormona no sangue, que é feita duas semanas após o dia da fecundação. A Beta hCG é uma hormona produzida pela trofoectoderme do blastocisto de forma a manter a produção de progesterona<sup>42</sup>.

## 2.4. TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO E SELEÇÃO EMBRIONÁRIA

De forma a aumentar a probabilidade de sucesso de gravidez, os centros de PMA consideraram durante muitos anos a transferência múltipla de embriões. No entanto, as gravidezes múltiplas trazem riscos de saúde para as mulheres e para o feto<sup>43</sup>. Desta forma, nos dias de hoje limita-se o número de embriões por transferência, dando preferência à transferência única de embriões (SET, do inglês *Single Embryo Transfer*). Cria-se assim uma maior pressão no momento da escolha do embrião a transferir, portanto surge a necessidade de gerar técnicas sensíveis que possam avaliar melhor o embrião apto, de forma invasiva ou não invasiva<sup>44</sup>.

O método mais tradicional de seleção embrionária é a avaliação morfológica. Após a fertilização avalia-se o número de glóbulos polares do zigoto, o número e tamanho dos pronúcleos, e a disposição e número dos nucléolos. Nas fases de desenvolvimento que prosseguem, fase de clivagem, é avaliado o número de células e o grau de fragmentação. Quando o embrião atinge blastocisto é avaliada a massa celular interna e a trofoectoderme<sup>44</sup>.

Devido à necessidade de seleção de embriões em casais com elevada probabilidade de terem filhos com doenças genéticas hereditárias, foi introduzido no final da década de 1980 um método de seleção embrionária invasivo, o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD). Uma vez que há uma crescente tendência para mulheres com idade avançada a recorrerem a tratamentos de PMA, surgiu a necessidade de criar controlo genético pré-implantacional (PGS), que permite despistar mutações propícias da idade e que influenciam o desenvolvimento embrionário e sucesso da gravidez. A maioria das clínicas em Portugal já tem disponível esta técnica, por exemplo a MaloClinic-Ginemed, contudo é muito dispendiosa para os casais, como tal, é utilizada apenas em casos excecionais de falha sucessiva de implantação. Esta técnica é bastante invasiva para o embrião, existindo a possibilidade de este não sobreviver<sup>45</sup>.

A análise morfológica revela ser uma análise subjetiva do embrião, como tal, existe um direcionamento para tecnologias mais sofisticadas na seleção de ovócitos ou embriões com maior potencial de implantação. Estas tecnologias incluem as ciências emergentes “ómicas”, tais como, genómica, transcriptómica, proteómica e metabolómica<sup>46</sup>. Na área da transcriptómica destacam-se estudos de aquisição de conhecimento endometrial, com o objetivo de melhor conhecer a receptividade genómica do endométrio ao embrião, e desta forma melhorar a taxa de implantação<sup>47</sup>. Destacam-se também estudos que tiveram como objetivo analisar a expressão genética pré-implantacional, com o objetivo de melhorar o conhecimento da dinâmica do embrião. Como é o caso do estudo de Vassena R. et al. em que através de uma análise por reação em cadeia polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) da zona pelúcida (ZP), que cobre o embrião, conseguiram identificar a ativação

hierárquica dos genes envolvidos na regulação da pluripotência e desenvolver uma base de dados de expressão genética pré-implantacional<sup>48</sup>. No que diz respeito à proteómica, Braga D. et al.<sup>49</sup> desenvolveram um estudo com o objetivo de identificar as proteínas existentes nas células de cúmulos humanos (CCs). Este estudo incluiu 40 pacientes, em que os embriões foram obtidos por ICSI e transferidos ao dia 5 de desenvolvimento. As amostras foram divididas de acordo com a taxa de formação de blastocisto e o resultado de gravidez bioquímica. O grupo que atingiu blastocisto (n=10) incluiu as pacientes em que todos os embriões formaram blastocisto, e o grupo que não atingiu blastocisto (n=10) incluiu pacientes em que nenhum embrião atingiu blastocisto. Foram também tidos em consideração o grupo em que o resultado foi gravidez bioquímica positiva (n=10) e o grupo em que o resultado foi obtive gravidez negativa (n=10). Após a punção folicular os CCs foram isolados por estiramento com duas agulhas, e posteriormente armazenados a -20°C. Após uma análise baseada em espectrometria de massa os autores detetaram 87 proteínas, das quais 30 foram expressas exclusivamente no grupo que atingiu blastocisto, 17 expressas exclusivamente no grupo que não atingiu blastocisto, e 40 expressas em ambos os grupos. No grupo em que o resultado de gravidez foi positivo foram identificadas 19 proteínas exclusivas e no grupo em que o resultado de gravidez foi negativo foram identificadas 16 proteínas exclusivas<sup>49</sup>.

O genoma humano consiste em mais de 25 000 genes que codificam aproximadamente 200 000 transcritos e mais de 1 milhão de proteínas, contudo do metabolismo humano resultam apenas aproximadamente 3000 metabolitos. Este número mais reduzido de metabolitos torna a análise metabolómica mais rápida e simples em comparação com as análises genómicas, transcriptómicas e proteómicas. A metabolómica, em que se foca este trabalho, é definida como a identificação e quantificação não direcionada de todos os produtos finais de baixo peso molecular do metabolismo (metabolitos)<sup>50</sup>.

A análise de metabolitos a partir do meio de cultura do embrião foi proposta como diagnóstico não invasivo da viabilidade do embrião. Nos últimos anos, o estudo do metabolismo embrionário tem sido alvo de muitos trabalhos uma vez que existe uma correlação entre as concentrações de substâncias excretadas pelo embrião para o meio e a qualidade embrionária. Esta técnica é não invasiva, uma vez que apenas utiliza o meio de cultura onde o embrião permaneceu em *in vitro*. As técnicas mais utilizadas para caracterizar o meio de cultura são por exemplo as baseadas em HPLC, técnicas de metabolómica baseadas por exemplo em cromatografia associadas a espectrometria de massa, e de espectroscopia de infravermelho, NIR e MIR na análise metabolómica<sup>45</sup>.

## 2.4.1. Morfologia

A avaliação da morfologia do embrião é a técnica mais utilizada para a seleção embrionária, contudo a sua precisão ainda é insuficiente <sup>24</sup>. Os parâmetros morfológicos avaliam os embriões tanto em estadio pronuclear, de clivagem e de blastocisto. Estes têm sido melhorados assim como as técnicas de visualização embrionária. Por exemplo, o sistema *Time Lapse*, que tem sofrido melhorias significativas, tem contribuído para o aumento da taxa de implantação <sup>24</sup>.

Para a avaliação morfológica a *Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción* (ASEBIR), disponibiliza uma classificação que é adotada pela maioria das clínicas de reprodução assistida em Portugal. A classificação no dia 2 e 3 de desenvolvimento baseia-se no número de blastómeros e no tamanho de blastómeros, estado específico, e da presença ou ausência de fragmentação celular. No dia 5 e 6 de desenvolvimento avalia-se o grau de expansão dos blastocistos, a qualidade da MCI e da TE (**Figura 2.4.1**).

**Tabela 2.4.1** – Classificação morfológica de embriões humanos em dia 2 e 3 de desenvolvimento tendo em conta o número de células, a percentagem de fragmentação celular e a simetria celular. (Adaptado de *Cuadernos de Embriología Clínica*) <sup>51</sup>.

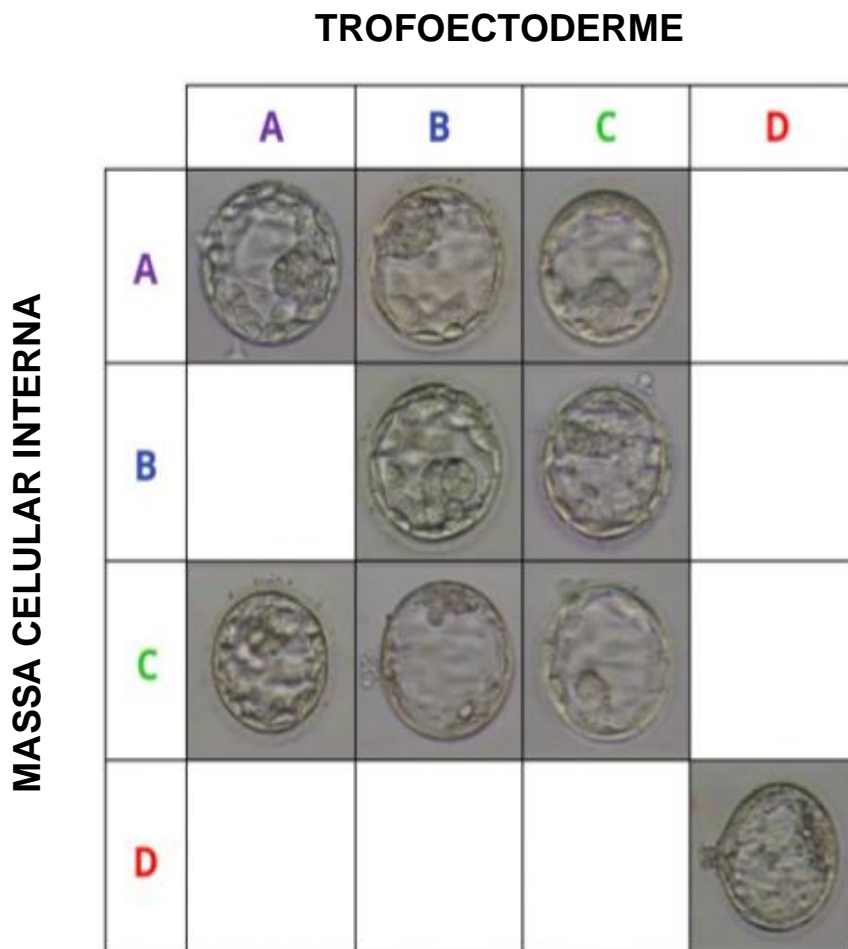
Grau	Dia	Nº de células	% Fragmentação	Simetria Celular
A	D+2	4	≤10%	Estado específico
	D+3	7,8		
B	D+2	5	>10-25%	4→7 células Não estado específico em D+3
	D+3	5→7-10 4→9,10		
C	D+2	2,3,6	>25-35%	2,4,8 células Não estado específico
	D+3	6,11,12 2,3→6-9 6→8-10		
D	D+2	3 (Não estado específico), >6	>35%	3 células Não estado específico em D+2
	D+3	3-5, 1 células a mais que em D+2		

**Tabela 2.4.2** – Classificação da Massa Celular Interna (MCI) (Adaptado *Cuadernos de Embriología Clínica*) <sup>51</sup>.

Categoria	Tamanho da MCI (µm <sup>2</sup> )	Coesão da MCI
A	3800-1900	Compacta
B	3800-1900	Não compacta
C	1900	Indiferente
D	Sinais de Degeneração	
Excluídos	Degenerada	

**Tabela 2.4.3** –Classificação da Trofoectoderme (TE). (Adaptado de *Cuadernos de Embriología Clínica*)<sup>51</sup>.

Categoria	Descrição da Trofoectoderme
A	Homogénea, Coesa e com muitas células
B	Homogénea mas com poucas células
C	Poucas células
D	Sinais de degeneração
Excluídos	Degenerada



**Figura 2.4.1** - Classificação de Blastocistos de A a D consoante a sua Massa Celular Interna e a Trofoectoderme (Adaptado de *Cuadernos de Embriología Clínica*)<sup>51</sup>.

## 2.4.2. Metabolismo

Os marcadores metabólicos são uma das técnicas de avaliação embrionária não invasiva, sendo que neste momento estão a ser otimizadas várias técnicas quantitativas para monitorizar a absorção de nutrientes específicos pelo embrião do meio circundante, e detetar também a secreção de metabolitos e fatores para o meio. Para esta avaliação do meio de cultura, as técnicas não invasivas disponíveis devem cumprir critérios específicos que as permitam ser aplicáveis em laboratórios de PMA:<sup>30</sup>

1. A capacidade de medir as alterações do meio sem prejudicar o embrião.
2. A capacidade de medir a mudança num curto espaço de tempo.
3. A capacidade de medir a mudança de forma consistente e com precisão.





Atualmente, são muitas as técnicas analíticas exploradas para a análise não invasiva do embrião, a mais utilizada baseia-se na análise morfológica do embrião, e mais recentemente no meio de cultura onde o embrião é cultivado *in vitro*. As técnicas mais relevantes são as baseadas em espectrometria de massa, a HPLC e a espectroscopia de infravermelho, que é a técnica em que se vai basear este trabalho.

O HPLC pode analisar por exemplo o consumo e secreção de aminoácidos no meio de cultura de embriões <sup>45</sup>. A espectroscopia de massa é uma técnica sensível capaz de detetar metabolitos a concentrações micromolares, equivalente a concentrações fisiológicas. Os espectros de massa surgem por três etapas: da ionização dos metabolitos, separação dos fragmentos iónicos de acordo com a sua relação massa/carga e deteção dos iões separados <sup>22,52</sup>. A espectroscopia de infravermelho é uma técnica que se baseia na deteção da vibração de átomos de uma determinada molécula. A energia do espectro de absorção corresponde à frequência da vibração da parte de uma molécula da amostra.

A técnica de espectroscopia de infravermelho mais estudada na análise do metabolitos presentes no meio de cultura embrionário é o NIR <sup>53</sup>. Estudos recentes com NIR, em que se analisou o meio de cultura de embriões ao dia 5 de desenvolvimento, conseguiram prever a taxa de implantação dos embriões (Tabela 2.4.4) <sup>54</sup>. Vergouw et al.<sup>39</sup> realizaram dois estudos clínicos em que se comparou um grupo controlo de pacientes, em que a seleção de embriões foi baseada na análise morfológica dos embriões, com um grupo de estudo de pacientes em que a seleção de embriões foi baseada em espectroscopia NIR e análise morfológica. No primeiro estudo, os autores analisaram o meio de cultura após a transferência de embriões de 333 pacientes que realizaram ciclos de FIV ou ICSI, dos quais 29 tiveram transferência ao dia 2 de desenvolvimento e 304 ao 3 de desenvolvimento. Ao dia 2 de desenvolvimento a precisão na previsão da capacidade de implantação no grupo estudo (perfil metabólico com espectroscopia NIR) foi 69% enquanto que no grupo controlo (morfologia) foi 27,6%. No dia 3

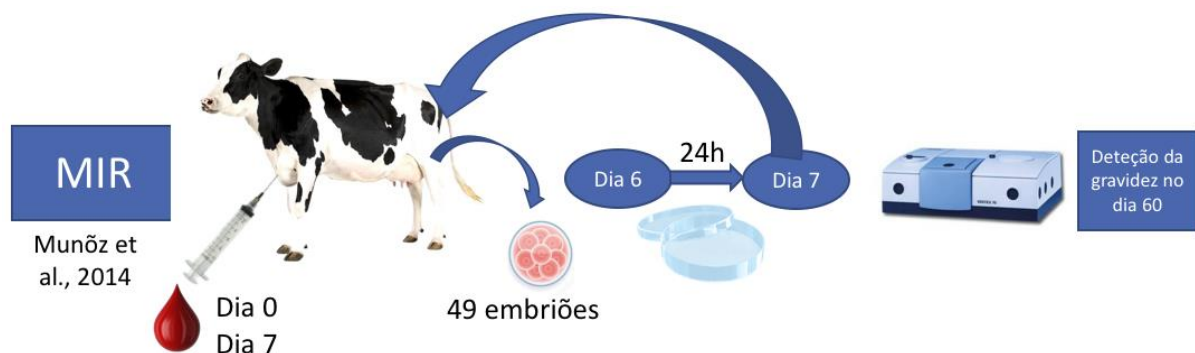
de desenvolvimento a precisão do grupo estudo foi 53,6% e no grupo controlo 38,5%<sup>53</sup>. Num estudo mais recente, compararam embriões transferidos ao dia 3 de desenvolvimento, de 163 pacientes do grupo controlo e 146 pacientes do grupo estudo. Os autores não observaram neste estudo diferenças significativas entre as gravidezes evolutivas do grupo estudo (31,5%; 46 em 146) e do grupo controlo (31,9%; 52 em 163)<sup>39</sup>. Hardardon et al.<sup>55</sup>, após uma comparação entre embriões transferidos ao dia 2 ou 5 de desenvolvimento, de 164 pacientes do grupo controlo e 163 pacientes do grupo estudo, não observaram diferenças entre os dois grupos em ambos os dias de desenvolvimento<sup>56</sup>. Contrariamente a estes autores, Ioannis A Sfontouris et al. num estudo em que incluíram 39 pacientes, em que os embriões foram avaliados de acordo com a avaliação morfológica e os espectros NIR do meio de cultura através de espectroscopia NIR (grupo estudo), e 86 pacientes em que a avaliação dos embriões foi feita apenas com a análise morfológica (grupo controlo), obtiveram melhor taxa de implantação do grupo estudo ao dia 5 de desenvolvimento (46%) em relação ao grupo controlo (28,9%), contudo foi utilizada uma amostra reduzida de pacientes<sup>57,9</sup>. Uma possível limitação dos estudos anteriores é a pré-seleção de todos os embriões consoante a qualidade, dividindo a amostra em embriões de boa e má qualidade. Como consequência, provavelmente estes autores selecionaram os pacientes com melhor prognóstico.

**Tabela 2.4.4 – Tabela resumo dos estudos realizados com NIR.**

Autores	Amostra	Dia embrionário da transferência	Estudo	Análise Morfológica	Perfil Metabólico NIR	Conclusão
<b>Vergouw et al., 2008</b>	333 pacientes	2 e 3	-Embrião selecionada com apenas análise morfológica -Correlacionaram o perfil metabólico com o potencial de desenvolvimento do embrião e capacidade de implantar	D3 - 38,5% D2- 27,6%	D3 - 53,6% D2- 69,0%	
				Grupo Controlo (Análise Morfológica)	Grupo estudo (Análise Morfológica + NIR)	
<b>Vergouw et al., 2012</b>	Grupo Controlo-163 Grupo Estudo-146	3	Gravidez	31,9%	31,5%	
<b>Ioannis Sfontouris et al., 2013</b>	Grupo Estudo-39 Grupo Controlo-86	2, 3 e 5	Gravidez	D2 - 39,2% D3 - 24,4% D5 - 28,9%	D2 - 19,0% D3 - 20,6% D5 - 46,8%	
<b>Hardardon et al., 2012</b>	Grupo Estudo-164 Grupo Controlo-165	2 e 5	Gravidez	34,8%	35,6%	

Muñoz et al.<sup>58</sup> analisaram os perfis metabólicos através de MIR do meio de cultura de 49 embriões que foram coletados ao dia 6 de desenvolvimento, em estadio de morula, de vacas superovuladas e que permaneceram em cultura individual até ao dia da transferência, do dia 7 de desenvolvimento em estadio de blastocisto (**Figura 2.4.2**). Em simultâneo analisaram o plasma das vacas ao dia 0, dia da fecundação, e ao dia 7, dia da transferência do embrião. A gravidez é detetada ao dia 60. Os espectros foram analisados quanto à

sensibilidade e especificidade de prever gravidez detetada ao dia 60. Os embriões foram cultivados em gotas de 12  $\mu\text{L}$  durante 24 horas a condições atmosféricas de 5%  $\text{CO}_2$  e 5%  $\text{O}_2$ . Para a análise de FTIR (FTIR, do inglês Fourier-transform infrared spectroscopy) foram recolhidos 10 $\mu\text{L}$  de meio e posteriormente congelados a  $-80^\circ\text{C}$ . Foram realizadas 16 análises por amostra e os espectros foram obtidos entre a região de número de onda de 600 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Os autores não conseguiram prever a gravidez ao dia 60 através da análise do meio de cultura do embrião. Contudo, através da análise do plasma das vacas ao dia 7 de desenvolvimento conseguiram aparentemente prever a implantação do embrião<sup>58</sup>.



**Figura 2.4.2** – Esquema do procedimento laboratorial do estudo realizado com MIR em bovinos<sup>58</sup>

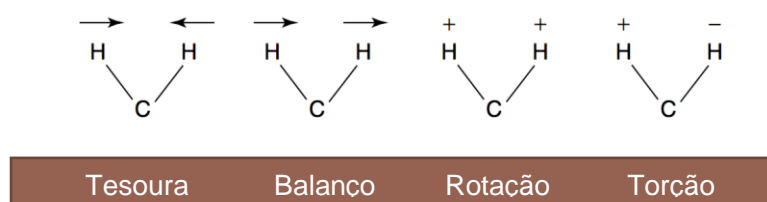
## 2.5. ESPETROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

A espectroscopia é uma das técnicas analíticas mais utilizadas em química analítica. A radiação infravermelha (IV) corresponde ao intervalo do espectro magnético entre o fim da região visível e o início da região das micro-ondas. A região do infravermelho divide-se em três regiões consoante o número de onda: região infravermelho próximo (NIR), compreendida no intervalo de número de onda de 14000 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ ; região infravermelho médio (MIR), no intervalo de número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ ; e região infravermelho longo (FIR), no intervalo de número de onda de 400 a 10  $\text{cm}^{-1}$  <sup>59,60</sup>. Este trabalho foca-se na MIR.

### 2.5.1. Vibrações moleculares

As vibrações dos átomos numa molécula podem ser de vários tipos como sejam de alongamento simétrico, alongamento assimétrico, torção, balanço, rotação ou tesoura como se pode observar alguns exemplos na **Figura 2.5.1**. A frequência de vibração é

simultaneamente determinada pela força de ligação da molécula e é normalmente constante para um determinado grupo funcional (por exemplo, O-H, -CH<sub>2</sub>, C=O, etc.)<sup>61,62,59</sup>.



**Figura 2.5.1** - Tipos de vibrações moleculares<sup>62</sup>.

## 2.5.2. Espectroscopia de Infravermelho Médio

O espectro de MIR (4000-400 cm<sup>-1</sup>) pode ser dividido em quatro regiões: A região de alongamento X-H (4000-2500 cm<sup>-1</sup>), a região de ligação tripla (2500-2000 cm<sup>-1</sup>), a região de dupla ligação (2000-1500 cm<sup>-1</sup>) e a região de impressão molecular (1500-600 cm<sup>-1</sup>)<sup>62</sup>. As vibrações que surgem na região 4000-2500 cm<sup>-1</sup> têm origem em alongamentos nas ligações O-H, C-H e N-H. O alongamento O-H corresponde ao intervalo 3700-3600 cm<sup>-1</sup>, e o alongamento N-H ao intervalo 3400-3300 cm<sup>-1</sup>. O alongamento de C-H situa-se habitualmente no intervalo 3000-2850 cm<sup>-1</sup>, contudo se estiver adjacente a uma ligação dupla ou a um anel aromático aumenta o seu comprimento de onda e pode ser encontrado no intervalo 3100-3000 cm<sup>-1</sup><sup>62</sup>. As ligações triplas devido à força das suas ligações apresentam um alongamento na região 2500-2000 cm<sup>-1</sup>, sendo a ligação C≡C característica da região 2300-2050 cm<sup>-1</sup> e a ligação C≡N entre 2300-2200 cm<sup>-1</sup>. A banda mais intensa do espectro corresponde ao alongamento da ligação C=O, na região 1830-1650 cm<sup>-1</sup><sup>62</sup>.

## 2.5.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Tradicionalmente os instrumentos dispersivos foram durante muitos anos a forma de obter espectros de infravermelho, o FTIR surge como solução no melhoramento<sup>61</sup>. A espectroscopia foi fundada no século XIX. Ao longo dos anos sofreu algum atraso na sua evolução devido a limitações computacionais. Em FTIR, o interferómetro mais utilizado ainda é o original de Michelson<sup>61 63</sup>.

