

# NON-INVASIVE PREDICTION OF BLASTOCYST IMPLANTATION, ONGOING PREGNANCY AND LIVE BIRTH, BY MASS SPECTROMETRY LIPID FINGERPRINTING

Edson Borges Jr<sup>1</sup>; Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga<sup>1,2</sup>; Amanda Setti Raize<sup>1</sup>;  
Daniela A. Montanni<sup>2</sup>; Elaine Cristina Cabral<sup>3</sup>; Marcos N. Eberlin<sup>3</sup>; Edson G. Lo Turco<sup>2</sup>;  
Assumpto Iaconelli Jr<sup>3</sup>

1



2



3



# INTRODUÇÃO

- ✓ A maioria dos embriões produzidos in vitro transferidos falham em implantar

Hum. Reprod. Advance Access published May 20, 2016

Human Reproduction, Vol.0, No.0 pp. 1–22, 2016

doi:10.1093/humrep/dew082

human  
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Reproductive epidemiology*

## International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: Assisted Reproductive Technology 2008, 2009 and 2010<sup>†</sup>

S. Dyer<sup>1,\*</sup>, G.M. Chambers<sup>2</sup>, J. de Mouzon<sup>3</sup>, K.G. Nygren<sup>4</sup>,  
F. Zegers-Hochschild<sup>5</sup>, R. Mansour<sup>6</sup>, O. Ishihara<sup>7</sup>, M. Banker<sup>8</sup>,  
and G.D. Adamson<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Department of Obstetrics & Gynaecology, Groote Schuur Hospital and Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, Cape Town, South Africa <sup>2</sup>National Perinatal Epidemiology and Statistics Unit, University of New South Wales, Sydney, Australia <sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Service de Gynécologie Obstétrique II et de Médecine de la Reproduction, Groupe Hospitalier Cochin-Saint Vincent de Paul, Paris, France <sup>4</sup>Medical Epidemiology and Biostatistics, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden <sup>5</sup>Clinica las Condes and Program of Ethics and Public Policies in Human Reproduction, University Diego Portales, Santiago, Chile <sup>6</sup>Egyptian IVF-ET Center, Cairo, Egypt <sup>7</sup>Department of Obstetrics and Gynaecology, Saitama Medical University, Moroyama, Japan <sup>8</sup>Nova IVI Fertility, Chennai, India <sup>9</sup>Palo Alto Medical Foundation Fertility Physicians of North California, San Jose, CA, USA