Na espectroscopia de FTIR, a energia é proveniente de uma fonte de radiação de infravermelho convencional que é direcionada para um divisor de feixe. O divisor de feixe é composto por um filme fino de germânio suportado por um substrato de brometo de potássio. O divisor de feixe ideal deve refletir 50% e transmitir os outros 50%, criando assim dois

percursos óticos separados. Num dos percursos o feixe é refletido por um espelho de posição fixa e volta para o divisor, onde é parcialmente refletido para a fonte e parcialmente transmitido para o detetor. No outro caminho do interferómetro o feixe é refletido por um espelho móvel que pode mover-se para a frente e para trás, mas que é sempre mantido paralelo a si mesmo. O feixe móvel também retorna ao divisor de feixe, onde é parcialmente transmitido de volta para a fonte e parcialmente refletido para o detetor <sup>63</sup>. A radiação detetada pelo detetor resulta da interferência destes dois feixes <sup>63,61</sup>.

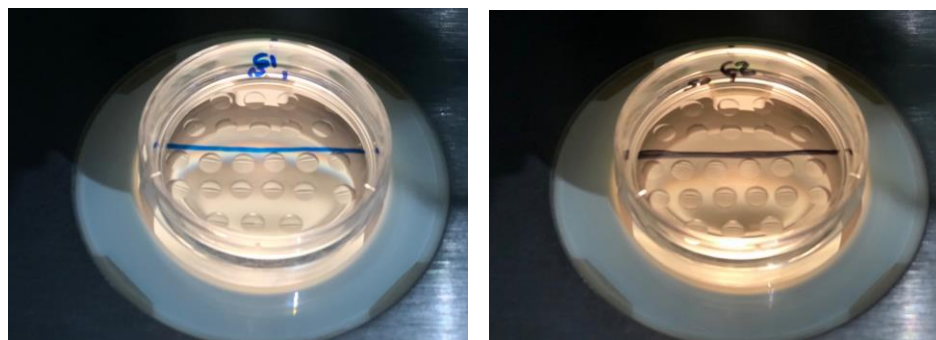
A espectroscopia de FTIR apresenta vantagens relativamente aos instrumentos dispersivos, as mais importantes são as de Fellgett e Jacquinot. A vantagem Fellgett deve-se a uma melhoria na relação sinal-ruído por unidade de tempo, ou seja, há uma diminuição do tempo necessário para a aquisição do espetro. A vantagem de Jacquinot consiste no aumento da sensibilidade do espectrómetro, através do aumento da sensibilidade dos detetores. O FTIR não requer o uso de uma fenda que restringe a saída da fonte, resultando num ganho substancial da energia emitida pelo detetor, originando consequentemente sinais mais altos e reduzindo os níveis de ruído <sup>62</sup>.

# 3. MATERIAIS E MÉTODOS

## 3.1. CULTURA EMBRIONÁRIA

Todas as culturas a seguir descritas foram efetuadas numa estufa (Labo C-Top, *Labotect, Germany*), a 37 °C, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, e 90% de humidade. O procedimento laboratorial de PMA iniciou-se no dia designado por 0, Dia 0, com a recolha dos gametas e consequente fertilização.

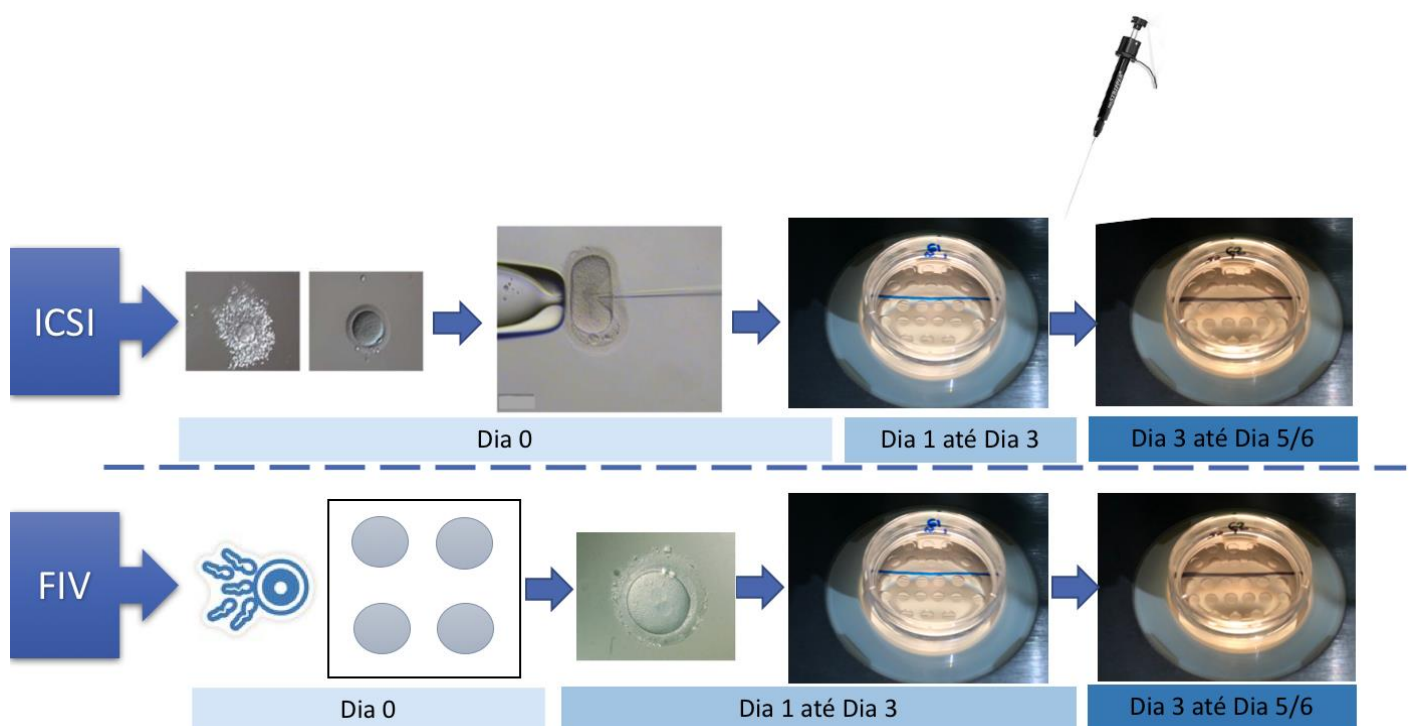
Na técnica de FIV os gametas foram colocados em contacto numa caixa de FIV de 4 poços com o meio G-IVF (*Vitrolife, Suécia*), sendo incubados na estufa durante 16-20 horas. Posteriormente, designado por Dia 1, os zigotos são decumulados por ação mecânica (com ajuda de uma pipeta Stripper, com uma ponta de calibre 135), e subseqüentemente passados para uma nova caixa de cultura embriotestada. Esta nova caixa apresenta 23 gotas de 30 µL de meio G1 PLUS (*Vitrolife, Suécia*) e são únicas para cada paciente. Estas caixas estão divididas em duas secções, como representado na **Figura 3.1.1**, separadas por uma linha horizontal, sendo que as 8 gotas acima da linha são utilizadas para lavagem e as 15 gotas abaixo da linha para a cultura em si. O zigoto decumulado é primeiro lavado, através da sua passagem por diversas gotas de lavagem, entre 3 a 4 gotas, de forma a remover o meio anterior e resuspende o embrião no novo meio. Após esta lavagem, o embrião foi colocado numa gota de cultura. Logo após a colocação do zigoto na gota de cultura, este foi observado ao microscópio ótico Nikon, Eclipse Ti-S, com uma ampliação de 200x (objetiva de 20x e ocular de 10), mantendo-se em cultura apenas os zigotos que apresentaram dois pronúcleos visíveis.



**Figura 3.1.1** – Caixas de cultura embriotestada com gotas do meio de cultura **G1 PLUS** (esquerda) e **G2 PLUS** (direita) da *Vitrolife*. A linha horizontal divide as gotas que são usadas para lavagem do embrião (gotas acima da linha) e para a cultura em si (gotas abaixo da linha).

No caso da ICSI, o espermatozóide foi tratado com fluido tubárico humano (HTF, do inglês *Human Tubal Fluid*) e os ovócitos, assim que foram obtidos pela punção foram mantidos em cultura 2 horas em G-IVF (*Vitrolife*, Suécia), subsequentemente decumulados e microinjetados numa caixa de ICSI com 3 gotas de 5  $\mu$ L de meio PVP (do inglês *Polyvinylpyrrolidone*) onde foram colocados e selecionados os espermatozóides, e 10 gotas de 5  $\mu$ L de meio G-MOPS PLUS (*Vitrolife*, Suécia), onde são colocados os ovócitos e onde é feita a microinjeção. Logo após a microinjeção, estes são transferidos para uma caixa embriotestada com gotas de lavagem e de cultura de meio G1 PLUS (*Vitrolife*, Suécia), como descrito anteriormente na FIV. Tal como anteriormente são mantidos em cultura apenas os zigotos que apresentem, passado entre 16 a 20 horas, 2 pronúcleos (**Figura 3.1.2**).

É de realçar que enquanto na FIV os zigotos são mantidos no meio G1 PLUS (*Vitrolife*, Suécia) entre o Dia 1 e Dia 3, na ICSI estes são mantidos entre o Dia 0 e Dia 3. Ao Dia 3 de cultura (os embriões de FIV e de ICSI) são transferidos para uma nova caixa com 30  $\mu$ L de gotas de meio G2 PLUS (*Vitrolife*, Suécia), onde permanecem até ao Dia 5 ou 6.



**Figura 3.1.2** – Esquema sequencial do procedimento laboratorial de ICSI e FIV.

As gotas das caixas, com meio G1 PLUS ou G2 PLUS, quando mantidas em cultura estão sempre cobertas com 9 a 12 mL de óleo mineral (SAGE, USA). A tabela 3.1.1 apresenta a composição do meio G1 PLUS e G2 PLUS da *Vitrolife*, respetivamente.

**Tabela 3.1.1 – Composição dos meios G1 PLUS e G2 PLUS da Vitrolife.**

	<b>G1 PLUS</b>	<b>G2 PLUS</b>
<i>Compostos inorgânicos</i>	Cloreto de Cálcio; Citrato de Sódio; Sulfato de Magnésio; Fosfato de Sódio; Bicarbonato de Sódio; Cloreto de Potássio; Cloreto de Sódio;	Cloreto de Cálcio; Cloreto de Potássio; Dihidrogénio de fosfato de sódio; Sulfato de Magnésio; Bicarbonato de Sódio; Cloreto de Sódio;
<i>Aminoácidos</i>	Alanina; Glutamato; Prolina; Taurina; Alanil-glatamina; Glicina; Serina; Aspargina; Metionina; Aspartato.	Aspartato; Alanina; Histidina; Leucina; Fenilalanina; Valina; Alanil-glutamina; Lisina; Serina; Treonina; Arginina; Glutamato; Prolina; Aspargina; Cistina; Glicina; Isoleucina; Metionina; Tirosina; Triptofano.
<i>Vitaminas</i>		Riboflavina; Tiamina; Pantotenato de Cálcio.
<i>Glicosaminoglicanos</i>	Hialuronano	Hialuronato
<i>Antibióticos</i>	Gentamicina	Gentamicina
<i>Agente Quelante</i>	EDTA	
<i>Outros</i>	Albumina de Soro Humano; Ácido Lípico; Lactato de Sódio; Piruvato; Glucose.	Albumina de Soro Humano; Piridoxina; Citrato de Sódio; Lactato de Sódio; Piruvato; Glucose.

No presente estudo, foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , 25 $\mu\text{L}$  dos meios de cultura G1 PLUS e G2 PLUS descartados ao dia 3 e 5/6, respetivamente, para análise de espectroscopia de FTIR.

### 3.2. CULTURA INDIVIDUAL E EM GRUPO DE EMBRIÕES

Consideraram-se embriões obtidos de FIV ou ICSI. No caso de FIV foram sempre considerados ovócitos de ciclos a fresco enquanto na ICSI os ovócitos podem ser de ciclos a fresco ou vitrificados. Os embriões foram mantidos em cultura individual ou em grupo de 2 ou de 3 embriões. Foram feitos para todas as pacientes, dois tipos de cultura embrionária, individual, em que no Dia 1, é mantido apenas 1 embrião por gota, e cultura em grupo, em que são mantidos 2 a 3 embriões por gota, de acordo com o número de embriões obtidos por mulher conforme indicado na tabela 3.2.1. A decisão quanto ao número de embriões mantidos em cultura de grupo, de 2 ou 3, foi, dentro do possível, aleatória. Assim como a escolha dos embriões que fariam parte da cultura de grupo e da cultura individual.

**Tabela 3.2.1** – Distribuição dos embriões por cultura individual ou grupo, no dia 1 de desenvolvimento, consoante o número de embriões obtidos por mulher.

Número de Embriões	Individual	Grupo
5	2	3
6	3	3
7	3	4
8	4	4
9	5	4
10	5	5
11	5	6
12	6	6
13	7	6
14	7	7
15	7	8
16	8	8
17	9	8
18	9	9
19	9	10
20	10	10
21	11	10

### **3.3 CARCATERÍSTICAS DOS CICLOS DE PROCRIAÇÃO MEDICAMENTE ASSISTIDA**

No presente trabalho foram consideradas 12 pacientes (identificadas por G1 a G12) que realizaram FIV ou ICSI, na MALOCLINIC – Ginemed. O trabalho não interferiu com o fluxo de trabalho normal dos procedimentos de PMA, nem afetou a seleção de embriões, os dados apenas foram utilizados retrospectivamente. No presente estudo, foram excluídos os pacientes com mais de 3 ciclos prévios ou com ciclos anteriores cancelados, pacientes que no dia 1 de desenvolvimento apresentavam menos de 5 zigotos, casos de fator masculino severo (asteozoospermia, globozoospermia e biopsia testicular), e pacientes com cariotipo alterado. Considerou-se um total de 123 embriões, dos quais 56 embriões foram mantidos em cultura individual e 65 em cultura de grupo, sendo que destes 39 estiveram numa densidade de 3 embriões por gota e os restantes 26 em cultura de 2 embriões por gota.

### **3.4. ANÁLISE POR ESPETROSCOPIA FTIR**

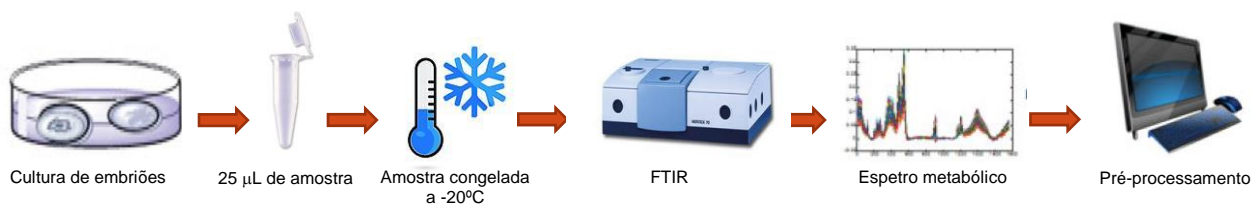
#### **3.4.1. Aquisição Espetral**

Após a descongelação das amostras à temperatura ambiente, os meios de cultura de embriões das primeiras quatro pacientes G01 a G04, foram analisados por espectroscopia sem ser diluídos. Os restantes meios de cultura foram diluídos antes de serem analisados por

espectroscopia em 1/1.33 em PBS, para tal a 15 $\mu$ L de meio de cultura adicionou-se 5 $\mu$ L de PBS. Transferiu-se 25  $\mu$ L e 20  $\mu$ L de meio de cultura não diluído e diluído, respetivamente para microplacas de 96 poços de sílcio (Si). Em todas as análises de espectroscopia FTIR, o primeiro poço da placa foi deixado sem amostra, e a sua absorvância foi usada como branco. As amostras na placa de Si foram desidratadas durante 2 horas e 30 minutos num exsiccador sob vácuo (Vacuubrand). Os espectros foram adquiridos utilizando um espectrómetro VERTEX 70 (Bruker, Alemanha) equipado com um módulo HTS-XT (Bruker, Alemanha), utilizando-se 64 varreduras no modo de transmissão, com uma resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ , entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.4.2. Pré-processamento de espectros

O pré-processamento dos espectros, como a correção da linha de base, a normalização por variação normal de padrão (SNV) e a primeira e segunda derivada, foram obtidas através do software Unscrambler® X da CAMO (**Figura 3.4.1**).



**Figura 3.4.1** – Processo de aquisição de sinal. O processo inicia-se com a recolha de 25  $\mu$ L de amostra, análise de FTIR e por ultimo o pré-processamento com o software Unscrambler X da CAMO.

### 3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Determinaram-se razões espectrais a partir do espectro com o pré-processamento de correção de linha de base e normalização. Foi avaliado se as médias das populações estudadas eram estatisticamente diferentes através do teste não paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon (**Tabela 3.3.1**).

**Tabela 3.3.1** – Razões de bandas dos espectros da cultura individual de embriões ao dia 3 e 5/6 de desenvolvimento.

<b>Dia 3 de desenvolvimento</b>	<b>Dia 5/6 de desenvolvimento</b>
<b>A725/A1116</b>	A1041/A1090
<b>A1639/A3438</b>	A1546/A1578
<b>A1654/A3300</b>	A1631/A1648
<b>A1312/A1364</b>	A2873/A2920
<b>A1658/A1573</b>	A2957/A3420
<b>A2928/A2957</b>	A1460/A2870

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. AMOSTRA BIOLÓGICA

Neste trabalho foram consideradas 12 pacientes (identificadas de G1 e G12) que realizaram um tratamento de PMA. Das 12 pacientes, 10 realizaram ciclos de ICSI, 1 paciente ciclo de FIV Clássica e 1 paciente ciclo de FIV Clássica e ICSI. Consideraram-se 123 embriões, dos quais 56 foram mantidos em cultura individual e 65 em cultura de grupo, sendo que destes 39 foram incluídas numa densidade de 3 embriões por gota e os restantes 26 em cultura de 2 embriões por gota. Os embriões foram classificados no dia 3 de desenvolvimento de A a D consoante o número de células que apresentavam, a percentagem de fragmentação celular e a simetria das células. No dia 5/6 de desenvolvimento os blastocistos foram classificados de acordo com três parâmetros, a massa celular interna e a trofoectoderme que podem ser classificadas de A a D, e o grau de expansão que pode ser entre 2 e 6. A massa celular interna foi classificada de acordo com a sua coesão e dimensão, e a trofoectoderme pela homogeneidade celular e número de células que apresenta (de acordo com o capítulo 2.4). Os embriões foram mantidos em cultura até ao dia 5 ou 6 em função do dia em que atingem blastocisto. Nesse dia, 5 ou 6, os embriões, em função da sua qualidade, foram descartados, ou se de boa qualidade foram transferidos para o útero ou vitrificados para eventuais transferências futuras. As transferências embrionárias em blastocisto foram sempre efetuadas no dia 5 de desenvolvimento. Se o embrião tiver um desenvolvimento mais lento e apenas atingir blastocisto no dia 6 de desenvolvimento é criopreservado. Após a transferência embrionária a paciente fez uma análise sanguínea duas semanas após o dia 0, para a deteção da Beta hCG, que indica a ocorrência ou não de gravidez bioquímica. Após 6 semanas foi realizada a primeira ecografia que confirma a gravidez evolutiva e o número de sacos, ou seja, o número fetos.

#### 4.1.1. Amostra Biológica da Cultura Individual

Dos 56 embriões de cultura individual (**Tabela 4.4.1**), 28 foram provenientes de ovócitos doados que foram desvitrificados, e 28 foram provenientes de ovócitos da própria, de ciclos com punção folicular a fresco. Ao dia 3 de desenvolvimento em cultura, 20 embriões apresentaram qualidade A, 11 qualidade B, 11 qualidade C e 14 qualidade D, respetivamente. Houve 5 embriões que não foram mantidos em cultura após o dia 3 (embriões 17, 18, 19, 20, e 21), por não apresentarem boa qualidade ao dia 3 de desenvolvimento e como tal, uma baixa probabilidade de chegada a blastocisto.

Dos 51 embriões que foram mantidos em cultura individual até ao dia 5/6 de desenvolvimento, 27 atingiram blastocisto. Desses 27, ao dia 3 de desenvolvimento, 22 eram de qualidade A, 4 qualidade C e 1 de qualidade D. Dos 24 embriões que não atingiram blastocisto, ao dia 3, 8 tinham qualidade A ou B, 7 qualidade C e 9 qualidade D. Estas observações indicam que a qualidade em dia 3 não prevê necessariamente a qualidade ao dia 5/6. De facto, ao dia 3 de desenvolvimento houve embriões classificados com qualidade baixa, C ou D, mas que atingiram blastocisto (embrião 3, 6, 27 e 56). Pelo contrário, houve embriões de qualidade A ou B ao dia 3, mas que não atingiram blastocisto (embrião 8, 16, 29, 30, 42, 51, 52 e 53).

Dos 56 embriões de cultura individual 11 foram transferidos ao dia 5 de desenvolvimento. Em termos de eficiência de nidificação dos embriões transferidos, apenas se considerou embriões que após transferência não ocorreu gravidez, ou que tenha ocorrido gravidez originando o número de sacos germinativos equivalente ao nº de embriões transferidos. Isto porque, quando são transferidos 2 embriões, e há gravidez de apenas 1 embrião, é impossível saber qual desenvolveu a gravidez. Em relação aos embriões de cultura individual e que foram transferidos, foram identificados 3 embriões que resultaram em gravidez e três embriões que não resultaram em gravidez. Quanto à qualidade destes embriões ao dia 5 de desenvolvimento os seis apresentavam qualidade entre A e B. Neste âmbito, e caso a capacidade de implantação dependa maioritariamente do embrião, poder-se-ia apontar para a elevada limitação da análise morfológica do embrião para prever a capacidade do mesmo em nidificar. Esta hipótese é corroborada pela gravidez da paciente G06, para a qual foram transferidos embriões de elevada qualidade morfológica (4AA), mas que não engravidou.

**Tabela 4.1.1** - Características de 56 embriões de cultura individual e provenientes de ovócitos doados (DON), ou seja doados vitrificados, e próprios (PROPRIOS) de ciclos a fresco após punção folicular de 12 mulheres (identificadas G01-G12). É indicada a respetiva qualidade dos embriões ao dia 3 e dia 5/6 de desenvolvimento e o seu destino: Descartado (D), Congelado (C) e Transferido (T) para o útero materno (T). Os embriões que apresentam (C-T) significa que foram criopreservados antes de serem transferidos. No caso dos embriões transferidos é indicado se houve ou não gravidez por análise clínica da Beta HCG. Houve embriões que atingiram blastocisto ao dia 5 de desenvolvimento (\*) e embriões que atingiram ao dia 6. Os meios de cultura das pacientes G05 a G12 foram diluídos em 1/1,33 de PBS antes da análise espectral.

Embrião	Diluição do meio	Mulher nº	FIV/ CISI	Origem dos ovócitos	Qualidad e dia 3	Qualidad e dia 5/6	Destino	Resultad o Beta HCG	Saco
1	1	G01	ICSI	DON	A	3DD*	D		
2	1	G01	ICSI	DON	A	5AA	C		
3	1	G01	ICSI	DON	C	4AA*	C		
4	1	G01	ICSI	DON	A	4BC*	C		
5	1	G01	ICSI	DON	B	5BB*	C		
6	1	G01	ICSI	DON	C	4AA*	C		
7	1	G02	ICSI	DON	B	5AA*	T	POSITIV A	Sim -2

8	1	G02	ICSI	DON	A	DEG	D		
<b>Embrião</b>	<b>Diluição do meio</b>	<b>Mulher nº</b>	<b>FIV/ CISI</b>	<b>Origem dos ovócitos</b>	<b>Qualidade e dia 3</b>	<b>Qualidade e dia 5/6</b>	<b>Destino</b>	<b>Resultado Beta HCG</b>	<b>Saco</b>
9	1	G02	ICSI	DON	A	4BA	C		
10	1	G03	ICSI	DON	A	3BB*	T	POSITIV A	Sim-1
11	1	G03	ICSI	DON	D	CEL	D		
12	1	G03	ICSI	DON	D	CEL	D		
13	1	G03	ICSI	DON	B	4AB	C-T	NEGATIV A	
14	1	G03	ICSI	DON	B	1DD	D		
15	1	G04	ICSI	PROPRI OS	B	5AA*	T	NEGATIV A	
16	1	G04	ICSI	PROPRI OS	B	DEG	D		
17	1,33	G05	ICSI	PROPRI OS	D	-	D		
18	1,33	G05	ICSI	PROPRI OS	D	-	D		
19	1,33	G05	ICSI	PROPRI OS	D	-	D		
20	1,33	G05	ICSI	PROPRI OS	A	-	C		
21	1,33	G05	ICSI	PROPRI OS	D	-	D		
22	1,33	G06	ICSI	DON	A	4AA*	C-T	POSITIV A	Sim-1
23	1,33	G06	ICSI	DON	D	CEL	D		
24	1,33	G06	ICSI	DON	A	4AA*	T	NEGATIV A	
25	1,33	G06	ICSI	DON	C	DEG	D		
26	1,33	G06	ICSI	DON	D	CEL	D		
27	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	C	5DB	D		
28	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	D	CEL	D		
29	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	A	CAVITAR	D		
30	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	A	CAVITAR	D		
31	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	B	5BC	D		
32	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	C	CEL	C		
33	1,33	G07	FIV	PROPRI OS	B	3AB*	C-T	NEGATIV A	
34	1,33	G08	MISTO-ICSI	PROPRI OS	D	DEG	D		
35	1,33	G08	MISTO-ICSI	PROPRI OS	D	CEL	D		
36	1,33	G08	MISTO-ICSI	PROPRI OS	A	5AA	C		
37	1,33	G08	MISTO-FIV	PROPRI OS	C	CEL	D		
38	1,33	G08	MISTO-FIV	PROPRI OS	C	MORULA	D		
39	1,33	G09	ICSI	DON	D	3BB*	C		
40	1,33	G09	ICSI	DON	A	5AA*	T	POSITIV A	?
41	1,33	G09	ICSI	DON	D	DEG	D		
42	1,33	G09	ICSI	DON	A	CAVITAR	D		
43	1,33	G09	ICSI	DON	A	5AA*	T	POSITIV A	?

44	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	A	5BA	C		
45	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	B	5CB	C		
46	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	C	MORULA	D		
47	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	A	4BA*	C-T	POSITIV A	Sim-1
48	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	D	DEG	D		
49	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	B	5BC	C		
50	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	C	3DD	D		
51	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	A	MORULA	D		
52	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	A	DEG	D		
53	1,33	G12	ICSI	DON	B	DEG	D		
54	1,33	G12	ICSI	DON	C	DEG	D		
55	1,33	G12	ICSI	DON	A	3BC*	T	POSITIV A	Sim-1
56	1,33	G12	ICSI	DON	C	4DD	D		

#### 4.1.2. Amostra Biológica da Cultura de Grupo

Do total de 65 embriões em cultura de grupo (**Tabela 4.4.2**), 39 foram cultivados numa densidade de 3 embriões por gota e os restantes 26 em 2 embriões por gota. Destes 65 embriões, apenas 59 permaneceram em cultura prolongada até ao dia 5/6, sendo que 26 permaneceram com uma densidade de 2 embriões por gota e 33 com uma densidade de 3 embriões por gota. Os 39 embriões em cultura de grupo (**Tabela 4.4.2**) que foram agrupados em 3 embriões por gota, ao dia 3 de desenvolvimento, 16 embriões apresentavam qualidade A, 13 embriões qualidade B, 2 embriões qualidade C e 8 embriões qualidade D. Quanto aos 33 embriões mantidos em cultura até ao dia 5/6, 11 deles não atingiram blastocisto e 22 deles atingiram blastocisto, sendo que 13 eram de qualidade A ou B e 9 de qualidade C e D. Dos 26 embriões de cultura de grupo, que foram agrupados em 2 embriões por gota, obteve-se ao dia 3 de desenvolvimento 12 embriões de qualidade A, 2 embriões de qualidade B, 11 embriões de qualidade C e 1 de qualidade D. Considerando os 26 embriões mantido em cultura até dia 5/6, 7 não atingiram blastocisto e 19 deles atingiram blastocisto, dos quais 14 de qualidade A ou B e 5 de qualidade C ou D. Se, independentemente da densidade de embriões por gota, considerarmos os embriões em grupo com qualidade A ou B no dia 3, 37 atingiram blastocisto e 12 não atingiram blastocisto. Observou-se que dos embriões em cultura de grupo que no dia 3 de desenvolvimento apresentavam qualidade C ou D, 3 deles

atingiram blastocisto ao dia 5 ou 6 de desenvolvimento, sendo que 2 deles eram de qualidade D e curiosamente 1 deles deu origem a um blastocisto 3BB que foi transferido, mas não resultou em gravidez bioquímica. Dos 39 embriões em cultura de grupo foram transferidos ao dia 5 de desenvolvimento 16 embriões.

Para relacionar a qualidade do blastocisto ou do meio de cultura com a capacidade de nidificação, e tal como na cultura individual, apenas se pode considerar as pacientes que transferiram embriões em que ou não houve gravidez, ou no caso de gravidez esta implicou o mesmo número de sacos germinativos que o número de embriões transferidos. Nestas condições teve-se 2 embriões que deram origem a gravidez com dois sacos, e 6 embriões que não deram origem a gravidez. Todos estes 8 embriões tinham qualidade A e B ao dia 5, exceto um dos embriões Beta hCG- que foi transferido na fase de cavitação. Não foi assim possível detetar uma correlação entre a qualidade dos embriões ao dia 5/6 de desenvolvimento e o seu sucesso de implantação. Por exemplo, a paciente G08 transferiu dois blastocistos de qualidade 4BB e implantaram os dois, em contrapartida a paciente G10 transferiu igualmente dois blastocistos de qualidade 4BB e nenhum deles implantou.

**Tabela 4.1.2** - Características de 65 embriões de cultura em grupo, com densidade de 3 ou 2 embriões por gota, e provenientes de ovócitos doados (DON), ou seja vitrificados, e próprios (PROPRIOS) de ciclos a fresco após punção folicular de 12 mulheres (identificadas G01-G12). É indicada a respetiva qualidade dos embriões ao dia 3 e dia 5/6 de desenvolvimento e o seu destino: Descartado (D), Congelado (C) e Transferido (T). Os embriões que apresentam C-T foram criopreservados antes de transferidos. É indicado se houve ou não gravidez por análise clínica da Beta HCG. Os meios de cultura das pacientes G05 a G12 foram diluídos em 1/1,33 em PBS antes da análise espectral.

Embrião	Diluição do meio	Mulher nº	FIV/ CISI	Origem dos ovócitos	Gota	Qualid. dia 3	Qualid. dia 5/6	Destino	Resultado Beta HCG	Saco
1	1	G01	ICSI	DON	G01 - 1	B	5AA*	T	POSITIVA-NEG	
2	1	G01	ICSI	DON	G01 - 1	B	3AA*	C-T	POSITVA	Sim-1
3	1	G01	ICSI	DON	G01 - 1	B	3BB*	C		
4	1	G01	ICSI	DON	G01 - 2	A	5AA*	T	POSITIVA-NEG	
5	1	G01	ICSI	DON	G01 - 2	B	5AA*	C-T	POSITIVA	Sim-1
6	1	G02	ICSI	DON	G02 - 1	A	5AB*	C		
7	1	G02	ICSI	DON	G02 - 1	A	3BB	C		
8	1	G02	ICSI	DON	G02 - 2	A	5AB*	T	POSITIVA	Sim-2
9	1	G02	ICSI	DON	G02 - 2	A	5BB*	C		
10	1	G03	ICSI	DON	G03 - 1	A	MORULA	D		
11	1	G03	ICSI	DON	G03 - 1	D	4DD	D		
12	1	G03	ICSI	DON	G03 - 2	A	PARADO	D		
13	1	G03	ICSI	DON	G03 - 2	A	DEG	D		
14	1	G04	ICSI	DON	G04 - 1	A	3BB	C-T	NEGATIVA	
15	1	G04	ICSI	DON	G04 - 1	A	3BB	C-T	NEGATIVA	
16	1	G04	ICSI	DON	G04 - 1	B	DEG	D		
17*	1,33	G05	ICSI	PROPRIOS	G05 -1	A	-	C-T	POSITIVA	Sim-1

<i>Embrião</i>	Diluição do meio	Mulher nº	FIV/ CISI	Origem dos ovócitos	Gota	Qualid. dia 3	Qualid. dia 5/6	Destino	Resultado Beta HCG	Saco
18*	1,33	G05	ICSI	PROPRIOS	G05 - 1	D	-	D		
19*	1,33	G05	ICSI	PROPRIOS	G05 - 1	D	-	D		
20*	1,33	G05	ICSI	PROPRIOS	G05 - 2	D	-	D		
21*	1,33	G05	ICSI	PROPRIOS	G05 - 2	B	-	C-T	POSITIVA	Sim-1
22*	1,33	G05	ICSI	PROPRIOS	G05 - 2	A	-	C		
23	1,33	G06	ICSI	DON	G06 - 1	B	5CC	C		
24	1,33	G06	ICSI	DON	G06 - 1	A	3DD	C		
25	1,33	G06	ICSI	DON	G06 - 2	C	DEG	D		
26	1,33	G06	ICSI	DON	G06 - 2	C	COMP	D		
27	1,33	G07	FIV	PROPRIOS	G07 - 1	A	3BC*	C		
28	1,33	G07	FIV	PROPRIOS	G07 - 1	A	4BB*	C-T	NEGATIVA	
29	1,33	G07	FIV	PROPRIOS	G07 - 1	B	PARADO	D		
30	1,33	G07	FIV	PROPRIOS	G07 - 3	A	MORULA	D		
31	1,33	G07	FIV	PROPRIOS	G07 - 3	A	3BC	D		
32	1,33	G07	FIV	PROPRIOS	G07 - 3	C	CAVITA R	D		
33	1,33	G08	MISTO-FIV	PROPRIOS	G08 - 1	A	3AB*	C		
34	1,33	G08	MISTO-FIV	PROPRIOS	G08 - 1	B	4BB*	C-T	POSITIVA	Sim-2
35	1,33	G08	MISTO-FIV	PROPRIOS	G08 - 2	A	4BC*	C		
36	1,33	G08	MISTO-FIV	PROPRIOS	G08 - 2	A	4BB*	C-T	POSITIVA	Sim-2
37	1,33	G09	ICSI	DON	G09 - 1	B	4BB*	C		
38	1,33	G09	ICSI	DON	G09 - 1	B	3BB*	C		
39	1,33	G09	ICSI	DON	G09 - 1	D	CEL	D		
40	1,33	G09	ICSI	DON	G09 - 1	A	5BA*	C		
41	1,33	G09	ICSI	DON	G10 - 1	D	CEL	D		
42	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 1	A	3CC	D		
43	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 1	A	3CC	C		
44	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 1	B	5CC	C		
45	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 2	B	5BC	C		
46	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 2	B	CAVITA R	D		
47	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 2	B	MORULA	D		
48	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 3	A	4BB*	C-T	NEGATIVA	
49	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 3	B	4BB*	C	NEGATIVA	
50	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 3	B	4CC	C		
51	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 4	B	5BB*	C		
52	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 4	B	4BB*	C		
53	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 5	B	MORULA	D		
54	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 5	B	5BB*	C		
55	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 6	B	MORULA	D		
56	1,33	G10	ICSI	PROPRIOS	G10 - 6	B	5DD	D		
57	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	G11 - 1	C	3AA	C-T	NEGATIVA	
58	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	G11 - 1	B	MORULA	D		
59	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	G11 - 1	A	5BB	C		
60	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	G11 - 2	A	CAVITA R	C-T	NEGATIVA	
61	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	G11 - 2	A	3BB*	C-T	POSITIVA	Sim-1
62	1,33	G11	ICSI	PROPRIOS	G11 - 2	D	MORULA	D		
63	1,33	G12	ICSI	DON	G12 - 1	D	4DD	D		
64	1,33	G12	ICSI	DON	G12 - 1	D	DEG	D		
65	1,33	G12	ICSI	DON	G12 - 1	A	4BA*	T	POSITIVA	Sim-1

### 4.1.3. Conclusão da análise convencional de cultura individual e de grupo

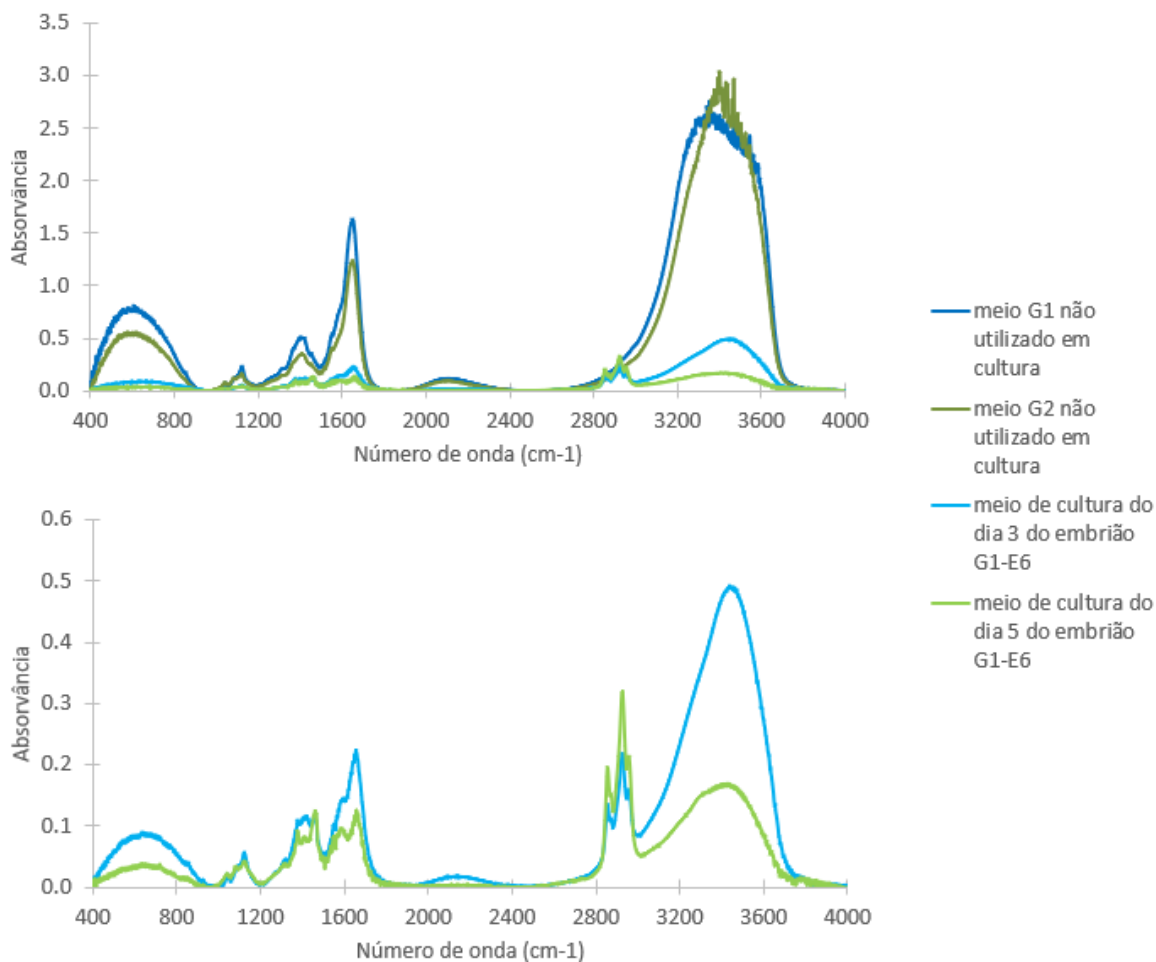
As observações anteriores indicam as elevadas limitações da avaliação do estado do potencial de implantação dos embriões com base na sua morfologia observada ao microscópio ótico e na elevada necessidade em obter métodos de análise alternativos ou complementares que permitam prever com maior precisão o estado de desenvolvimento embrionário e por consequência no dia 5/6 quais os melhores embriões a selecionar para a transferência. Neste trabalho, foram analisados os meios de cultura ao dia 3 e dia 5/6 da cultura individual (capítulo 4.2) e cultura em grupo (capítulo 4.3).

Os capítulos subsequentes apresentam análise efetuada da cultura individual (capítulo 4.2) e cultura em grupo (capítulo 4.3). Considerou-se sempre meios mantidos congelados a -20°C de forma a minimizar alterações bioquímicas dos meios de cultura entre a recolha e a análise. Efetuou-se a aquisição de espectros de meio após descongelação.

## 4.2. CULTURA INDIVIDUAL DE EMBRIÕES

### 4.2.1. Otimização do grau de diluição dos meios de cultura antes da aquisição espectral

De forma a avaliar a eventual necessidade em se diluir o meio de cultura antes da aquisição do espectro considerou-se o espectro do meio G1 PLUS e G2 PLUS que nunca foram utilizados em cultura de embriões, e que geralmente são utilizados até ao dia 3, e entre o dia 3 até ao dia 5/6 respetivamente, e o meio de cultura obtido de um dos embriões (**Figura 4.1.1**). Os espectros dos meios G1 PLUS e G2 PLUS nunca utilizados em cultura apresentam sinais de saturação espectral principalmente na região entre 3100 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  (linhas azul e verde escuro da **Figura 4.1.1**). Os meios de cultura do embrião obtidos ao dia 3 e 5/6 apresentam absorvâncias muito inferiores aos respetivos meios não utilizados em cultura, indicando um elevado consumo de nutrientes. Dado o máximo de absorvância obtido de cerca de 0.1 e 0.5 a 3400  $\text{cm}^{-1}$  para estes meios obtidos ao dia 3 e 5/6, respetivamente, e ausência de sinais de saturação do espectro conclui-se que provavelmente não haveria necessidade de diluir o meio de cultura de embriões antes da aquisição espectral. Como apenas há disponível apenas 25  $\mu\text{l}$  de meio de cultura de embrião, e tendo-se de utilizar exatamente este volume na microplaca para aquisição do espectro, a utilização deste meio sem diluir implicou apenas uma possibilidade de uma única análise espectral. Optou-se por utilizar todo este meio para a aquisição espectral e não o diluir de forma a evitar obter-se espectros com um valor de absorvância muito reduzido e por consequência uma baixa razão sinal/ruído.



**Figura 4.1.1** – Espectros de meios G1 e G2 não utilizados em culturas e de meio de cultura do embrião G1-E6 obtidos ao dia 3 e 5, respetivamente.

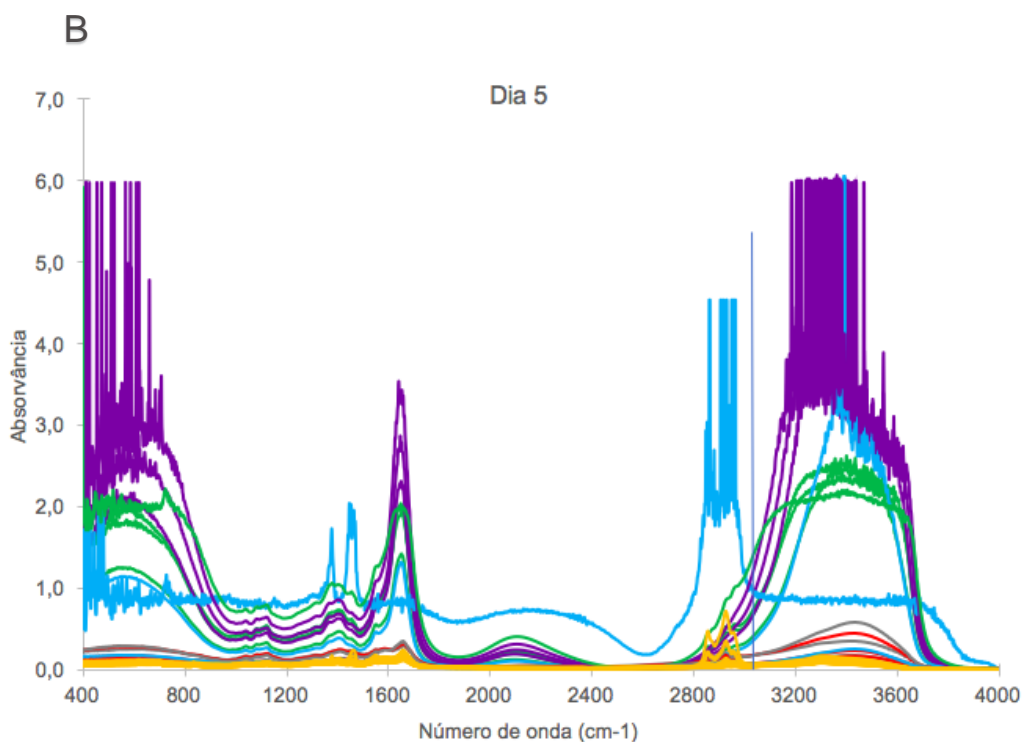
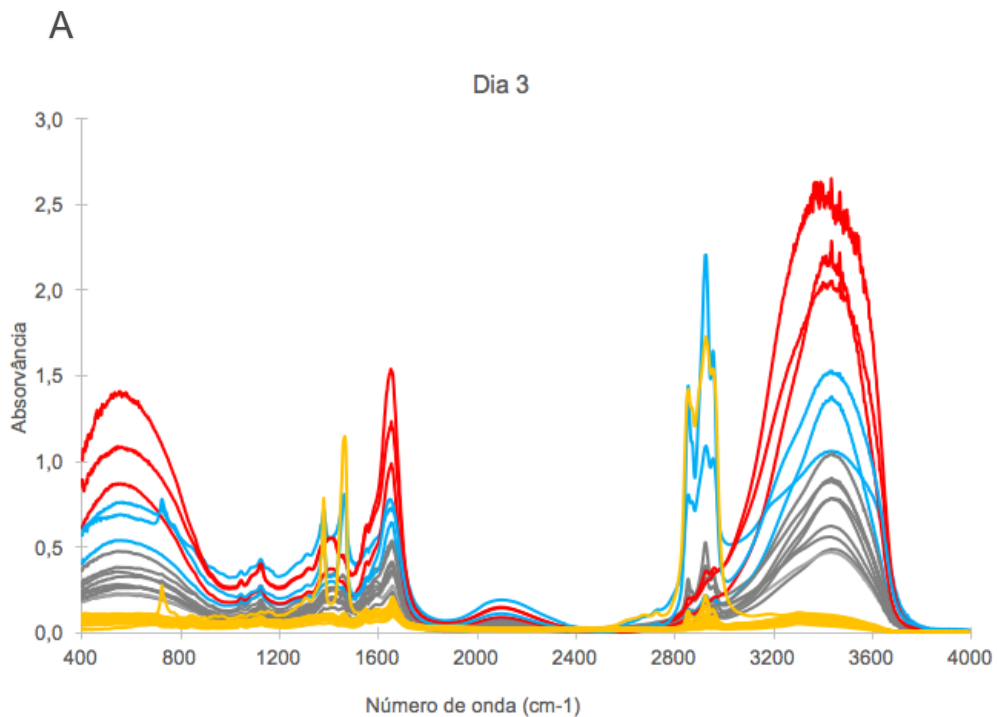
Na análise da cultura individual foram contemplados um total de 56 embriões de 12 pacientes (G1 a G12), sendo que em dia 3 de desenvolvimento se tinha 20 embriões de qualidade A, 11 de B, 11 de C e 14 de D. No dia 5/6 de desenvolvimento estudaram-se 51 embriões 12 de qualidade A, 6 de B, 6 de C e 27 de D (**Tabela 4.2.1**).