2008, 2009 and 2010

> 4 x 10<sup>6</sup> procedimentos

> 1 x 10<sup>6</sup> nascidos vivos

Tx de bebê em casa < 20,0%

# INTRODUÇÃO

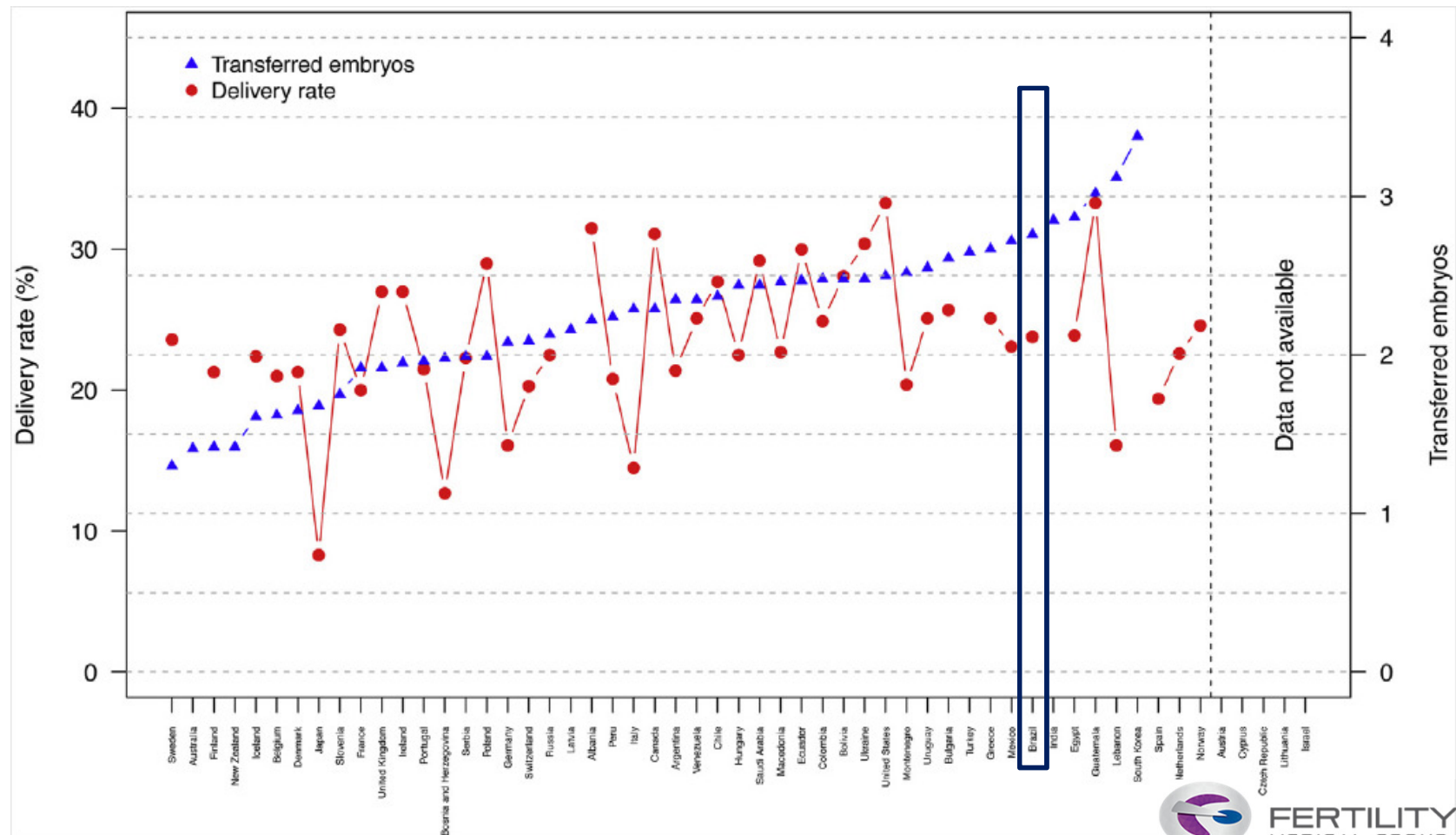
## International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies: World Report on Assisted Reproductive Technologies, 2007

Osamu Ishihara, M.D., Ph.D.,<sup>a</sup> G. David Adamson, M.D.,<sup>b</sup> Silke Dyer, M.D.,<sup>c</sup> Jacques de Mouzon, M.D., M.P.H.,<sup>d</sup> Karl G. Nygren, M.D., Ph.D.,<sup>e</sup> Elizabeth A. Sullivan, M.D., M.P.H.,<sup>f</sup> Fernando Zegers-Hochschild, M.D.,<sup>g</sup> and Ragaa Mansour, M.D., Ph.D.<sup>h</sup>