**Tabela 4.2.1-** Resumo da qualidade dos embriões em cultura individual, no dia 3 e 5/6 de desenvolvimento.

	A	B	C	D
Qualidade D3	20	11	11	14
Qualidade D5	12	6	6	27

Obteve-se espectros de meios de cultura não diluídos de embriões das pacientes G1 a G4, num total de 15 e 18 meios obtidos ao dia 3 e 5/6 de cultura, respetivamente (todos os espectros representados na **Figura 4.2.1**, com exceção dos representados a amarelo torrado). Infelizmente observou-se que 6 (correspondentes aos embriões 10,11,12,15,16 e 53

da tabela 4.1.1) dos 15 espectros da cultura do dia 3, e 11 espectros dos 18 da cultura do dia 5/6 apresentaram valores de absorvância superiores a 1.0 e saturação do sinal, em especial na região a  $3400\text{cm}^{-1}$  ou a  $2926\text{cm}^{-1}$  (espectros a vermelho e azul do dia 3 os espectros a roxo e verde e 2 dos azuis do dia 5 da **Figura 4.2.1**). Apesar da lei de Beer-Lambert não ser aplicável para filmes desidratados, mas para soluções diluídas ideais, é aceite/ observado pela maioria dos investigadores em filmes desidratados de meios de cultura microbiana ou mesmo de células animais uma proporção entre a quantidade da substância que absorve radiação MIR e a absorvância quando o pico máximo do espectro é inferior a  $10^4$ . Por consequência antes da aquisição espectral de todos os meios de cultura de embriões das mulheres de G5 a G12 efetuou-se uma diluição prévia em PBS, de 1/1,33, em que se adicionou a  $15\mu\text{L}$  de meio de cultura  $5\mu\text{L}$  de PBS, de 1/1,33 (espetros a amarelo da **Figura 4.2.1**). Nenhum dos espectros dos meios diluídos apresentou saturação, sendo que apenas 1 (correspondente ao embrião 53 da tabela 4.1.1) dos 79 meios analisados é que apresentou valores de absorvância numa das regiões do espectro superior a 1.0 (espetros a amarelo torrado da **Figura 4.2.1**).



**Figura 4.2.1-** Espectros de meios de cultura individual de embriões ao dia 3 (A) e 5/6 (B). Os espectros representados a amarelo torrado foram obtidos de meios de cultura diluídos a 1/1,33 e os restantes sem diluir o meio. Os espectros a azul e vermelho no dia 3 estão saturados ou apresentam valores de absorvância em determinadas regiões superiores a 1. Estes últimos espectros estão representados pelas mesmas cores no dia 5/6. Os restantes espectros do dia 5/6 saturados estão representados a roxo ou a verde.

#### 4.2.2. Análise do espectro normal da cultura ao dia 3 e dia 5/6, para prever a qualidade do embrião

De forma a avaliar a possibilidade de discriminação da qualidade do embrião ao dia 3 e 5/6 a partir do espectro do respetivo meio, efetuou-se a sua representação do espectro nas **Figuras 4.2.2 e 4.2.3** com uma cor de acordo com a qualidade do embrião.

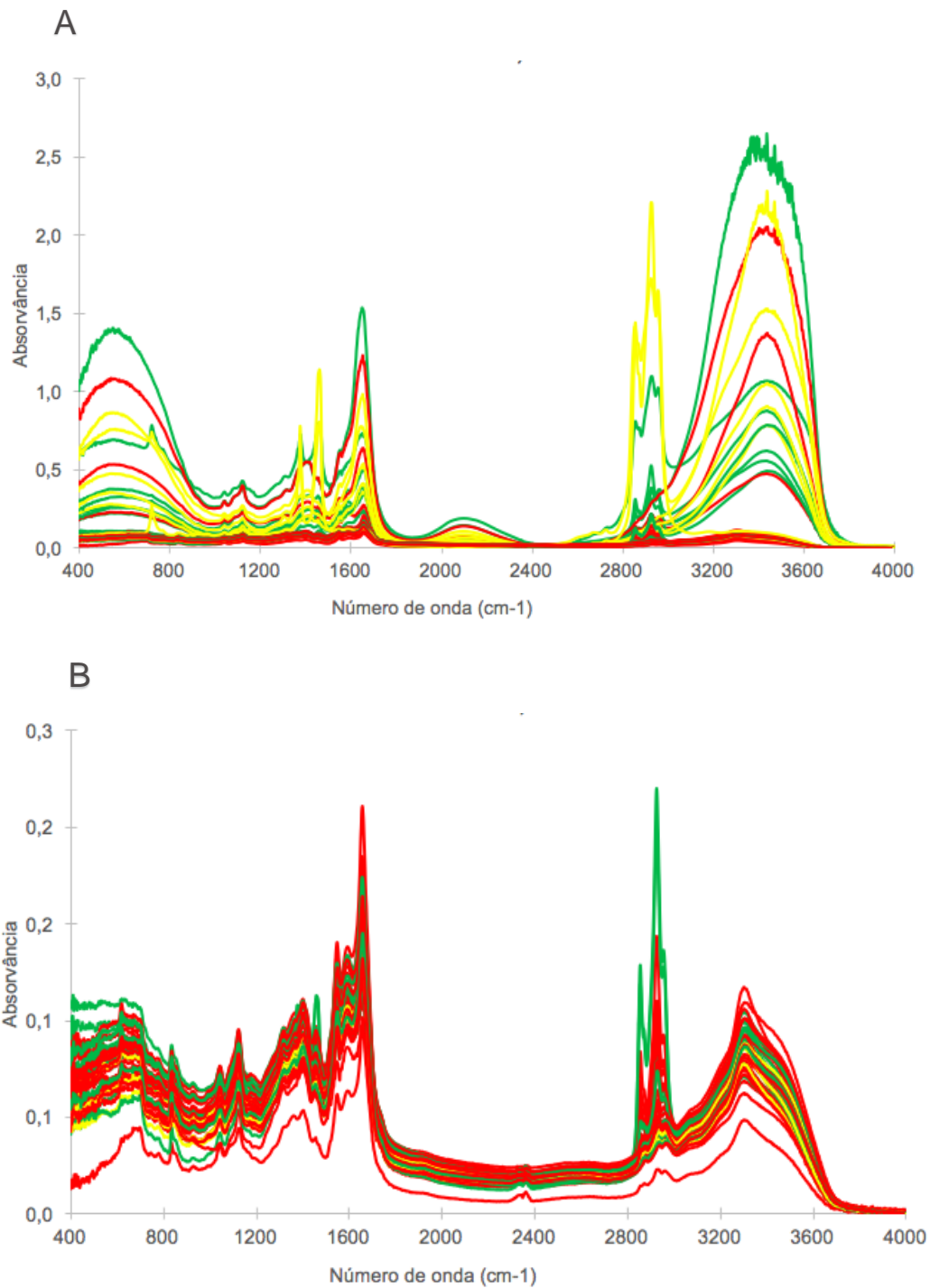
Da análise da **Figura 4.2.2** referente aos meios do dia 3 de desenvolvimento, não foi possível identificar aparentemente um padrão espectral que discrimine a qualidade do embrião. Por exemplo, diversos espectros de meios de embriões de qualidade A, B, C e D apresentam picos de absorvância na região dos lípidos entre 2850 e 2960  $\text{cm}^{-1}$ . Tendo em conta os espectros dos meios de cultura não diluídos observou-se que 3 dos 11 espectros, ao dia 3 de desenvolvimento, apresentam uma depressão entre 1378  $\text{cm}^{-1}$  e 1457  $\text{cm}^{-1}$ . Dois desses 3 espectros correspondem a embriões que no dia 3 de desenvolvimento tinham qualidade A e B porém no dia 5/6 de desenvolvimento degeneraram, o terceiro espectro pertence a um embrião que no dia 3 de desenvolvimento tinha qualidade A e no dia 5/6 deu origem a um blastocisto de qualidade 4BA. Há dois espectros que apresentam um pico a 725  $\text{cm}^{-1}$ , ambos são de embriões de boa qualidade em dia 3, porém um deles atingiu blastocisto e o outro degenerou.

Analisando os espectros do dia 3 de desenvolvimento (**Figura 4.2.2**), no intervalo entre 2854  $\text{cm}^{-1}$  e 2923  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à região dos lípidos, são detetados dois picos mais elevados, com máximo de 0,22, que correspondem aos dois embriões de qualidade A que posteriormente atingiram blastocisto de qualidade A, porém estes não são os únicos embriões de qualidade A ao dia 3 de desenvolvimento. Neste mesmo número de onda observou-se que entre os valores de absorvância 0,0603 e 0,1089 concentram-se 8 dos embriões de qualidade D (vermelhos), e 2 embriões de qualidade A ao dia 3, mas que nunca atingiram blastocisto, tendo um deles parado o desenvolvimento em células e o outro iniciado o processo de cavitação porém sem sucesso. Os máximos de absorvância no número de onda de 3300  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à região das Amidas I e II, pode-se observar quatro embriões de qualidade D e dois de qualidade A, que não atingiram blastocisto. Apesar de se registarem algumas regiões do espectro com perfis moleculares aparentemente comuns de embriões com a mesma qualidade, como por exemplo, ao dia 3 na região dos lípidos para embriões com qualidade D apresentarem valores de absorvância mais elevados, na generalidade, não existem picos específicos no espectro de uma determinada qualidade do embrião.

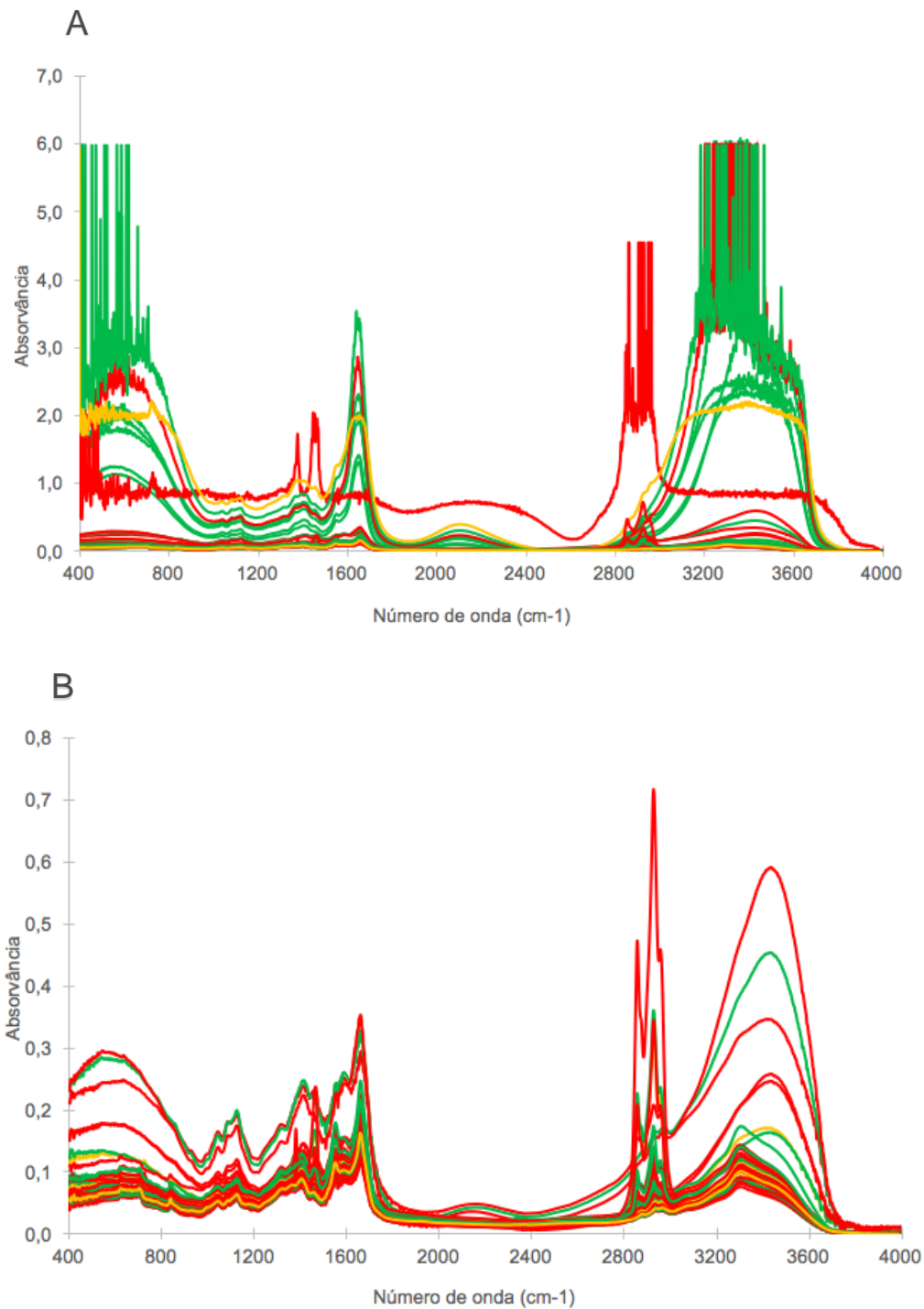
Quanto aos espectros do dia 5/6 de desenvolvimento (**Figura 4.2.3**), não foi igualmente possível identificar nenhum padrão espectral específico da qualidade do embrião. Observou-se um espectro saturado, com um pico aproximadamente no número de onda 2880  $\text{cm}^{-1}$ , este espectro corresponde a um embrião com 4 células e qualidade D no dia 3 de desenvolvimento e que parou o seu desenvolvimento até ao dia 6. Se compararmos o espectro deste embrião

em dia 5/6 com o espectro padrão dos embriões em dia 3 de desenvolvimento observamos que existem picos semelhantes nomeadamente na região dos lípidos  $2800\text{ cm}^{-1}$  e dois picos na região  $1378$  e  $1457\text{ cm}^{-1}$  com a respetiva depressão de absorvância entre eles. Uma das possíveis justificações para este espectro apresentar o padrão de dia 3 é o facto de estar parado em células no dia 5/6 de desenvolvimento, ou seja, o metabolismo do embrião corresponde ao dia 3 não 5 de desenvolvimento. Observou-se que três espectros com valores de absorvância mais elevados entre 0,2 e 0,7, na região entre  $2854$  e  $2954\text{ cm}^{-1}$ , que simultaneamente são os únicos a apresentarem uma depressão entre  $1377$  e  $1464\text{ cm}^{-1}$ . Estes três embriões pertencem à mesma paciente G11, um deles tinha qualidade A em dia 3 e deu origem a um blastocisto 4BB, e os outros dois ambos degeneraram no dia 5/6, e não deram origem a blastocisto. Porém não existe nenhuma correlação uma vez que existem mais 4 espectros de embriões desta paciente que não apresentam as mesmas características, tem um comportamento igual aos restantes embriões em dia 5/6 de desenvolvimento.

Uma vez que nos espectros de dia 3 e 5 ou 6 de desenvolvimento não foi detetada aparentemente nenhum padrão no espectro normal que indique com 100% de especificidade a qualidade do embrião, foi também analisado a 2ª derivada dos espectros, por esta aumentar a resolução de bandas espectrais.



**Figura 4.2.2** - Espectros de meios de cultura individual de embriões do dia 3 equivalentes às culturas representadas na Fig. 4.2.1 e referentes a embriões de qualidade A (linha verde), B (linha amarela) e C ou D (linha vermelha). A) Estão representados todos os espectros, saturados e não saturados. B) Apenas estão representados os espectros não saturados.



**Figura 4.2.3** - Espectros de meios de cultura individual de embriões do dia 5/6 equivalentes às culturas representadas na Fig. 4.2.2, e referentes a embriões que atingiram blastocisto de qualidade A, B e C (linha verde), D (linha a amarelo torrado), e que não atingiram blastocisto (linha vermelha). A) Estão representados todos os espetros, saturados e não saturados. B) Apenas estão representados os espetros não saturados.

#### **4.2.3. Análise da 2ª derivada do espectro do meio de cultura diluído de embriões de óvulos vitrificados versus não vitrificados**

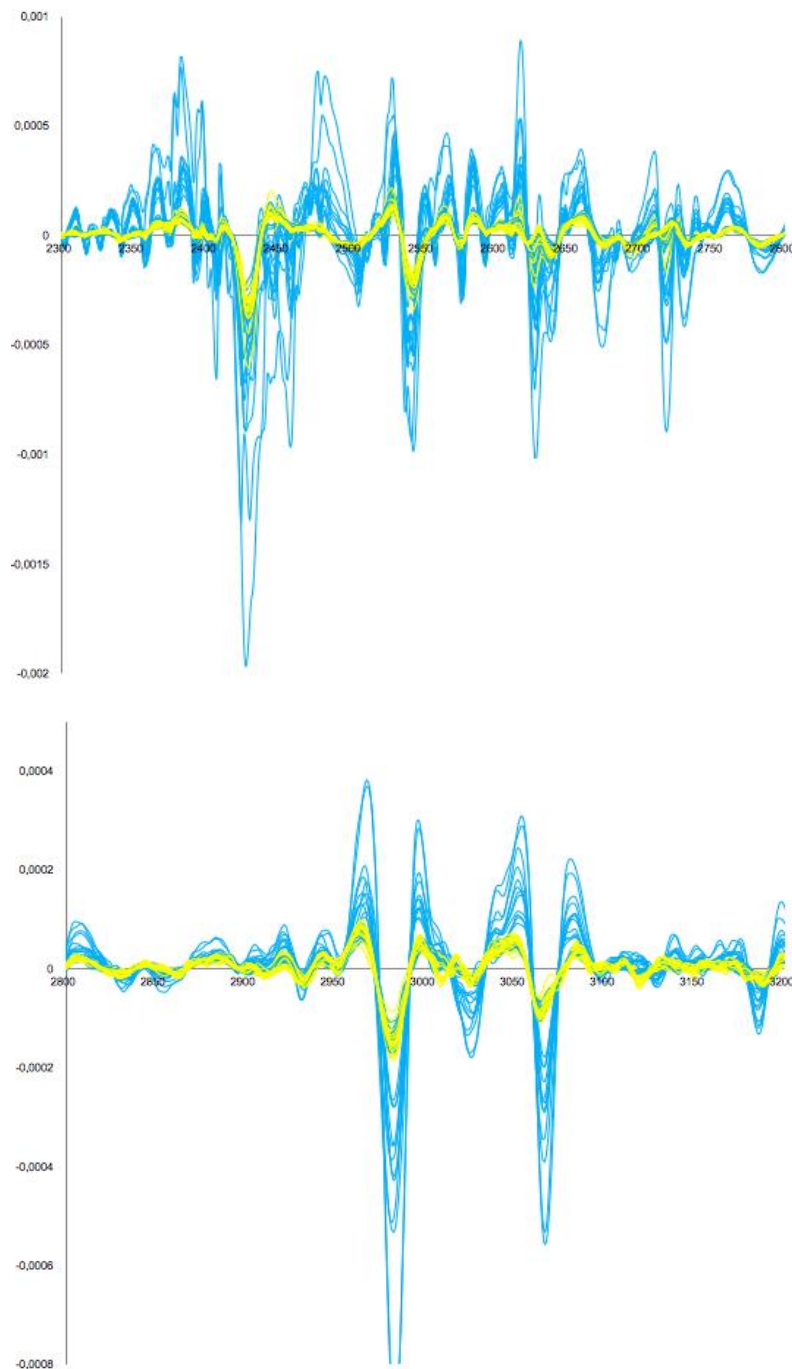
Na análise da 2ª derivada de meios de cultura de embriões em cultura individual ao dia 3, detetou-se um padrão com 100% de especificidade que discriminava os embriões obtidos de óvulos frescos (n=26) em relação a embriões de óvulos vitrificados (n= 22), sendo que os embriões de óvulos frescos apresentavam picos inferiores entre 2300 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  em relação aos obtidos de óvulos vitrificados (**Figura 4.2.4**). Esta observação está de acordo com Cynthia K Sites et al.<sup>19</sup>, que detetou diferenças na composição do meio de cultura de embriões vitrificados e de embriões fresco, nomeadamente na concentração de hCG que era superior nos embriões de óvulos vitrificados, o que aponta para a alteração no metabolismo do embrião provocada pelo processo de vitrificação. As observações do presente trabalho estão de acordo com a literatura que relata que embriões que sofreram processo de vitrificação e desvitrificação apresentam diferenças no perfil metabólico de embriões por espectroscopia NIR em, e que revelam maior potencial de implantação <sup>40,65</sup>.

#### **4.2.4. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluído, para discriminar a qualidade ao dia 3 e dia 5/6**

Comparou-se a 2ª derivada do espectro de meio de cultura diluído, ao dia 3 de desenvolvimento, de embriões obtidos de ovócitos a fresco, que incluíram 12 embriões com qualidade A e B e 8 embriões de qualidade D (**Figura 4.2.5**), não foram considerados embriões de qualidade C. Na análise da 2ª derivada de embriões em dia 5/6 de desenvolvimento foram contemplados 12 embriões. Dos quais 7 espectros de blastocistos com qualidade A,B ou C, e 5 espectros de blastocistos de qualidade D ou que não atingiram blastocisto (**Figura 4.2.5**). Tal como na análise da 2ª derivada de embriões em dia 3 de desenvolvimento, foram apenas tidos em conta os espectros de meio diluído e de embriões com origem em ovócitos a fresco.

Detetaram-se diferenças entre as 2ª derivadas de alguns espectros ao dia 3 de desenvolvimento de acordo com a sua qualidade, contudo ao dia 5/6 de desenvolvimento não observaram diferenças conclusivas. Na 2ª derivada dos espectros de meios de cultura ao dia 3 observou-se que no intervalo de 2800 e 3000  $\text{cm}^{-1}$  os espectros dos embriões de qualidade D apresentam valores de absorvância mais elevados entre 0,00025 e -0,00045, enquanto que os espectros dos embriões de qualidade A e B apresentam valores entre 0,00005 e -0,00015. Contudo existe um espectro de um embrião de qualidade A (embrião 51 da Tabela 4.1.1) que também apresenta valores de absorvância no intervalo dos espectros dos embriões

de qualidade D. Este embrião ao dia 3 de desenvolvimento apresentava qualidade A e ao dia 5/6 não atingiu blastocisto, no entanto, não foi um único embrião de qualidade A que não atingiu blastocisto. Nos números de onda  $1378\text{ cm}^{-1}$ , a  $1465\text{ cm}^{-1}$  e a  $1475\text{ cm}^{-1}$  5 dos 8 embriões de qualidade D apresentam picos distintos dos restantes espectros. Também neste intervalo o espectro do embrião de qualidade A (embrião 51 da Tabela 4.1.1) apresenta um comportamento semelhante aos espectros dos embriões de qualidade D.