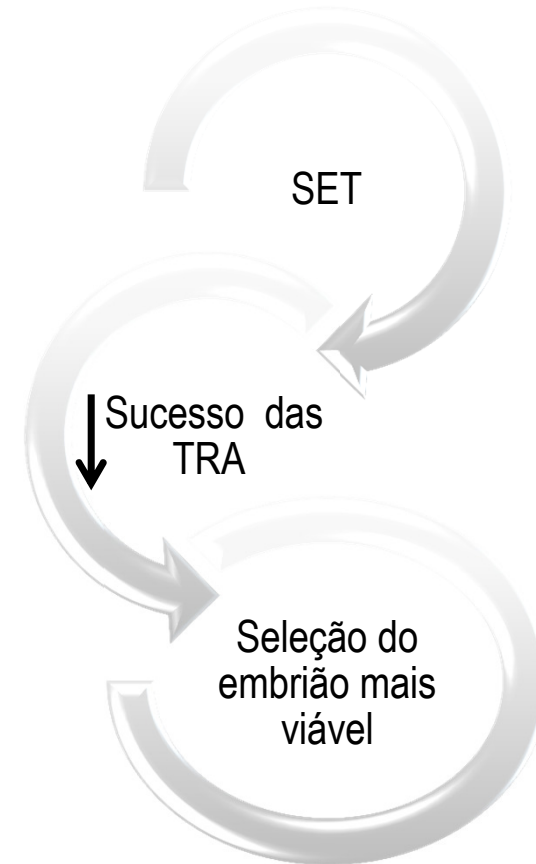
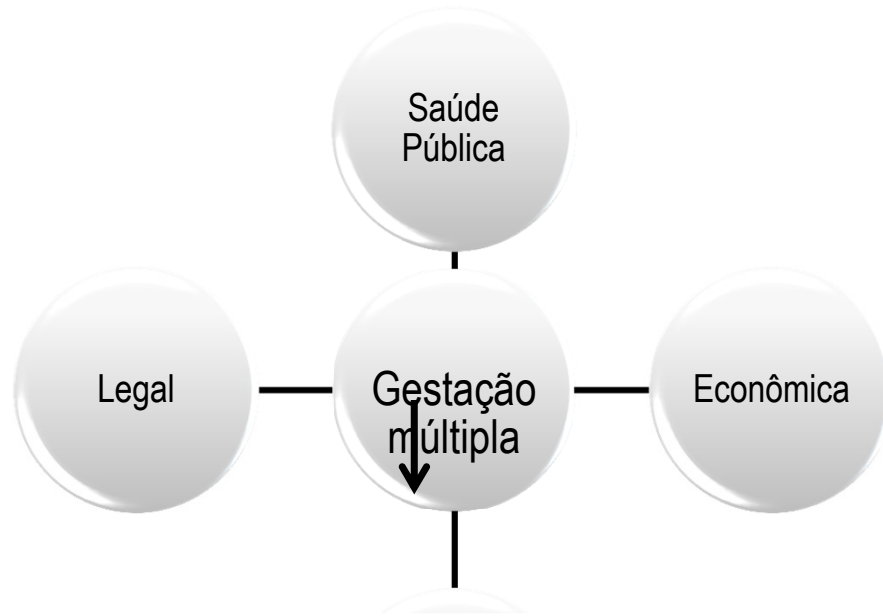
Baixa taxa de bebês em casa

Transferência de múltiplos embriões

Gestações múltiplas



# INTRODUÇÃO



**Seleção do embrião mais viável: Maior desafio da RA**

# DISCUSSÃO

Escolha dos vencedores



Não seleção – Transferir um por vez

Tempo, custo e desgaste

---

---

---

- Desenvolvimento de métodos não invasivos para determinação do blastocisto maior potencial de implantação  
**CRUCIAL**