**Figura 4.2.4** – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de embriões em cultura individual no dia 3 de desenvolvimento e obtidos de ovócitos vitrificados (a azul) e de ovócitos a fresco (a amarelo).

#### **4.2.5. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluídos do dia 3 e 5/6, de embriões de óvulos obtidos a fresco, para prever a qualidade do embrião**

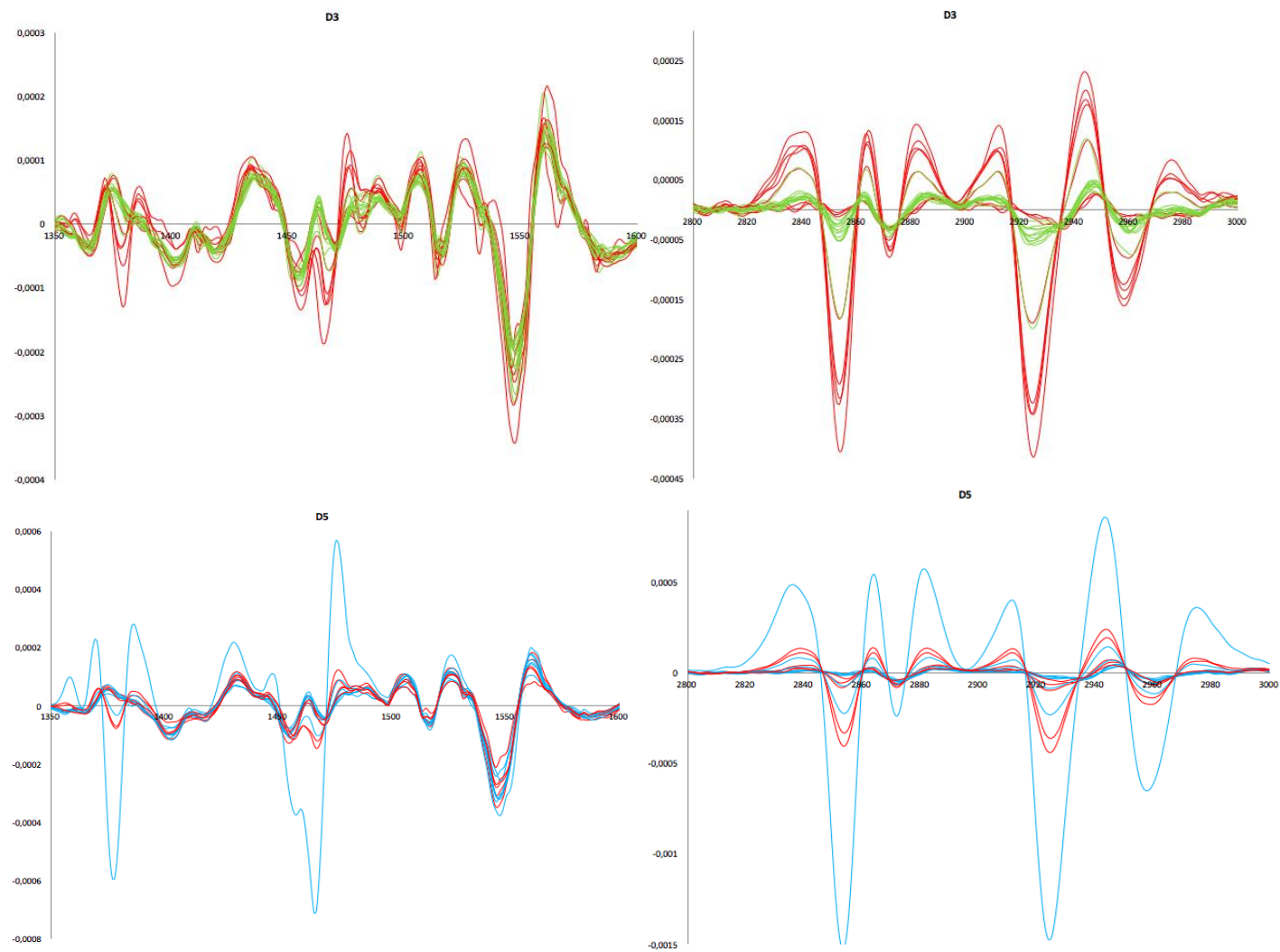
Para o dia 3, observou-se que 3 dos espectros de qualidade D formam um pico a  $1358\text{ cm}^{-1}$  mais saliente, com um máximo de absorvância  $0,00016$ , comparativamente com os restantes espectros. Observa-se também que existem duas regiões com picos que correspondem apenas aos embriões de qualidade D, nomeadamente a  $1378\text{ cm}^{-1}$  e  $1385\text{ cm}^{-1}$  com máximo de absorvância  $-0,00013$  e  $0,00006$ . Existe apenas um embrião de qualidade A que apresenta um pico nesta região, porém foi um embrião que parou o seu desenvolvimento em células e não atingiu blastocisto. Todos os outros espectros de embriões de qualidade A ou B não apresentaram este pico na 2ª derivada nesta região que é característica de fosfolípidos, ácidos gordos e triglicéridos. A 2ª derivada dos espectros de meio de embriões de qualidade A ou B a  $1464\text{ cm}^{-1}$  evidenciam picos de absorvância entre  $-0,00007$  e  $0,00019$ , enquanto que a 2ª derivada do meio de embriões com qualidade D apresentam maioritariamente entre  $-0,00018$  e  $-0,0001$ . No intervalo de  $2820$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  não existem diferenças significativas entre os picos significativas dos espectros de embriões de qualidade A e B, e espectros de embriões de qualidade D. Contudo, observa-se que os espectros de meios de embriões de qualidade A e B apresentam em valores de absorvância mais baixos, entre  $0,00005$  e  $-0,00005$ , à exceção do meio do embrião de qualidade A que parou o desenvolvimento. Os espectros do meio de embriões de qualidade D, de uma forma geral, apresentam valores de absorvância mais elevados, entre  $0,0003$  e  $-0,0004$ . Observa-se também que a  $2837\text{ cm}^{-1}$  três das 2ªs derivadas dos espectros de meios de embriões de qualidade D exibem um comportamento oposto às restantes 2ªs derivadas de espectros. Destes três embriões, dois deles correspondem à paciente em que apenas foi feita análise dos embriões em dia 3 de desenvolvimento, como tal não foi possível relacionar a diferença espectral com o desenvolvimento do embrião, e a terceira 2ª derivada do espectro corresponde a um embrião que tinha quatro células no dia 3 de desenvolvimento e não clivou nos dias seguintes.

Na análise da 2ª derivada de espectros de meios de cultura de embriões ao dia 5/6 de desenvolvimento, e ao contrário do observado ao dia 3, não foi possível identificar um padrão específico da qualidade do embrião. Por exemplo, ao longo desta região, uma das 2ª derivadas dos espectros do meio de cultura de um embrião de boa qualidade destacou-se por apresentar valores de absorvância mais elevados que os restantes, entre  $0,0006$  e  $-0,0015$ . Porém não existe uma justificação aparente, este espectro corresponde a um embrião que no dia 3 de desenvolvimento foi classificado com qualidade A e deu origem a um blasto de qualidade 4BB, não sendo o único embrião com esta características. Observou-se quatro

picos a  $1378\text{ cm}^{-1}$  inversos aos restantes, com valores de absorvância entre  $-0,00003$  e  $-0,00006$ . Dois deles correspondem a embriões com boa qualidade ao dia 3 de desenvolvimento, A e B, e que deram origem a blastos de qualidade 4BB e 5BC, os outros dois espectros apresentavam qualidade A e C ao dia 3 de desenvolvimento e ambos formaram morula no dia 5/6 de desenvolvimento, mas não chegaram a atingiram blastocisto.

#### **4.2.6. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluídos e obtidos ao dia 3 com qualidade A, de embriões de óvulos a fresco, para prever se o embrião atinge blastocisto**

Foi comparada a 2ª derivada de meios de cultura de embriões ao dia 3 de desenvolvimento, com qualidade A que atingiram blastocisto com embriões de qualidade A, ao dia 3, mas que não atingiram blastocisto. Foram tidos em consideração nesta análise 4 embriões com qualidade A no dia 3, e dois deles ao dia 5/6 pararam o desenvolvimento em Morula e a Cavitar, e os outros dois atingiram blastocistos de qualidade 5AA e 5BA (**Figura 4.2.6**). Apenas se observou a  $3117\text{ cm}^{-1}$  um pico na 2ª derivada dos espectros dos meios dos embriões que atingiram blastocisto, com um valor de absorvância de  $0,00014$ . Numa apreciação geral os espectros apresentaram aparentemente um padrão semelhante não sendo identificadas diferenças significativas. Estudos anteriores, de outros investigadores, em que se realizou a análise do meio de cultura ao dia 2 e 5 de desenvolvimento, e com amostras biológicas de maior dimensão, também não se conseguiu fazer corresponder o espectro NIR à qualidade morfológica do embrião e de prever a gravidez<sup>55</sup>.



**Figura 4.2.5** – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de embriões em cultura individual ao dia 3, de qualidade A ou B (verde) e qualidade D (vermelho), e do dia 5/6 que atingiram blastocisto com qualidade A, B ou C (azul), e que atingiram blastocisto de qualidade D ou que não atingiram blastocisto (vermelho).



**Figura 4.2.6** – Segunda derivada de espetros de meios de cultura de embriões em dia 3 de desenvolvimento com qualidade A, que ao dia 5/6 de desenvolvimento atingiram blastocisto (verde, n=2) ou que não atingiram blastocisto (vermelho, n=2).

#### 4.2.7. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura obtidos ao dia 3, para prever se o embrião transferido implanta

Dos 29 embriões totais transferidos, apenas 11 são de cultura individual, desses 11, 9 são de embriões que tiveram origem em ovócitos vitrificados e dois em ovócitos a fresco (Tabela 4.2.2). Uma vez que existem diferenças entre a 2ª derivada de embriões provenientes de ovócitos a fresco e vitrificados, apenas foram analisados os embriões com origem em ovócitos vitrificados (DON). Neste estudo considerou-se apenas os embriões que deram origem a gravidez bioquímica (Beta hCG positiva) confirmada com ecografia com o mesmo número de sacos germinais que o número de embriões transferidos.

**Tabela 4.2.2** – Características dos 29 embriões transferidos das 12 pacientes incluídas no estudo. Os embriões foram obtidos de ovócitos a fresco (FRESCO) ou doados e vitrificados (DON) e foram mantidos em cultura individual (I) ou em grupo (G). Algumas mulheres, e após uma não gravidez da primeira transferência de embriões, efetuou-se uma segunda transferência. Após a transferência o resultado de gravidez bioquímica foi ou positivo (POSITIVA) ou negativo (NEGATIVA), e foi analisado o número de sacos em ecografia (0, 1 ou 2). Para as pacientes G09, G10 e G11 não é conhecido o número de sacos

Mulher	Número do Embrião na Tabela 4.1.1 e 4.1.2	Diluição do meio	Origem dos Embriões	Tipo de Cultura	Número de Transferências	Número de embriões Transferidos	Resultado Beta hCG	Número de Sacos visíveis em ecografia
G01	1	1	DON	G	1º	2	NEGATIVA	0
	2	1	DON	G	2º	2	POSITIVA	1
	4	1	DON	G	1º	2	NEGATIVA	0
	5	1	DON	G	2º	2	POSITIVA	1
G02	8	1	DON	G	1º	2	POSITIVA	2
	7	1	DON	I	1º	2	POSITIVA	2
G03	10	1	DON	I	1º	1	POSITIVA	1
	13	1	DON	I	2º	1	NEGATIVA	0
G04	15	1	DON	I	1º	1	NEGATIVA	0
	14	1	DON	G	2º	2	NEGATIVA	0
	15	1	DON	G	2º	2	NEGATIVA	0
G05	17	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	POSITIVA	1
	21	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	POSITIVA	1
G06	22	1,33	DON	I	2º	1	POSITIVA	1
	24	1,33	DON	I	1º	1	NEGATIVA	0
G07	28	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	NEGATIVA	0
	33	1,33	PROPRIOS	I	1º	2	NEGATIVA	0
G08	34	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	POSITIVA	2
	36	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	POSITIVA	2
G09	40	1,33	DON	I	1º	2	POSITIVA	Desconhecido
	43	1,33	DON	I	1º	2	POSITIVA	Desconhecido
G10	48	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	NEGATIVA	Desconhecido
	49	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	NEGATIVA	Desconhecido
G11	57	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	NEGATIVA	Desconhecido
	60	1,33	PROPRIOS	G	1º	2	NEGATIVA	Desconhecido
	61	1,33	PROPRIOS	G	2º	2	POSITIVA	1
	47	1,33	PROPRIOS	I	2º	2	POSITIVA	1
G12	55	1,33	DON	I	1º	2	POSITIVA	1
	65	1,33	DON	G	1º	2	POSITIVA	1

Para os meios de cultura de embriões não diluídos foi comparada a 2ª derivada de 2 embriões que resultaram numa gravidez bioquímica (Beta hCG positiva) confirmada com ecografia, e 2 embriões que não resultaram numa gravidez bioquímica (Beta hCG negativa), ao dia 3 de desenvolvimento os 2 embriões eram classificados como A e B (**Figura 2.4.7**).

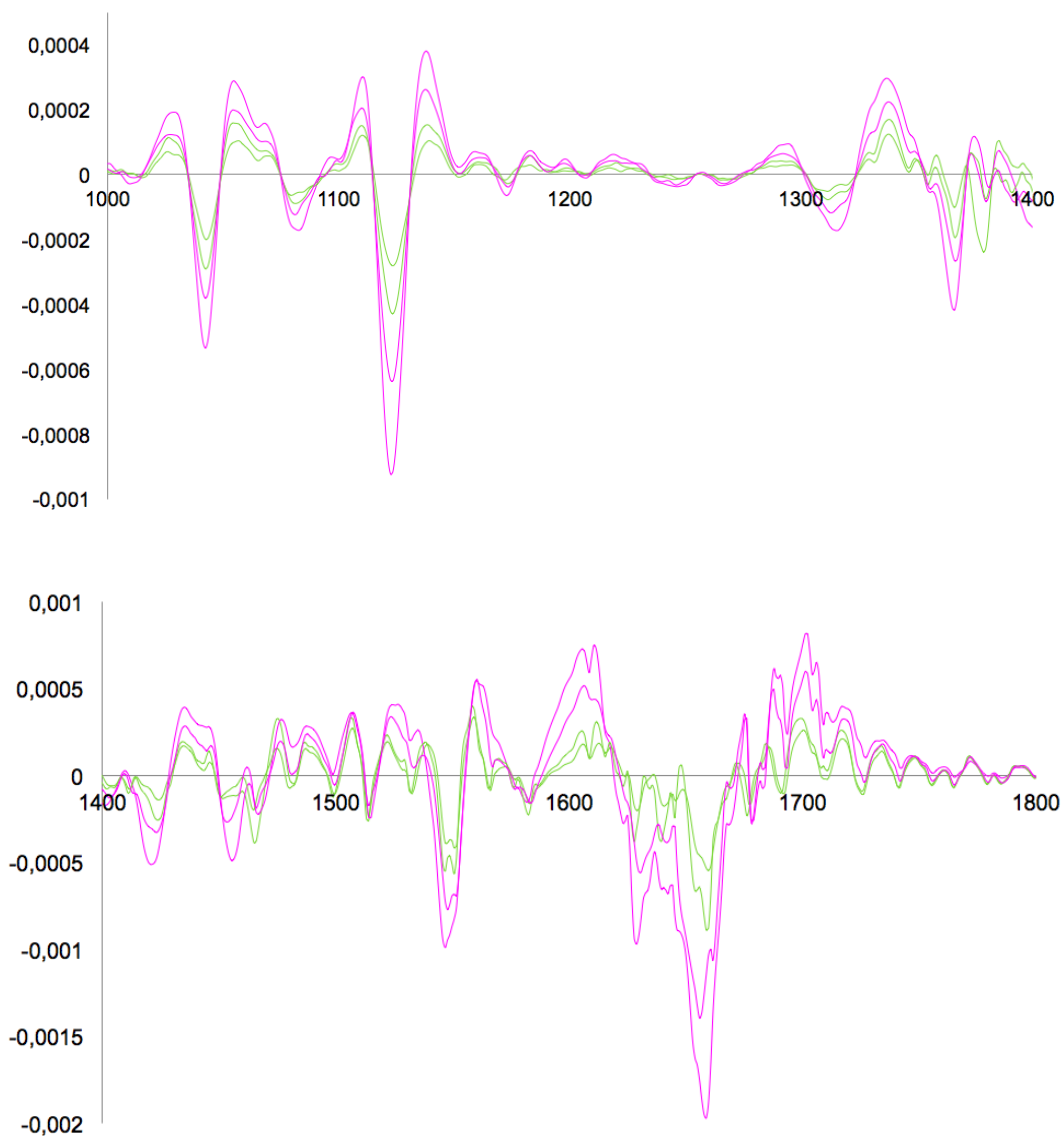
Para os meios de cultura de embriões diluídos foi comparada a 2ª derivada de 1 embrião que resultou numa gravidez bioquímica (Beta hCG positiva) confirmada com ecografia, com a 2ª derivada de 1 embrião que aparentemente não deu gravidez, ambos os embriões tinham qualidade A ao dia 3 de desenvolvimento e são da mesma paciente G06 (**Figura 2.4.8**).

Na análise da 2ª derivada de meios de cultura de embriões não diluídos, apesar das limitações do número reduzido de embriões analisados, foram observadas diferenças entre a 2ª derivada dos espectros dos 4 embriões, o que indica mais uma vez, a sensibilidade da técnica MIR na análise de meios de cultura embrionário. Observou-se que a  $1315\text{ cm}^{-1}$ , os 2 embriões Beta hCG+ apresentam um pico, com valores de absorvância entre  $-0,00003$  e  $-0,00005$ , no sentido oposto aos 2 embriões Beta hCG- que apresentam valores de absorvância entre  $-0,00009$  e  $-0,0001$ . Na mesma região, observou-se dois picos a  $1411$  e  $1414\text{ cm}^{-1}$  que correspondem aos 2 embriões Beta hCG+. Os 2 embriões Beta hCG- apresentam um pico a  $1456\text{ cm}^{-1}$ , região dos Lípidos, com valores de absorvância  $-0,0002$  e  $-0,0004$ , enquanto que os 2 embriões Beta hCG+ não apresentam aparentemente um pico nesta região. Observou-se também que apenas os embriões Beta hCG+ formam um pico a  $1578\text{ cm}^{-1}$  com valor de absorvância de  $-0,00033$ , sensivelmente na região da Amida II. Entre  $1600$  e  $1700\text{ cm}^{-1}$  observou-se um padrão característico dos embriões Beta hCG+ e Beta hCG-, com picos únicos e diferentes valores de absorvância. Por exemplo, os picos a  $1636$ ,  $1675$ ,  $1681$ ,  $1687$  e  $1689\text{ cm}^{-1}$  dos embriões Beta hCG-, e os picos a  $1624$ ,  $1643$  e  $1683\text{ cm}^{-1}$  dos embriões Beta hCG+. Apesar de se observarem diferenças entre as 2ª derivadas dos meios de cultura de embriões Beta hCG+ e Beta hCG-, observou-se picos característicos de apenas um embrião, demonstrando que cada embrião tem a sua própria identidade metabólica. Como por exemplo, o pico a  $1561\text{ cm}^{-1}$  com valor de absorvância de  $0,0005$ , correspondente ao embrião Beta hCG- da paciente G03 (**Tabela 4.2.2**), o pico  $1567\text{ cm}^{-1}$  com valor de absorvância de  $-0,00005$  do embrião Beta hCG- da paciente G04, e o pico  $1636\text{ cm}^{-1}$  do embrião Beta hCG+ da paciente G02.

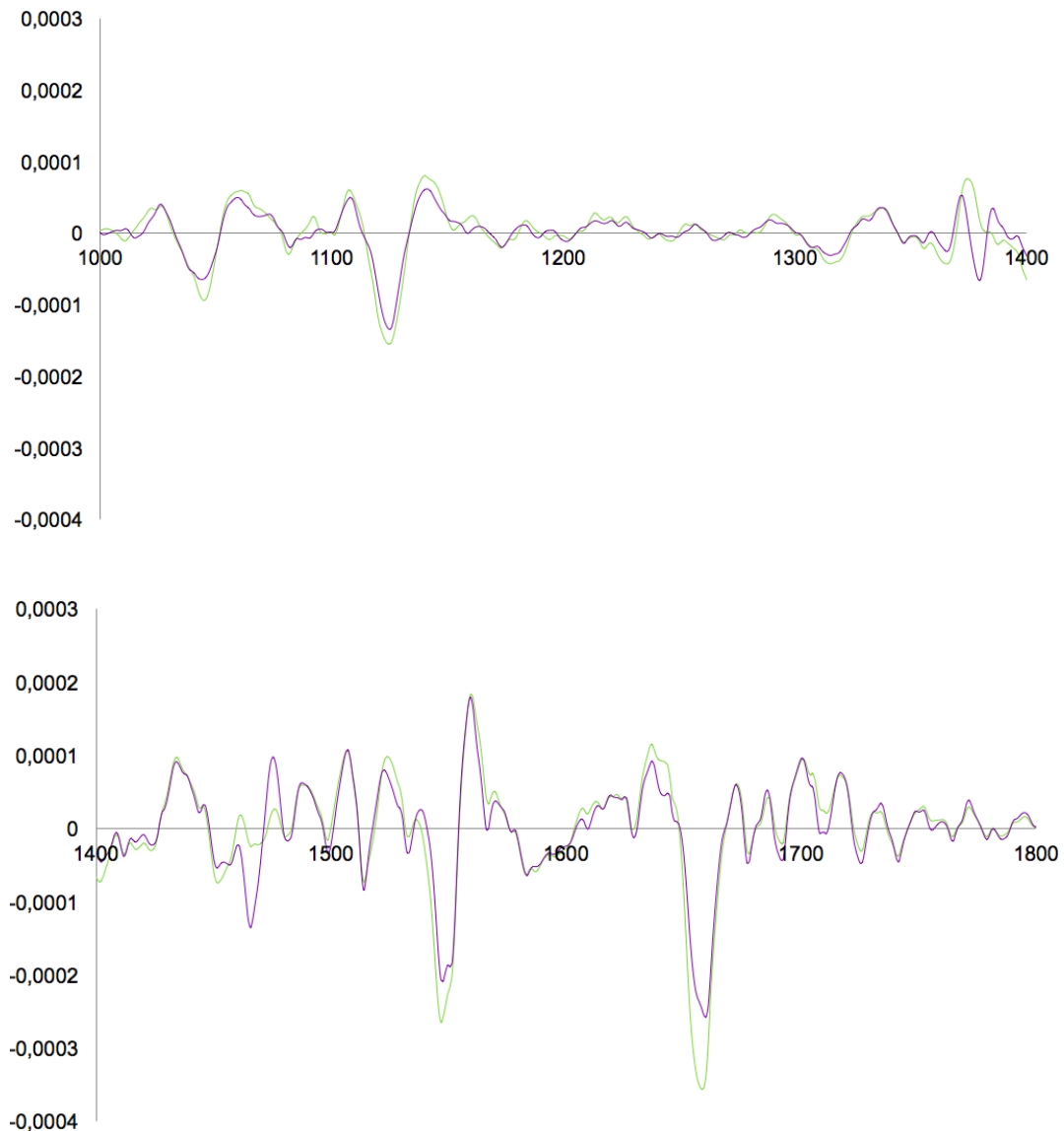
Na análise da 2ª derivada do meio cultura de embriões diluídos, observou-se diferenças entre o embrião Beta hCG- e Beta hCG+. Visualizou-se picos únicos do embrião Beta hCG+, nomeadamente a  $1024\text{ cm}^{-1}$ , região do glicogénio, com valores de absorvância de  $0,00003$ , a  $1091\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde aproximadamente à região do DNA e RNA, com valores de absorvância de  $0,00002$  e  $1153\text{ cm}^{-1}$ , região dos glícidos, com valores de

absorvância de 0,00049. Relativamente ao embrião Beta hCG- observaram-se picos únicos a  $1379\text{ cm}^{-1}$ , região dos fosfolípidos, ácidos gordos e triglicéridos, com valor de absorvância de -0,00006, a  $1396\text{ cm}^{-1}$ , região característica dos lípidos, com valor de absorvância de -0,000005, a  $1465\text{ cm}^{-1}$  com um valor de absorvância de -0,00013, e a  $1549\text{ cm}^{-1}$ , aproximadamente na região da Amida II, com valor de absorvância de -0,00018. Observam-se picos em comum entre o embrião Beta hCG+ e Beta hCG-, porém com valores de absorvância opostos. Como por exemplo, a  $1010\text{ cm}^{-1}$ , em que o embrião Beta hCG- têm um valor de absorvância de 0,000058 e o embrião Beta hCG+ -0,00001, a  $1159\text{ cm}^{-1}$  em que o embrião Beta hCG+ têm um valor de absorvância de 0,00002 e o embrião Beta hCG- -0,0000029, a  $1386\text{ cm}^{-1}$  o embrião Beta hCG+ apresenta um valor de absorvância -0,00016 e o embrião Beta hCG- -0,00005.

Tal como na análise de meios de embriões não diluídos, apesar da reduzida dimensão da amostra, observaram diferenças entre os espectros de meios de embriões que deram gravidez.



**Figura 2.4.7** – Segunda derivada de espectros de meios de cultura não diluídos de embriões ao dia 3 de desenvolvimento e que foram transferidos ao dia 5. Foram considerados dois embriões que após transferência resultaram numa gravidez bioquímica (verde, n=2) e dois embriões resultaram numa gravidez bioquímica (rosa, n=2).



**Figura 2.4.8** – Segunda derivada de espectros de meios de cultura diluídos de embriões ao dia 3 de desenvolvimento e transferidos ao dia 5. Considerou-se um embrião que não deu origem a uma gravidez bioquímica (roxo, n=1) e um embrião que deu origem a gravidez bioquímica (verde, n=1).

#### 4.2.8. Análise de razões de bandas espectrais

As seguintes razões de bandas do espectro de cultura individual ao dia 3 (**Tabela 4.2.2**), permitem discriminar a 10% de significância:

- Embriões de qualidade A,B e C de embriões de qualidade D: A725/A1116 e A1312/A1364;

- Embriões de qualidade A e B de embriões de qualidade C e D: A1639/A3438, A1654/A3300 e A1658/A1573;

Não foram identificadas razões de bandas espectrais do dia 3, que permitissem discriminar embriões que atingiram blastocisto de embriões que não atingiram blastocisto. A razão A1460/A2870 de cultura individual ao dia 5/6 (**Tabela 4.2.3**), permite discriminar a 10% de significância embriões que atingiram dos que não atingiram blastocisto.

**Tabela 4.2.3** – Valores de p de testes estatísticos de Mann-Whitney aplicados a diversas razões de bandas espectrais de meios de cultura individual do dia 3, de embriões mantidos em cultura individual.

Dia 3 de Desenvolvimento	Razões entre bandas	<i>p-value &lt;0,1</i>			
		<i>Comparação entre embriões de qualidade A e B Vs C e D</i>	<i>Comparação entre embriões de qualidade A, B e C Vs D</i>	<i>Comparação entre os embriões que atingiram blastocisto e que não atingiram blastocisto</i>	<i>Comparação entre embriões que atingiram blastocisto, com qualidade A e B Vs C e D</i>
	A725/A1116	0.1877	<b>0.0675</b>	0.9830	1
	A1639/A3438	<b>0.0849</b>	0.2203	0.3382	0.8906
	A1654/A3300	<b>0.0696</b>	0.1974	0.3714	0.8365
	A1312/A1364	<b>0.0542</b>	<b>0.0265</b>	0.4310	0.4464
	A1658/A1573	0.5013	0.7353	0.7496	0.2647
	A2928/A2957	0.8611	0.612	0.2418	0.7831

**Tabela 4.2.4** - Valores de p de testes estatísticos de Mann-Whitney aplicados a diversas razões de bandas espectrais de meios de cultura individual do dia 5/6, de embriões de cultura individual.

Dia 5/6 de Desenvolvimento	Absorvância	<i>p-value &lt;0,1</i>			
		<i>Comparação entre os embriões que atingiram blastocisto e os embriões que não atingiram</i>	<i>Comparação entre a qualidade ao dia 3, dos embriões que atingiram blastocisto</i>	<i>Comparação entre a qualidade em dia 3, A, B e C Vs D</i>	<i>Comparação entre a qualidade em dia 3, A e B Vs C e D</i>
	A1041/A1090	0.9896	0.7209	0.8695	0.6322
	A1546/A1578	0.2246	0.6451	<b>0.0808</b>	0.8462
	A1631/A1648	0.1867	0.798	<b>0.0307</b>	0.8462
	A2873/A2920	0.2246	0.1268	0.8461	0.3851
	A2957/A3420	0.9482	0.2327	0.9405	0.5779
	A1460/A2870	0.3283	<b>0.02484</b>	0.3445	0.5091

### 4.3. CULTURA DE EMBRIÕES EM GRUPO

Na análise de embriões de cultura em grupo foram tidos em conta 65 embriões em dia 3 de desenvolvimento, e 59 em dia 5/6 de desenvolvimento, de 12 pacientes (G01 a G12) que realizaram ciclos de PMA. Dos 65 embriões analisados em dia 3 de desenvolvimento, 39 embriões foram cultivados em gotas com densidade de 3 embriões por gota, e 26 embriões em gotas com densidade de 2 embriões por gota. Ao dia 5/6 de desenvolvimento apenas foram analisados 59 embriões, uma vez que a paciente G05 não teve cultura prolongada até ao dia 5/6 de desenvolvimento, porque os embriões não tinham boa qualidade ao dia 3, e como tal foram criopreservados. Na **Tabela 4.3.1** abaixo está um resumo da classificação dos embriões de cultura em grupo.

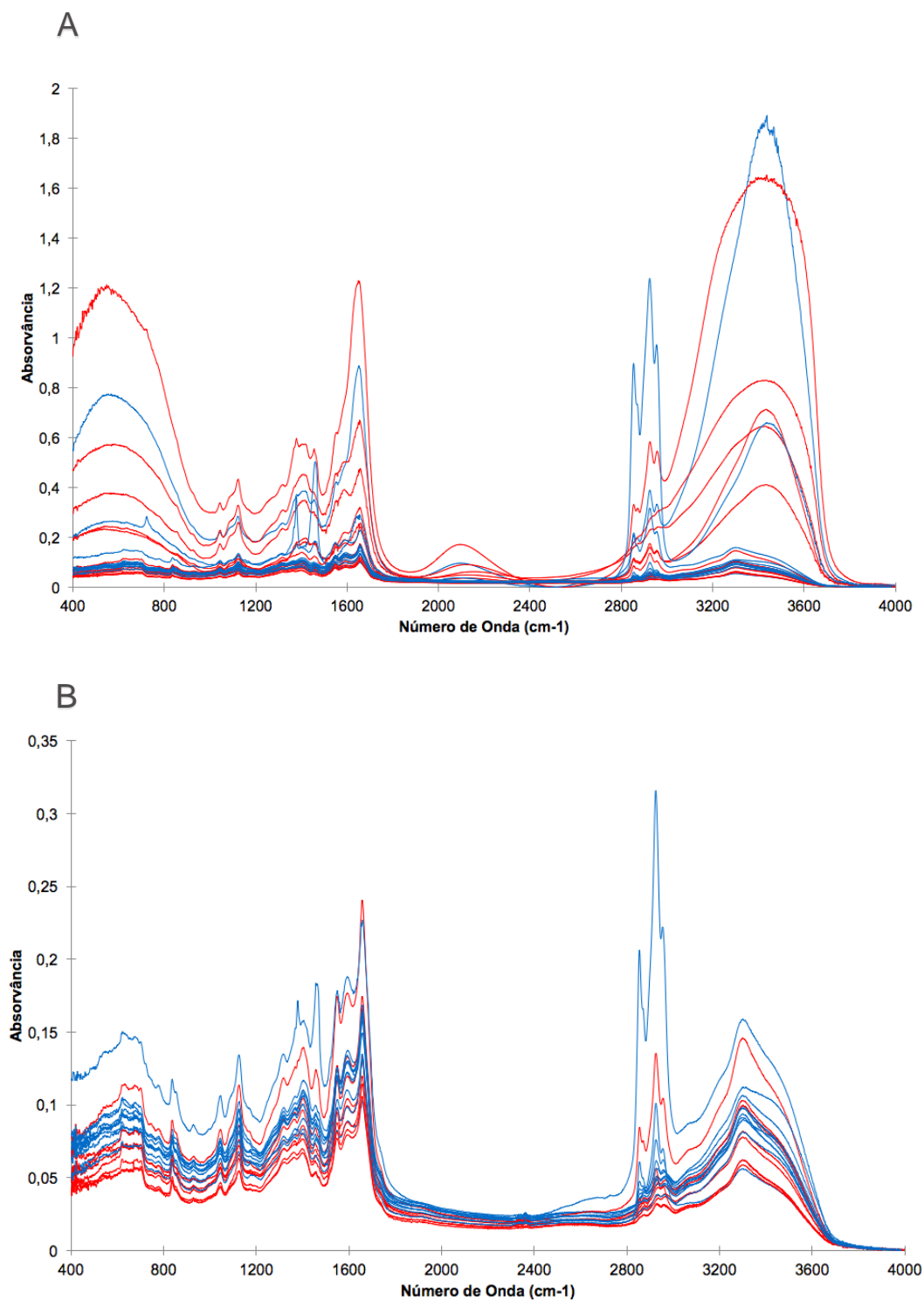
**Tabela 4.3.1** – Número de embriões e respetiva classificação de qualidade ao dia 3 e 5/6 de desenvolvimento e mantidos em culturas de grupo de 2 e 3 embriões.

Dia de Desenvolvimento	Densidade de 3 embriões por gota				Densidade de 2 embriões por gota			
	A	B	C	D	A	B	C	D
D3	16	13	2	8	12	2	11	1
D5/D6	Blastocisto		Não Blastocisto		Blastocisto		Não Blastocisto	
	A ou B	C ou D	11		A ou B	C ou D	7	
	13	9			14	5		

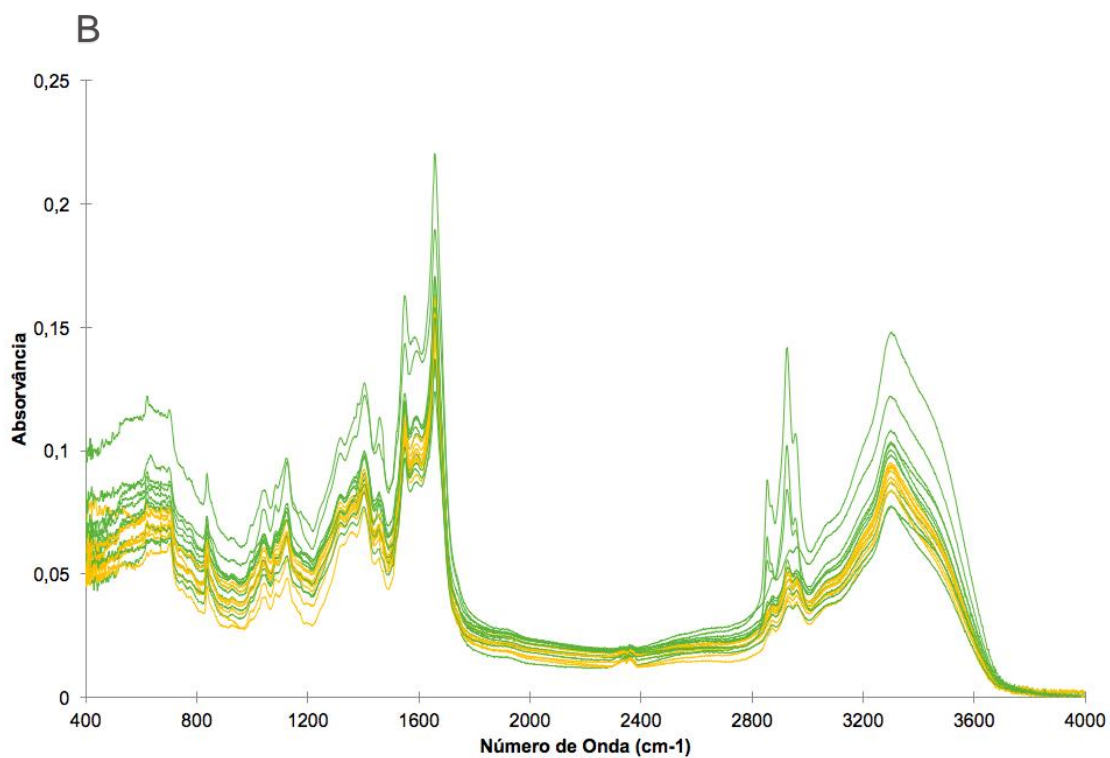
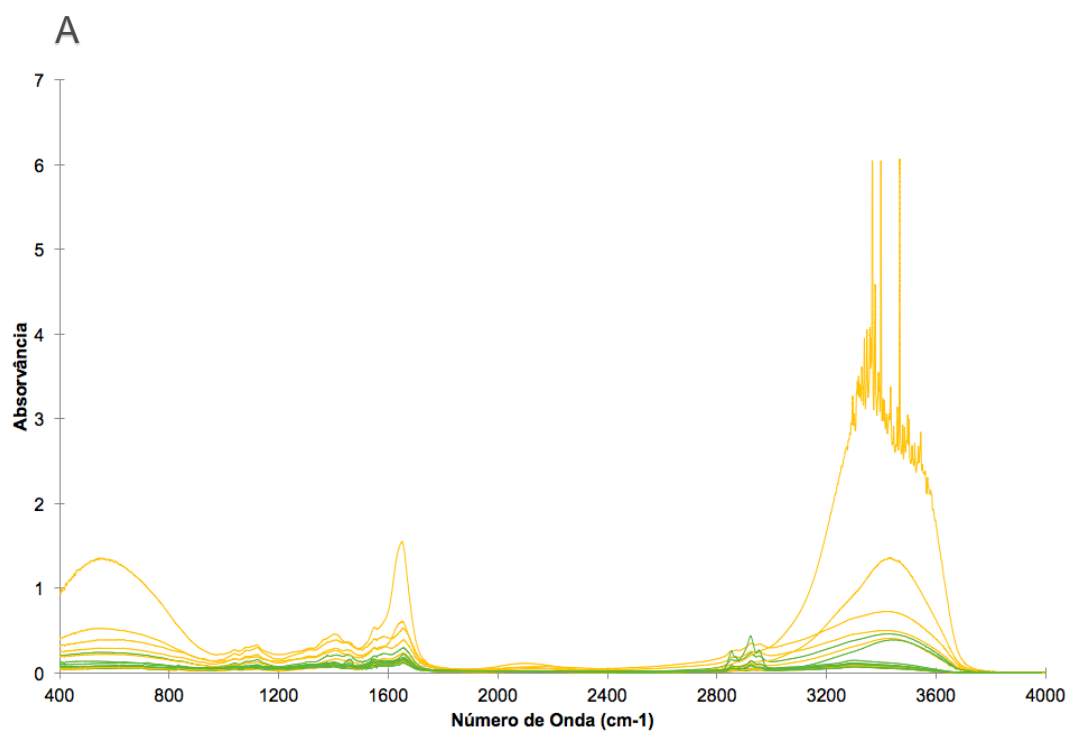
#### 4.3.1. Análise do espectro e da 2ª derivada do espectro do meio de cultura em grupo de 2 ou 3 embriões ao dia 3 e 5/6 de desenvolvimento

Obteve-se espectros de meios de cultura de grupo, diluídos a 1/1,33 e não diluídos, com densidade de 3 e 2 embriões por gota, ao dia 3 e 5/6 de desenvolvimento. Primeiramente foi feita uma análise em que se comparou os dois tipos de densidade, 2 embriões por gota e 3 embriões por gota ao dia 3 de desenvolvimento. Não foram detetadas diferenças aparentes entre os espectros dos dois tipos de densidade (Figura 4.3.1). Pelo contrário, na análise para ao dia 5/6 de desenvolvimento observou-se que entre o número de onda de 2800 e 3000  $\text{cm}^{-1}$ , região característica de lípidos, os espectros com densidade de 3 embriões por gota (espectros a verde na Figura 4.3.2) revelam valores de absorvância mais elevados do que os espectros com densidade de 2 embriões por gota (espectros a amarelo na Figura 4.3.2). Por curiosidade, apenas 1 espectro de meio de cultura não diluído do dia 5/6 com densidade de 2 embriões por gota apresentou saturação. Este espectro corresponde a uma gota de má qualidade, que continha ao dia 5/6 de desenvolvimento um embrião que não atingiu blastocisto e um embrião que atingiu blastocisto de qualidade D (embriões 10 e 11 da Tabela 4.1.2). Foi também comparada a 2ª derivada dos espectros com densidade de 2 embriões por gota

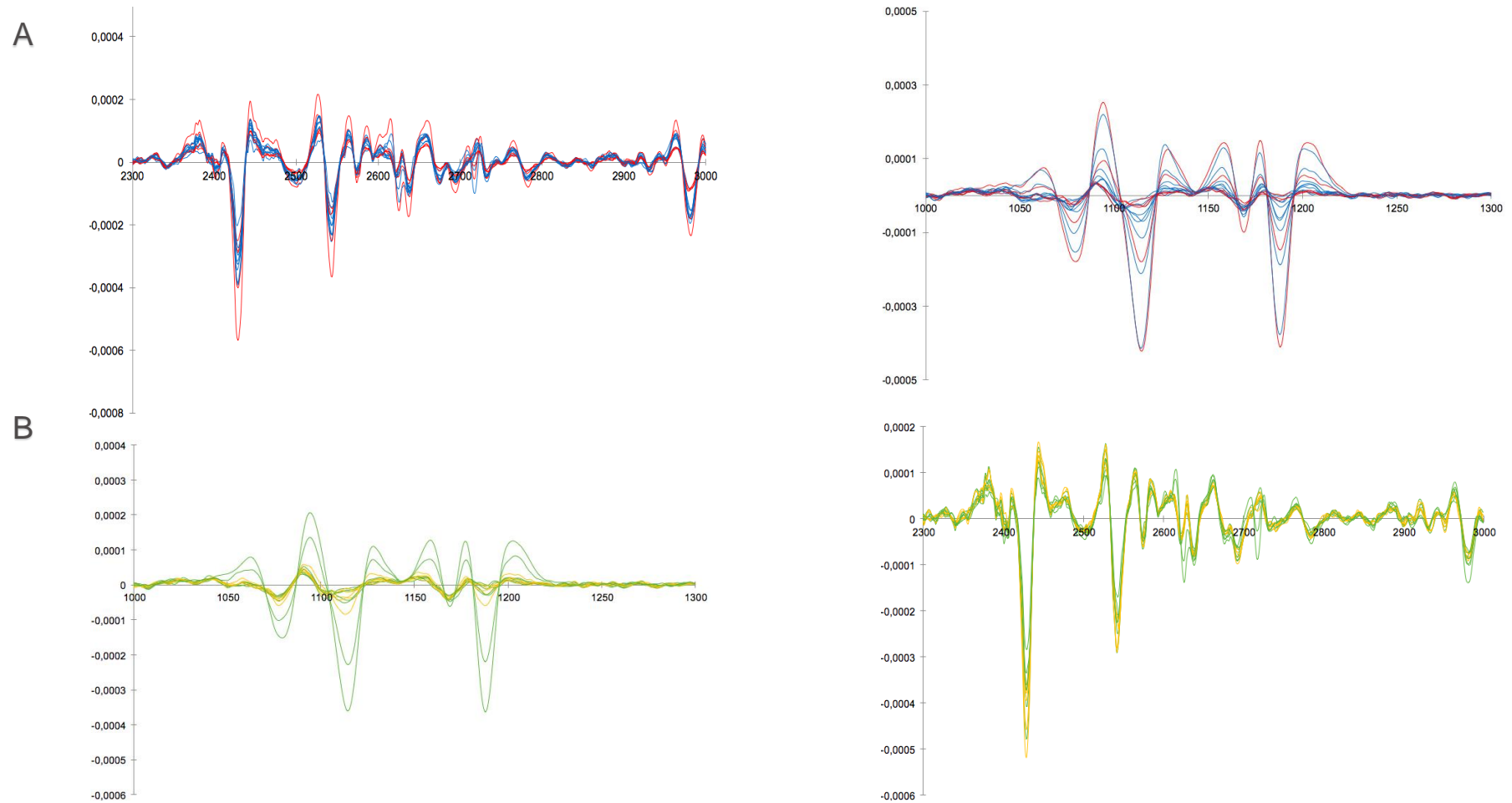
com espectros de densidade de 3 embriões por gota. Contudo, não foram observadas diferenças significativas quer ao dia 3 e quer ao dia 5/6 de desenvolvimento (Figura 4.3.3).



**Figura 4.3.1** - Espectros de meios de cultura ao dia 3, de embriões mantidos em grupos de 3 embriões por gota (azul) e 2 embriões por gota (vermelho). A) Estão representados todos os espectros, saturados e não saturados. B) Estão representados apenas os espectros não saturados.



**Figura 4.3.2** - Espectros de meios de cultura ao dia 5/6 de embriões mantidos em grupo de 3 embriões por gota (verde) e 2 embriões por gota (amarelo). A) Estão representados todos os espectros, saturados e não saturados. B) Estão representados apenas os espectros não saturados.



**Figura 4.3.3** – Análise da 2ª derivada de espetros de cultura de grupo com densidade de 3 e 2 embriões por gota. A) No dia 3 de desenvolvimento, estão representadas a gotas de cultura com densidade de 3 embriões por gota (azul) e densidade de 2 embriões por gota (vermelho). B) No dia 5/6 de desenvolvimento, estão representadas as gotas de cultura com densidade 3 embriões por gota (verde) e densidade de 2 embriões por gota (amarelo).