# INTRODUÇÃO

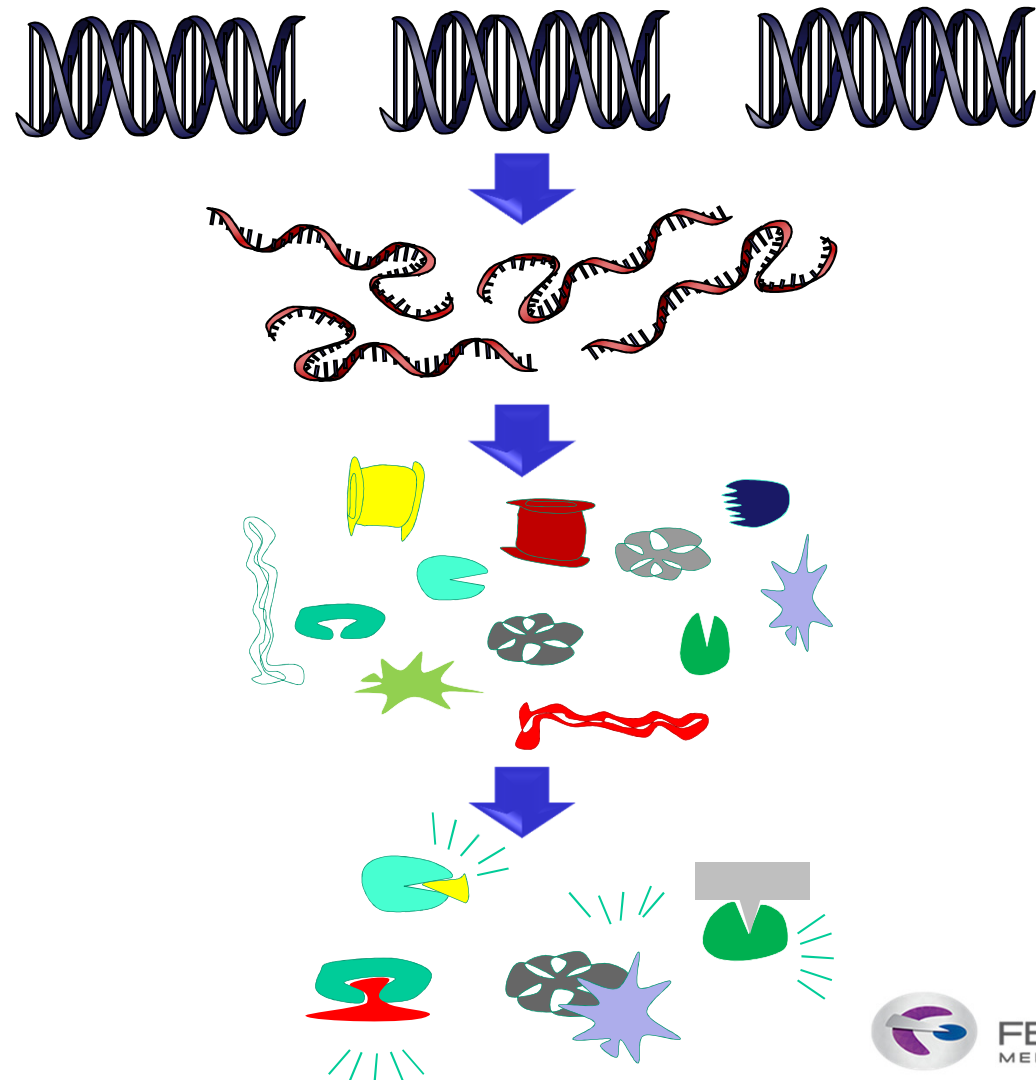
Métodos não invasivos para determinação da viabilidade embrionária

**GENOMA**  
~25,000 GENES

**TRANSCRIPTOMA**  
~100,000

**PROTEOMA**  
~1,000,000

**METABOLOMA**  
~2,500



## OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls

Emre Seli<sup>1</sup>, Claude Robert<sup>2</sup>, and Marc-Andre Sirard<sup>2\*</sup>