#### 4.3.2. Análise do espectro normal da cultura em grupo ao dia 3 e 5/6, com densidade de 3 e 2 embriões por gota de acordo com a qualidade

Considerou-se a classificação das gotas de cultura de grupos de embriões cultivados em grupo, da seguinte forma:

- No dia 3 de desenvolvimento, as gotas de cultura com densidade de 3 embriões por gota foram consideradas gotas de má qualidade quando apresentam um ou mais embriões de qualidade D ou dois ou mais embriões de qualidade C. As gotas com densidade de 2 embriões por gotas foram classificadas de má qualidade quando apresentam um ou mais embriões de qualidade D ou dois embriões de qualidade C;

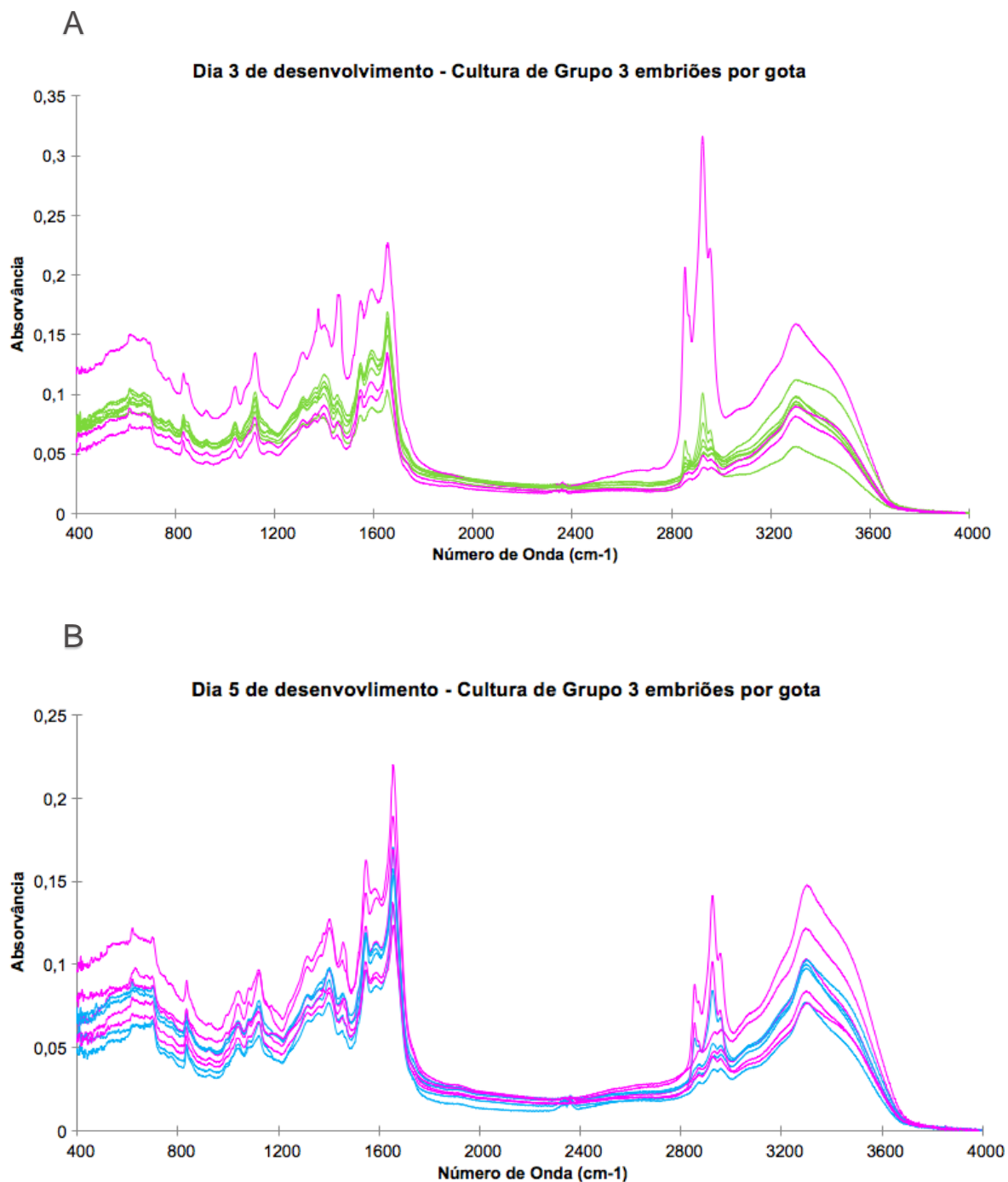
- No dia 5/6 de desenvolvimento, as gotas de cultura com densidade de 3 embriões por gota foram classificadas de má qualidade quando apresentam um ou mais embriões degenerados ou dois ou mais que não atingiram blastocisto. As gotas com densidade de 2 embriões por gota foram classificadas de má qualidade quando contêm um ou mais embriões degenerados ou um ou mais embriões que não atingiram blastocisto. Foram excluídos desta análise dos embriões da paciente G05 que não foram mantidos em cultura até ao dia 5/6 de desenvolvimento. A **Tabela 4.3.2** apresenta o resumo da qualidade dos embriões mantidos em grupos de 2 ou 3 embriões por gota.

Não foram observadas diferenças aparentes entre os espectros de meios de cultura de embriões mantidos em cultura de 3 ou 2 embriões por gota, de gotas de boa qualidade e gotas de má qualidade. Os espectros apresentavam picos nas mesmas regiões e aproximadamente com os mesmos valores de absorvância (**Figura 4.3.3 e Figura 4.3.4**). Estas observações podem dever-se ao facto de a distribuição dos embriões por grupo ter sido aleatório. Estudos anteriores em que os embriões foram agrupados ao dia 3 de desenvolvimento de acordo com a sua qualidade, melhoraram significativamente as taxas de chegada a blastocisto comparativamente com embriões distribuídos aleatoriamente <sup>34</sup>.

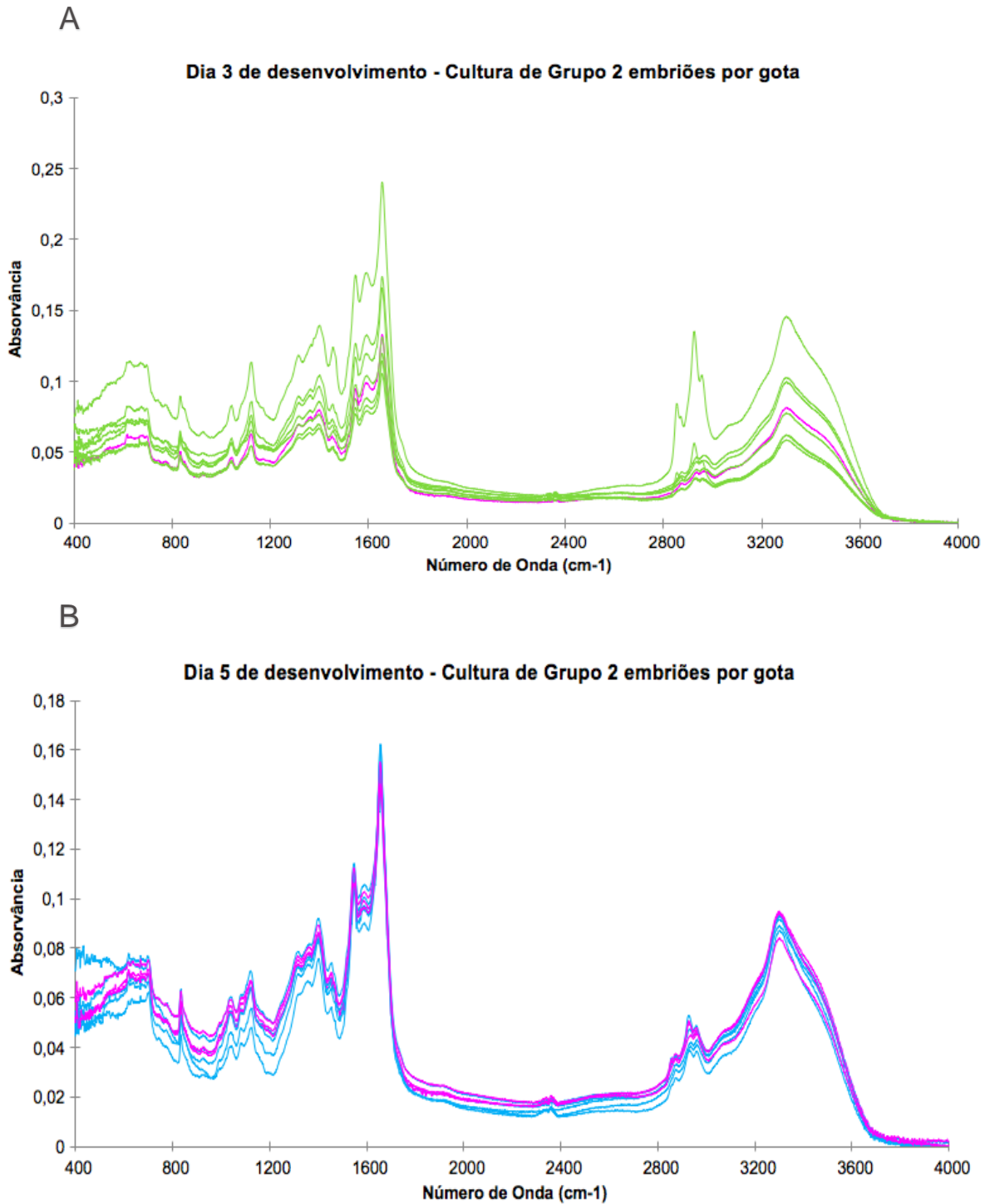
**Tabela 4.3.2** – Classificação das gotas de cultura de embriões mantidos em grupo, consoante a classificação dos embriões que nela permaneceram em cultura. No dia 3, foram classificadas a verde as gotas com boa qualidade e a rosa as gotas com má qualidade. No dia 5/6 de desenvolvimento, foram classificadas a azul as gotas com boa qualidade e a rosa as gotas com má qualidade.

Nº da Gota	Densidade 3 embriões por Gota		Densidade 2 embriões por gota	
	Classificação dia 3	Classificação dia 5/6	Classificação dia 3	Classificação dia 5/6
1	A/A/B	2DD/4BB/3BC	B/A	5CC/3DD
2	A/A/C	CAVITAR/MORULA/3BC	C/C	DEG/COMPACTAR
3	D/A/D	CELULAS/5BA/CELULAS	A/B	3AB/4BB
4	A/A/B	5CC/3CC/3CC	A/A	4BC/4BB

5	B/B/B	5BC/CAVITAR/MORULA	B/B	4BB/3BB
6	A/B/B	4BB/4BB/4CC	B/B	5BB/4BB
7	C/B/A	3AA/MORULA/5BB	B/B	MORULA/5BB
8	A/A/D	CAVITAR/3BB/MORULA	B/B	MORULA/5DD
9	D/D/A	4DD/DEG/4BA		



**Figura 4.3.4** – Espectros de meios de cultura ao dia 3 e 5/6 de embriões em grupo de 3. A) No dia 3 de desenvolvimento comparou-se embriões de boa qualidade (verde) com embriões de má qualidade (rosa) (ver tabela 4.3.2). B) No dia 5/6 de desenvolvimento comparou-se embriões de boa qualidade (azul) com embriões de má qualidade (rosa).

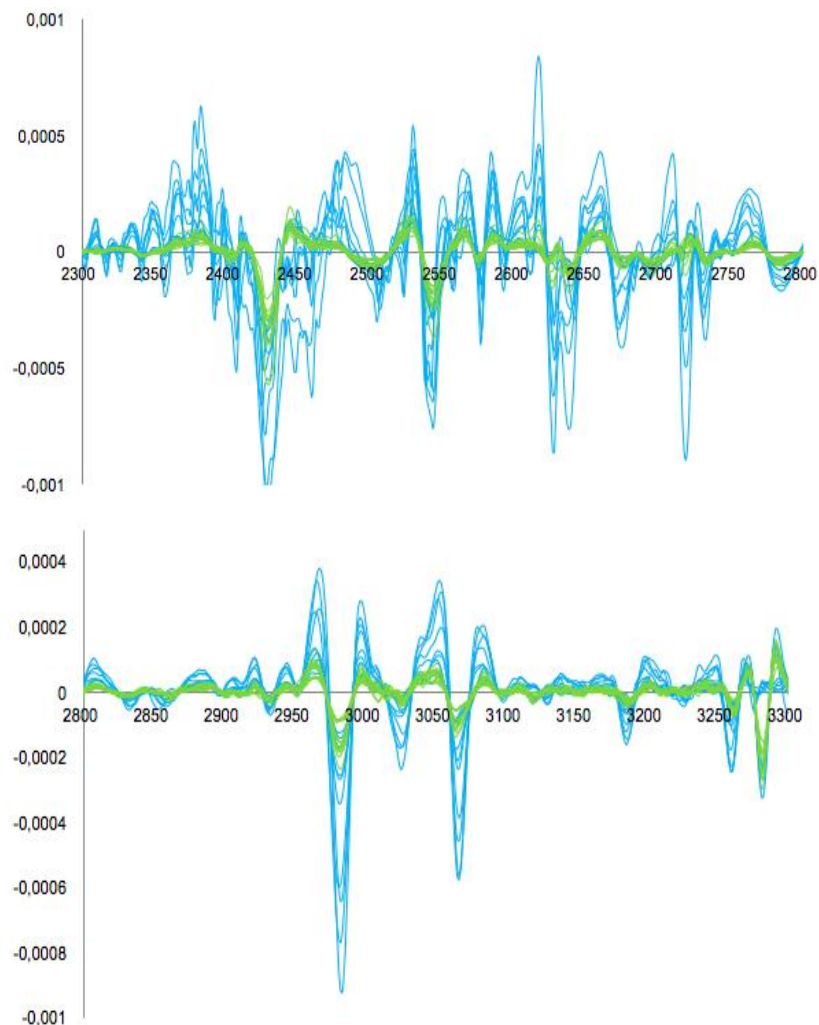


**Figura 4.3.5** – Espectros de meios de cultura ao dia 3 e 5/6 de embriões em grupo de 2. A) No dia 3 de desenvolvimento comparou-se gotas de boa qualidade (verde) com gotas de má qualidade (rosa) qualidade (ver tabela 4.3.2). B) No dia 5/6 de desenvolvimento comparou-se gotas de boa qualidade (azul) com gotas de má qualidade(rosa).

Observou-se que na cultura com densidade de 3 embriões por gota, que gotas que ao dia 3 de desenvolvimento continham embriões de qualidade D, tiveram blastocistos ao dia 5/6 de desenvolvimento, ou seja, aparentemente não afetou o desenvolvimento dos embriões “vizinhos”. Na cultura de grupo com densidade de 2 embriões, a única gota com embriões de qualidade C/C ao dia 3, não atingiram blastocisto. Todas estas comparações espelham meramente a realidade da nossa amostra.

#### **4.3.3. Análise da 2ª derivada do espectro de meio de cultura diluído de embriões obtidos de óvulos vitrificados versus não vitrificados**

Na análise da 2ª derivada não foram considerados os espectros de meios não diluídos, porque encontravam-se na sua grande maioria saturados. Foram também excluídos desta análise os espectros de meios com densidade de 2 embriões por gota ao dia 3 de desenvolvimento, uma vez que, na nossa amostra apenas temos uma gota de má qualidade (gota 2, ver **Tabela 4.3.2**). De acordo com o observado na 2ª derivadas de meios de cultura de embriões de cultura individual, observaram-se diferenças na 2ª derivada de meios de cultura entre embriões obtidos de ovócitos a fresco e ovócitos vitrificados (**Figura 4.3.4**).



**Figura 4.3.6** – Segunda derivada de espectros de meios de cultura de 3 embriões ao dia 3 de desenvolvimento. Comparou-se a segunda derivada de meios de embriões obtidos de ovócitos a fresco (verde) com embriões de ovócitos vitrificados.

#### **4.3.4. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura de grupo diluídos e obtidos ao dia 3 e 5/6, para prever a qualidade do embrião**

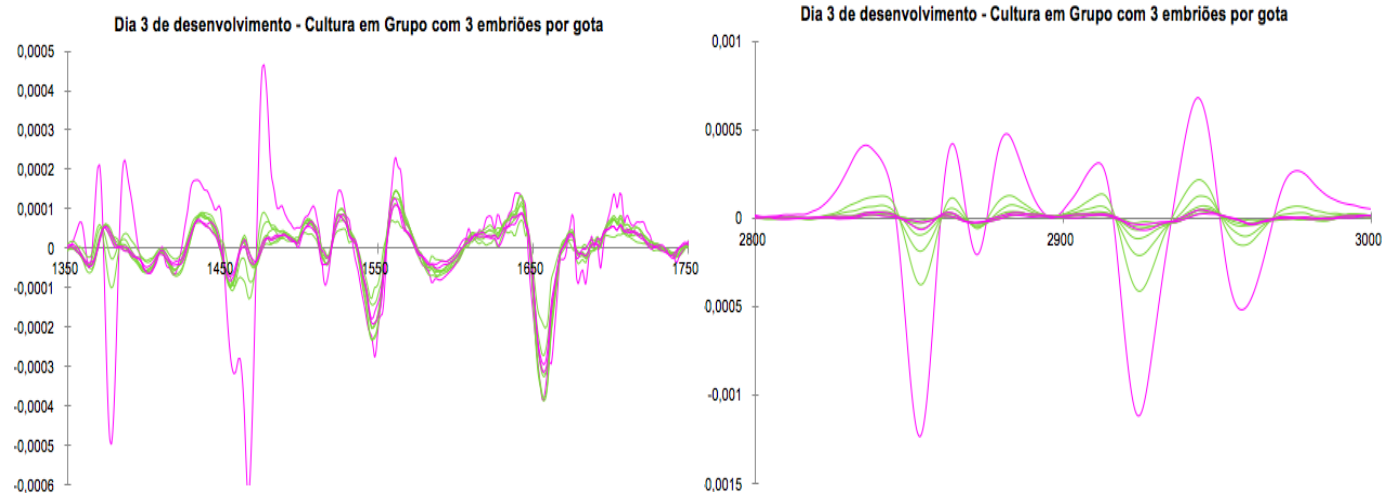
Na análise da 2ª derivada de cultura em grupo ao dia 3 de desenvolvimento, com densidade de 3 embriões por gota, observou-se que as gotas de cultura 3,4 e 5 são as únicas que apresentam um pico a  $1378\text{ cm}^{-1}$ . A gota 3 apresentava má qualidade (D/A/D) ao dia 3 de desenvolvimento, e a gota 4 e 5 boa qualidade (A/A/B e B/B/B). Ao dia 5/6 de desenvolvimento, a gota 5 tinha dois embriões que pararam o desenvolvimento e não atingiram blastocisto. A 2ª derivada da gota 3 e gota 7 ao dia 3 de desenvolvimento forma um pico a  $1621\text{ cm}^{-1}$  e a  $1627\text{ cm}^{-1}$ , sendo que a gota 3 tem má qualidade no dia 3 e 5/6 de desenvolvimento, e a gota 7 tem boa qualidade em ambos os dias de desenvolvimento, não existindo, aparentemente, nenhuma relação entre os picos e a qualidade dos embriões. Na região  $2800$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , a gota 3 exhibe

valores de absorvância mais elevados, entre -0,0004 e 0,0002, comparativamente com as outras gotas. (**Figura 4.3.5**). Examinou-se também que ao dia 5/6 de desenvolvimento, a gota 3,9 e 7, as duas primeiras de boa qualidade e a última de má qualidade, são os únicos espectros que formam um pico a  $1378\text{ cm}^{-1}$ , e que na região  $2800$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  exibem valores de absorvância superiores, entre -0,0005 e 0,0003 (**Figura 4.3.6**).

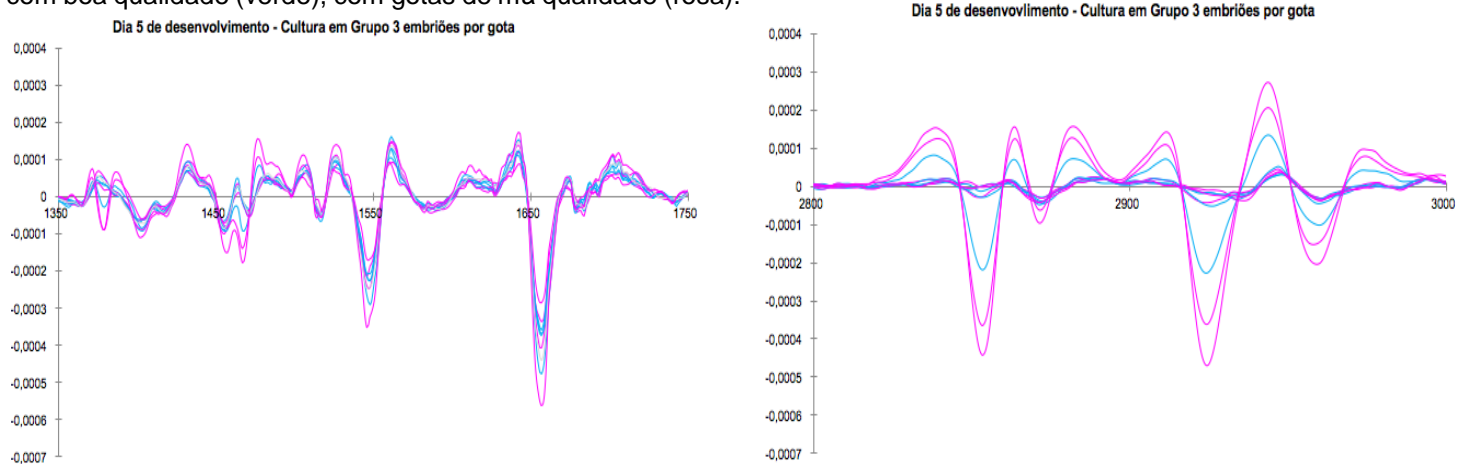
Na análise da 2ª derivada dos espectros de cultura de grupo, com densidade de 2 embriões por gota, ao dia 5/6 de desenvolvimento observou-se que a gota 1 e 2, que correspondem a embriões provenientes de ovócitos vitrificados, apresentam um comportamento semelhante entre a região  $1350$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$ , e picos distintos dos outros espectros em diversos números de onda, como por exemplo,  $1378$ ,  $1463$ ,  $1474$ ,  $1480$ ,  $1512$ ,  $1564$ ,  $1581$ ,  $1724$ , entre outros. O espectro da gota 5 apresenta um comportamento distinto dos outros espectros em algumas regiões, nomeadamente os picos a  $2851$  e  $2856\text{ cm}^{-1}$ . O espectro da gota 1 e 2 exibem um comportamento similar ao longo da região  $2800$  e  $3000\text{ cm}^{-1}$  (**Figura 4.3.7**). A  $1604\text{ cm}^{-1}$  e  $1684\text{ cm}^{-1}$  apenas 3 espectros formam pico, que correspondem a três gotas com embriões de boa qualidade ao dia 5/6 de desenvolvimento (gota3, gota 4 e gota 5), sendo o único padrão associado à qualidade dos embriões.

#### **4.3.5. Análise da 2ª derivada do espectro de meios de cultura diluídos e obtidos ao dia 3 com qualidade A, de embriões de óvulos obtidos a fresco, para prever se o embrião atinge blastocisto**

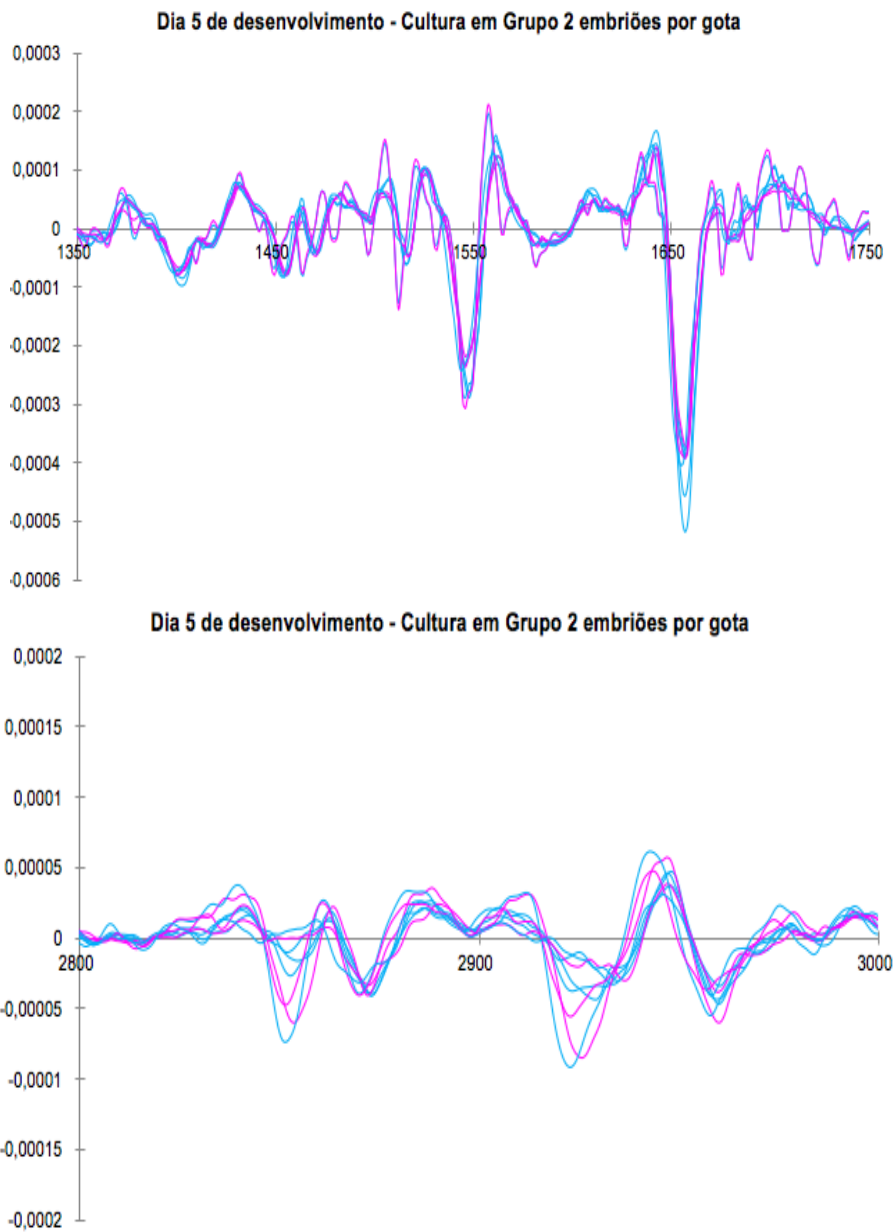
Realizou-se a 2ª derivada de gotas de cultura, com densidade de 3 embriões por gota, de meios previamente diluídos, e de embriões com origem em ovócitos a fresco. Selecionaram-se as gotas com boa qualidade ao dia 3, ou seja, que não apresentavam mais do que um embrião de qualidade D e mais do que dois de qualidade C. Comparou-se as gotas de cultura que deram origem a gotas de boa qualidade ao dia 5/6 de desenvolvimento, com as de má qualidade. Considerou-se gotas de boa qualidade as que obtiveram três blastos ao dia 5/6 independentemente da qualidade destes, todas as outras foram consideradas má qualidade ao dia 5/6. Não se observaram aparentemente diferenças entre as segundas derivadas, as gotas de embriões que atingiram blastocisto apresentam picos nas mesmas regiões e aproximadamente com os mesmos valores de absorvância que das gotas com embriões que não atingiram blastocisto, não sendo por isso detetado nenhum padrão que distinga as gotas de cultura de grupo com embriões que atingiram blastocisto (**Anexo 1**).



**Figura 4.3.7** – Segunda derivada dos espetros de cultura em grupo de embriões, com uma densidade de 3 embriões por gota, ao dia 3 desenvolvimento. Comparou-se gotas com boa qualidade (verde), com gotas de má qualidade (rosa).



**Figura 4.3.8** – Segunda derivada dos espetros de cultura em grupo de embriões, com uma densidade de 3 embriões por gota, ao dia 5/6 desenvolvimento. Comparou-se gotas de boa qualidade (azul) com gotas de má qualidade (rosa).



**Figura 4.3.9** - Segunda derivada dos espectros de cultura em grupo de embriões, com uma densidade de 2 embriões por gota, ao dia 5/6 desenvolvimento. Comparou-se gotas de boa qualidade (azul, n=4), com gotas de má qualidade (rosa, n=3).

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A avaliação da viabilidade embrionária é um componente crucial nos tratamentos de PMA, sendo o método atual de seleção embrionária mais utilizado baseado na avaliação morfológica do embrião. No entanto, este é um método pouco robusto e com uma grande margem de erro. Surge assim a necessidade de desenvolver meios complementares ou alternativos a este tipo de análise e que permitam maior capacidade de previsão da probabilidade do embrião implantar. No presente trabalho, foi avaliado uma técnica baseada em espectroscopia MIR para análise do perfil molecular dos meios de cultura onde são mantidos os embriões *in vitro* no decorrer dum processo de PMA.

A espectroscopia MIR mostrou a sua eficiência, rapidez e sensibilidade na deteção de diferenças entre os perfis moleculares do meio de cultura de embriões mantidos em cultura individual e de grupo (com densidades de 2 a 3 embriões por gota), quer ao dia 3 quer ao dia 5/6 de desenvolvimento embrionário. Esta técnica apresenta a vantagem de ser não invasiva para o embrião, uma vez que apenas utiliza o meio descartado.

Foram observados espectros, de meios de cultura de embriões de qualidade semelhante, muito diferentes entre si. Esta observação indica a elevada sensibilidade desta técnica em detetar a dinâmica metabólica entre embriões. Apesar da elevada variabilidade espectral observada, foi possível identificar regiões do espectro mais associadas a determinadas qualidades morfológicas do embrião. Por exemplo, Os espectros de meios de cultura individual, do dia 3 de embriões de qualidade A ao dia 3, e que implicaram uma gravidez bioquímica, apresentam bandas características a 2854 e a 2923  $\text{cm}^{-1}$ . Espetros de culturas de embriões com qualidade D ao dia 3 de desenvolvimento apresentam na sua maioria valores de absorvância mais elevados na região dos lípidos. Foram também identificados na 2ª derivada do espectro duas regiões a 1378  $\text{cm}^{-1}$  e 1385  $\text{cm}^{-1}$  com máximo de absorvância -0,00013 e 0,00006, características de culturas de embriões de qualidade D, e a 3117  $\text{cm}^{-1}$  com absorvância de 0,00014, dos espectros dos embriões que atingiram blastocisto.

Observou-se que as razões espectrais dos meios do dia 3, de A1639/A3438, A1654/A3300 e A1658/A1573 são estatisticamente diferentes (a uma significância de 10%), entre embriões com qualidade A e B versus C e D, e A725/A1116 e A1312/A1364 entre embriões com qualidade A,B e C versus D. Contudo, das 6 razões espectrais estudadas, nenhuma discrimina embriões que atingiram blastocisto e não atingiram blastocisto. Das razões espectralis dos meios do dia 5/6, de A1546/A1578 e A1631/A1648 são estatisticamente diferentes (a uma significância de 10%) entre embriões de

qualidade A,B e C versus D ao dia 3 de desenvolvimento, e A1460/A2870 para embriões que atingiram blastocisto com qualidade A,B versus C,D em dia 3.

Quanto à análise da 2ª derivada de espectros de meios de cultura de embriões transferidos, detetaram-se aparentemente diferenças entre os embriões que implantaram (Beta hCG+) e os embriões que não implantaram (Beta hCG-), na cultura individual, contudo a amostra é bastante reduzida o que torna o resultado pouco relevante. Observou-se nos espectros do meios de cultura diluídos que a  $1315\text{ cm}^{-1}$  os 2 embriões Beta hCG+ apresentam um pico no sentido oposto aos 2 embriões Beta hCG-, que apenas os 2 embriões Beta hCG- apresentam um pico a  $1456\text{ cm}^{-1}$ , e que apenas os embriões Beta hCG+ formam um pico a  $1578\text{ cm}^{-1}$ . Na análise da 2ª derivada de espectros de meios de cultura não diluídos o embrião Beta hCG+ apresenta picos únicos a  $1024\text{ cm}^{-1}$ ,  $1091\text{ cm}^{-1}$ , e  $1153\text{ cm}^{-1}$ , e o embrião Beta hCG- picos únicos a  $1379\text{ cm}^{-1}$ , a  $1396\text{ cm}^{-1}$ , e a  $1549\text{ cm}^{-1}$ .

Na análise de espectros de meios de cultura de embriões ao dia 5/6 de desenvolvimento, não foi detetada nenhuma correlação entre o perfil molecular dos meios de cultura e a qualidade dos embriões. No que diz respeito à previsão de chegada a blastocisto a partir da análise de meios de cultura ao dia 3 de desenvolvimento, em cultura individual e grupo, não foram detetadas diferenças entre os espectros de embriões que atingiram blastocisto comparativamente com os que não atingiram.

Observou-se um padrão diferente na 2ª derivada dos espectros de meios de cultura de embriões provenientes de ovócitos a fresco e vitrificados, quer na cultura individual quer na cultura de grupo.

No que diz respeito à cultura de grupo de embriões, ao dia 3 de desenvolvimento não se observaram diferenças entre espectros de cultura de grupo com densidade de 3 ou 2 embriões por gota, contudo ao dia 5/6 de desenvolvimento conservam-se aparentemente diferenças na região dos lípidos.

Na análise das gotas de cultura de grupo, não se observaram diferenças entre os perfis moleculares das gotas de cultura com embriões de boa qualidade e gotas de cultura com embriões de má qualidade, e entre os espectros de gotas de embriões que atingiram blastocisto e gotas de embriões que não atingiram blastocisto.

A maior limitação do presente trabalho, foi a diversidade de processos de PMA que amostra apresentava. O projeto não interferiu com o procedimento normal da clínica, sendo que os 123 embriões considerados de 12 pacientes, estavam associados a uma elevada diversidade de procedimentos, como sejam da origem de óvulos (obtidos a fresco ou vitrificados) que resultaram de diferentes técnicas (FIV ou ICSI) e mantidos em cultura individual ou de grupo. Quanto a perspectivas de trabalho, deve-se continuar a aquisição de informação, isto é, de análise de um maior número de meios de cultura,

de forma a obter-se uma maior dimensão de amostra relativa a cada um dos procedimentos de PMA (origem dos óvulos, FIV vs. ICSI, cultura individual ou de grupo). Desta forma futuramente poderá realizar-se um estudo dos perfis metabólico numa população mais homogénea, o que poderá permitir identificar regiões do espectro com capacidade de prever o potencial de implantação de cada embrião.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. WHO. Sexual and reproductive health Infertility definitions and terminology. Available at: <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>. 2/06/2018, 17:30.
2. Mascarenhas, M. N., Flaxman, S. R., Boerma, T., Vanderpoel, S. & Stevens, G. A. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 9: 1–12 (2012).
3. Kamel, R. M. Assisted Reproductive Technology after the birth of Louise Brown. *Gynecol. Obstet.* 3(3): 2161:0932 (2013).
4. Land, J. A. & Evers, J. L. H. Risks and complications in assisted reproduction techniques: Report of an ESHRE consensus meeting. *Hum. Reprod.* 18: 455–457 (2018).
5. Centro Nacional de Procriação Medicamente Assistida. Atividade desenvolvida pelos centros de pma em 2015. (2017).
6. Meseguer, M. *et al.* The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation †. *Hum. Reprod.* 26: 2658–2671 (2011).
7. Vergouw, C.G., Heymans, M.W., Hardarson, T., Sfontouris, I.A., Economou, K.A., Ahistrom, A., Rogberg, L., Lainas, T.G., Sakkas, D., Kieslinger, D.C., Kosteljik, E.H., Hompes, P.G.A., Schats, R., and Lambalk, C.B. No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates: results from an individual patient data meta-analysis. *Hum. Reprod.* 29: 455-461 (2014).
8. Katz-jaffe, M. G., McCreynolds, S. Embryology in the era of proteomics. *Fertil. Steril.* 99:1073–1077 (2013).
9. Lainas, G. T. & Sakkas, D. Non-invasive metabolomic analysis using a commercial NIR instrument for embryo selection. *J. Hum. Reprod. Sci.* 6(2):133-9 (2013).
10. Montag, M., Toth, B. & Strowitzki, T. New approaches to embryo selection. *Reprod. Biomed. Online* 27: 539–546 (2013).
11. Sadler, T. X. *Langman's Medical Embryology*. Wolters Kluwer. 12<sup>th</sup> Edition. (2012)
12. Ziebe, S., Petersen, K. & Lindenberg, S. Embryo morphology or cleavage stage: How to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 12(7): 1545-9 (1997).
13. Giorgetti, C. *et al.* Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Human reprod.* 10(9): 2427-31 (1995).
14. Tarkowski, B. K. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Development.* 18: 155–180 (1967).
15. Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, H. K. Early human embryo metabolism. *Bioessays.* 15(4): 259–64 (1993).
16. Leese, H. J., Baumann, C. G., Brison, D. R., Mcevoy, T. G. & Sturmey, R. G. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod.* 14: 667–672 (2008).

17. Gott, A. L., Hardy, K., Winston, R. M. L. & Leese, H. J. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 5: 104–108 (1990).
18. Thompson, J. G., Kind, K. L., Roberts, C. T., Robertson, S. A. & Robinson, J. S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies. *Hum. Reprod.* 8(12): 2508-11(2014).
19. Sites, C. K., Marie, P. S. & Rahil, T. Implantation of fresh and thawed – warmed embryos in single embryo transfer cycles : interpreting the initial beta-HCG. *Reprod. Biomed. Online* 30: 319–321 (2015).
20. Gardner, D. K., Phil, D., Wale, P. L. & Sc, B. Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer. *Fertil. Steril.* 99: 1062–1072 (2013).
21. Thompson, J.G.. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. *Anima. Anim. Reprod. Sci.* 60: 263–275 (2000).
22. Uyar A., Seli E. Metabolomic Assessment of Embryo Viability. *Semin Reprod Med.* 32(2): 141–152 (2014)
23. Devreker, F. & Englert, Y. In vitro development and metabolism of the human embryo up to the blastocyst stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 92: 51–56 (2000).
24. Seli, J. G. B. and E. Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 20: 234–241 (2008).
25. Brison, D. R., Houghton F.D., Falconer D., Roberts S.A., Hawkhead J., Humpherson P.G., Lieberman B.A., Leese H.J. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod.* 19 (10): 2319–2324 (2004).
26. Kleijkers, S. H. M. *et al.* Ammonium accumulation in commercially available embryo culture media and protein supplements during storage at 2 – 8 8 C and during incubation at 37 8 C. *Hum. Reprod.* 31: 1192–1199 (2016).
27. Gardner D. K., Hamilton R., Mccallie B., Schoolcraft W. B., and Katz-Jaffe M.G. Human and mouse embryonic development, metabolism and gene expression are altered by an ammonium gradient in vitro. *Reprod.* 146 (1): 49-61 (2013).
28. Virant-Klun, I. Increased ammonium in culture medium reduces the development of human embryos to the blastocyst stage. *Fertil. Steril.* 85: 2005–2007 (2006).
29. Begum, M. R. & Begum, M. R. Assisted Reproductive Technology : Techniques and Limitations Assisted Reproductive Technology. *J Bangladesh Coll Phys Surg.* 26:135-141 (2008).
30. David Gardner, Ariel Weissman, Colin Howles, Z. S. *Textbook of Assisted Reproductive Technologies.* Third Edition. informa healthcare (2009).
31. Luddi, A., Piomboni, P., Rubino, P. & Vigano, P. The ICSI procedure from past to future : a systematic review of the more controversial aspects. *Hum Reprod Update.* 22: 194–227 (2018).
32. Magli, M. C., Jones, G. M., Lundin, K. & Abbeel, E. Van Den. Atlas of Human Embryology : from Oocytes to Preimplantation Embryos. *Hum. Reprod.* 27(1):1 (2012).

33. Dieamant, F. *et al.* Review Single versus sequential culture medium : which is better at improving ongoing pregnancy rates ? A systematic review and meta-analysis. *JBRA Assit. Reprod.* 21: 240–246 (2017).
34. Tao, T., Robichaud, A., Mercier, J. & Ouellette, R. Influence of group embryo culture strategies on the blastocyst development and pregnancy outcome. *J Assit reprod Genet.* 30(19): 63–68 (2013).
35. Ebner, T. Group culture of human zygotes is superior to individual culture in terms of blastulation , implantation and life birth. *Reprod. Biomed. Online* 21: 762–768 (2010).
36. Rebollar-Lazaro I, M. P. The culture of human cleavage stage embryos alone or in groups: effect upon blastocyst utilization rates and implantation. *Reprod Biol.* 10(3): 227–34 (2010).
37. Spyropoulou, I., Karamalegos, C. & Bolton, V. N. A prospective randomized study comparing the outcome of in-vitro fertilization and embryo transfer following culture of human embryos individually or in groups before embryo transfer on day 2. *Hum. Reprod.* 14: 76–79 (1999).
38. Rijnders P.M., Jansen C.A. Influence of group culture and culture volume on the formation of human blastocysts: a prospective randomized study. *Hum. Reprod.* 14 (9): 2333–2337 (1999).
39. Vergouw, C. G., Kieslinger, C.D., Kostelijk, E.H., Brotos, L.L., Schats, R., Hompes, P.G., Sakkas, D., and Lambalk, C.B.. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology : a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.* 27: 2304–2311 (2012).
40. Li, X. *et al.* Non-invasive metabolomic profiling of embryo culture media and morphology grading to predict implantation outcome in frozen-thawed embryo transfer cycles. *J Assit. Reprod. Genet.* 32(11): 1597–1605 (2015).
41. Zhao, X, Ma, B., Mo, S., Ma, L., Chang, F., Zhang, L., Xu, L., Wang, L. Improvement of pregnancy outcome by extending embryo culture in IVF-ET during clinical application. *J. Assit. Reprod. Genet.* 35: 321–329 (2018).
42. Stephen A. Butler, Jameel Luttoo, M. O. T. F. Human Chorionic Gonadotropin (hCG) in the Secretome of Cultured Embryos Hyperglycosylated hCG and hCG-Free Beta Subunit Are Potential Markers for Infertility Management and Treatment. *Reprod. Sci.* 20: 1038–45 (2013).
43. Society, A., Technology, A. R. & States, U. Guidance on the limits to the number of embryos to transfer : a committee opinion. *Fertil. Steril.* 107,:11–13 (2017).
44. Harbottle S, Hughes C, Cutting R, Roberts S, B. D. Elective Single Embryo Transfer: an update to UK Best Practice Guidelines. *Hum Fertil (Camb).* 18: 165–83 (2015).
45. Ajduk, A. Quality control of embryo development. *Mol. Aspects Med.* 34, 903–918 (2013).
46. Assou S., Haouzi D., De Vos J., Hamamah S. Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Mol Hum Reprod*, 16(8): 531–538 (2010).
47. Gómez E., Ruíz-Alonso M., Miravet J., Simón C. Human Endometrial Transcriptomics:

- Implications for Embryonic Implantation. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5(7) 1–9 (2015).
48. Vassena R., Boué c., González-Roca E., Aran B., Auer H., Viega A., Izpisua Bemonte J.C. Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*, 138(17): 3699-709 (2011).
  49. Braga D.P., Setti A.S., Lo Turco E.G., Cordeiro F.B., Cabral E.C., Cortezzi S.S., Ono E., Figueira R.C., Eberlin M.N., Borges E. Protein expression in human cumulus cells as an indicator of blastocyst formation and pregnancy success. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33(12): 1571–1583 (2016).
  50. Bracewell-Milnes, T., Saso S., Abdalla H., Nikolau D., Norman-Taylor J., Johnson M., Holmes E., Thum M.y. Metabolomics as a tool to identify biomarkers to predict and improve outcomes in reproductive medicine : a systematic review. *Hum Reprod Update*, 23(6): 723-736 (2017).
  51. ASEBIR. Cuadernos de Embriología Clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. *ASEBIR* (2015).
  52. Botros, L., Sakkas, D. & Seli, E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol. Human Reprod.* 14: 679–690 (2008).
  53. Vergouw, C.G., Botros, L.L., Roos, P., Lens, J.W., Schats, R., Hompes, P.G.A., Burns, D.H., and Lambalk, C.B. No evidence that embryo selection by near-infrared spectroscopy in addition to morphology is able to improve live birth rates : results from an individual patient data meta-analysis. *Hum. Reprod.* 29: 455–461 (2014).
  54. Wikland, M., Rogberg, L., Siques, J., Tucker, M. & Hardarson, T. Cross-validation and predictive value of near-infrared spectroscopy algorithms for day-5 blastocyst transfer. *Reprod. Biomed. Online.* 22(5): 477–484 (2011).
  55. Rogberg, L. *et al.* Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium : a prospective randomized trial. *Human Reprod.* 27: 89–96 (2012).
  56. Hardarson, T., Ahlstro, A., Westlander, G., Sakkas, D. & Wikland, M. Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium : a prospective randomized trial. *Hum. Reprod.* 27: 89–96 (2012).
  57. Sfountouris, I. A., Lainas, G. T., Sakkas, D., Zorzovilis, I. Z. & Petsas, G. K. Non-invasive metabolomic analysis using a commercial NIR instrument for embryo selection. *Journal of Human Reproductive Science.* 6: 133–139 (2013).
  58. Muñoz M., Uyar A., Correia E., Ponsart C., Guyader-Joly C., Martínez-bello D., Marquant-Le G.B., Fernandez-Gonzalez A., Díez C., Caamaño J.N., Trigal B., Humblot P., Carrocera S., Martin D., Seli E., Gomez E. Metabolomic Prediction of Pregnancy Viability in Superovulated Cattle Embryos and Recipients with Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biomed Res Int.* (2014).
  59. Bellisola, G. & Sorio, C. Infrared spectroscopy and microscopy in cancer research and diagnosis. *American Journal of Cancer Research* 2(1): 1–21 (2015).
  60. Douglas A. Skoog, F. J. H. & Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis.* Sixth Edition. Thomson (2007).

61. Smith, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Second Edition. CRC Press (2011).
62. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications*. Wiley (2004).
63. Nicolet, T. & All, C. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry*. (2001).
64. Rosa F, Sales KC, Cunha BR, Couto A, Lopes MB, Calado C. R. A comprehensive high-throughput FTIR spectroscopy-based method for evaluating the transfection event: estimating the transfection efficiency and extracting associated metabolic responses. *Anal Bioanal Chem*. 407(26): 8097–108 (2015).
65. Borini, A. *et al.* Article Cumulative pregnancy rates resulting from the use of fresh and frozen oocytes : 7 years ' experience. *Reprod. Biomed. Online* 12: 481–486 (2006).

**Anexo 1** – Análise da 2ª derivada de embriões em cultura de grupo diluída ao dia 3 de desenvolvimento, com densidade de 3 embriões por gota. Os embriões tiveram origem em ovócitos a fresco. Comparou-se gotas em que todos os embriões atingiram blastocisto ao dia 5/6 de desenvolvimento (verde), com gotas que apenas um ou dois embriões atingiram blastocisto (vermelho).