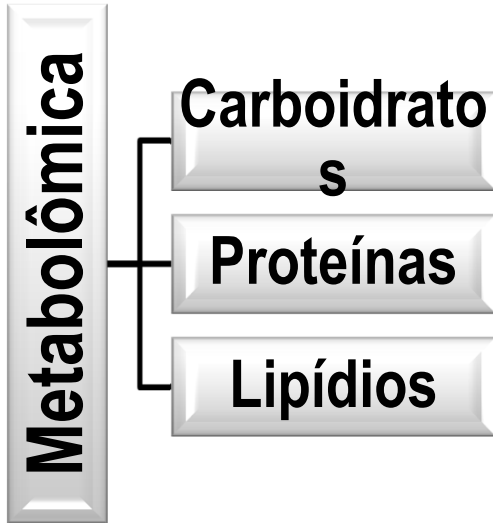
# INTRODUÇÃO

Fertility and Sterility® Vol. 99, No. 4, March 15, 2013

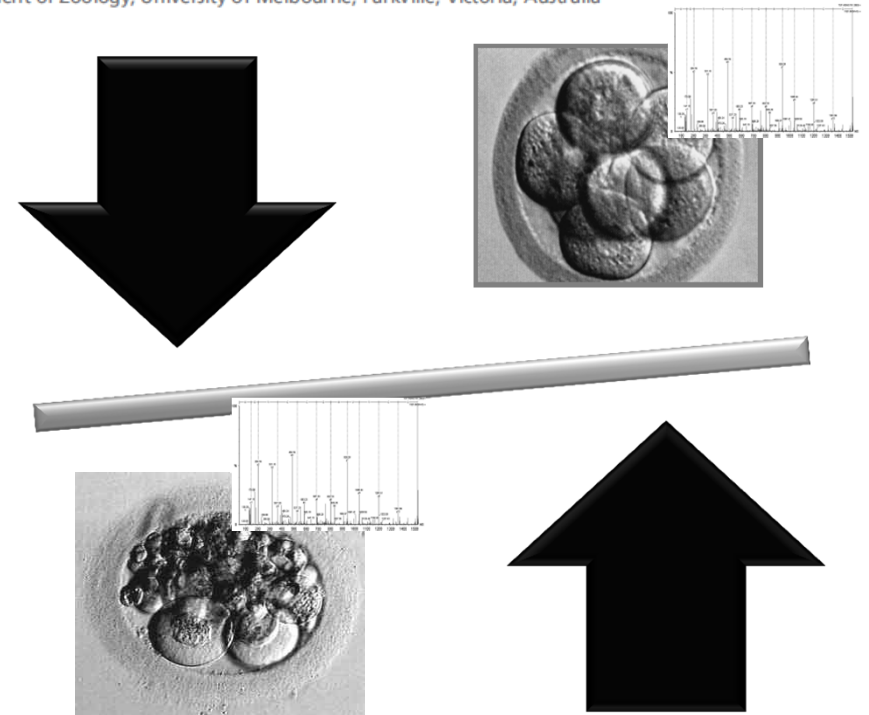
## Analysis of metabolism to select viable human embryos for transfer

David K. Gardner, D.Phil. and Petra L. Wale, B.Sc.

Department of Zoology, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia



Metabólitos detectados no meio de cultivo embrionário: importantes informações a respeito do embrião.



Alterações no metabolismo embrionário e suas implicações: embriões viáveis apresentam um perfil metabólico diferente dos não viáveis.

# INTRODUÇÃO

## LIPIDOMICS ERA: ACCOMPLISHMENTS AND CHALLENGES

**Maroun Bou Khalil, Weimin Hou, Hu Zhou, Fred Elisma, Leigh Anne Swayne, Alexandre P. Blanchard, Zemin Yao, Steffany A.L. Bennett, and Daniel Figeys\***

*Department of Biochemistry, Microbiology and Immunology,  
Faculty of Medicine, University of Ottawa, 451 Smyth Road, Ottawa, ON,  
Canada K1H 8M5*

*Received 16 April 2009; accepted 5 August 2009*

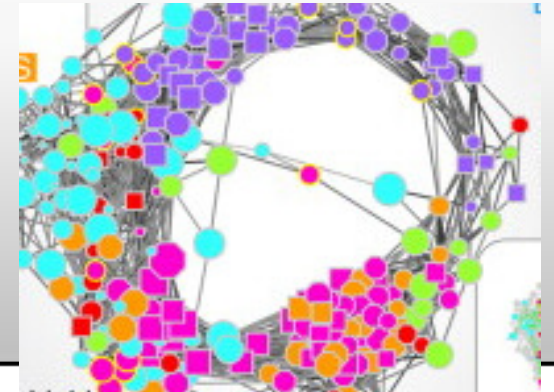
*Published online 7 October 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/mas.20294*





# INTRODUÇÃO

## LIPIDÔMICA



- Estudo em larga escala de espécies de lipídios e suas respectivas redes e vias metabólicas

## OBJETIVO

Identificar marcadores lipídicos da implantação de blastocistos em meio de cultivo de embriões no terceiro dia de desenvolvimento

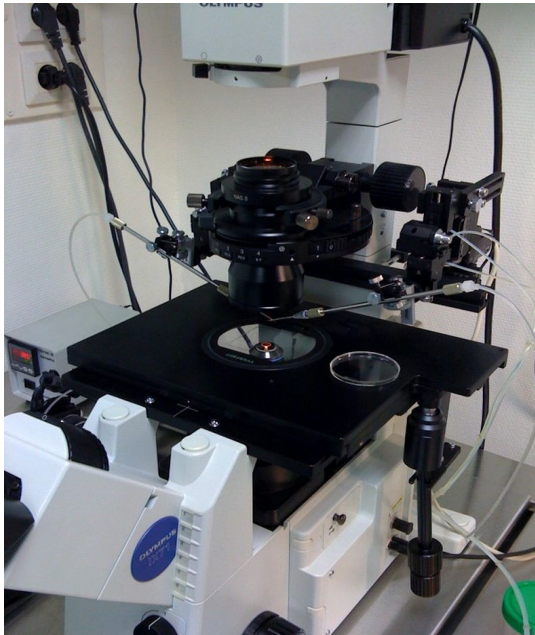
# MATERIAIS E MÉTODO

- DESENHO DO ESTUDO

Amostras de meio  
de cultivo de  
embriões em D3

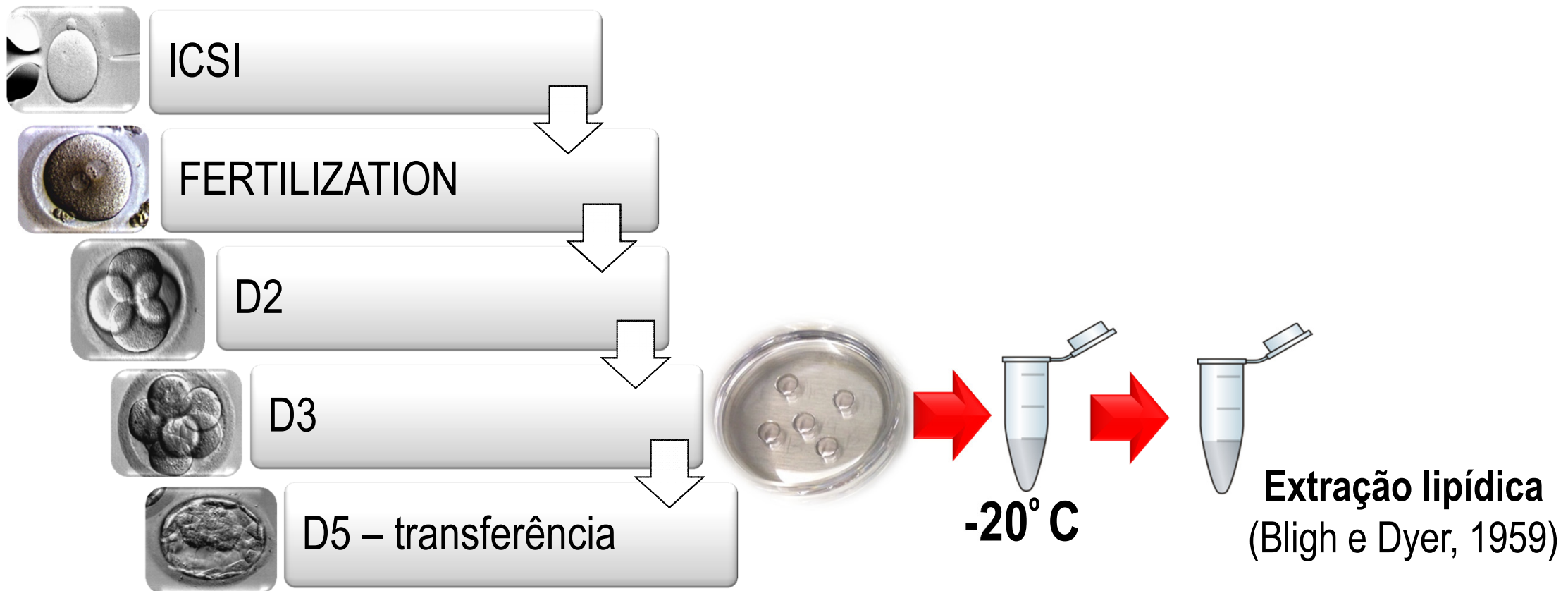
# MATERIAIS E MÉTODO

- PREPARO DOS OÓCITOS E ICSI
- Técnica padrão (Palermo et al., 1992)
- Após a injeção, os oócitos foram cultivados individualmente em microgotas de 50 $\mu$ L até o terceiro dia desenvolvimento



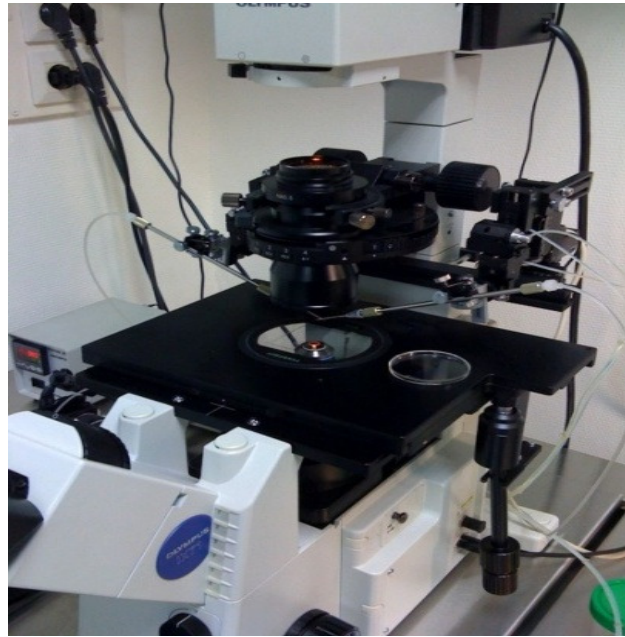
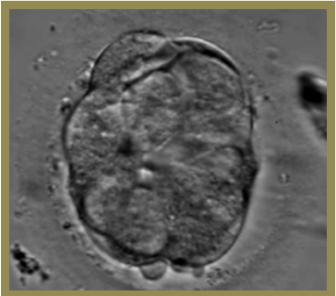
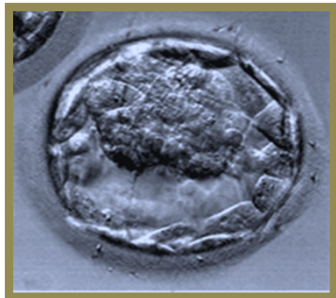
# MATERIAIS E MÉTODO

- COLETA DAS AMOSTRAS



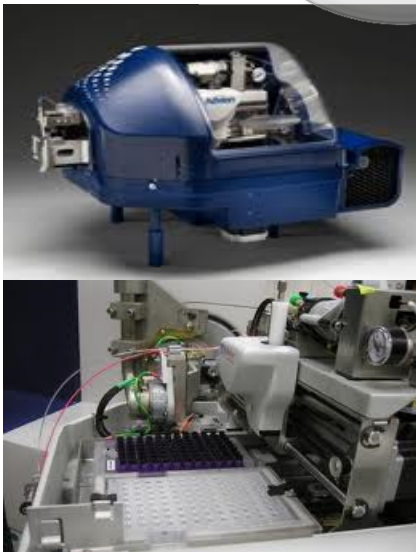
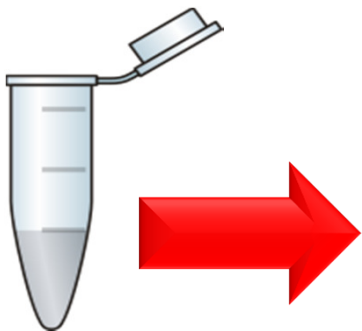
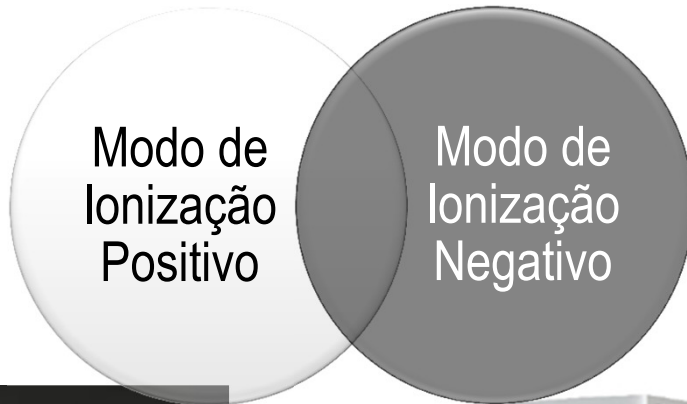
# MATERIAIS E MÉTODO

- AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA



# MATERIAIS E MÉTODO

- ESPECTROMETRIA DE MASSAS (ES) E PERFIL LIPÍDICO (*FINGERPRINTING*)

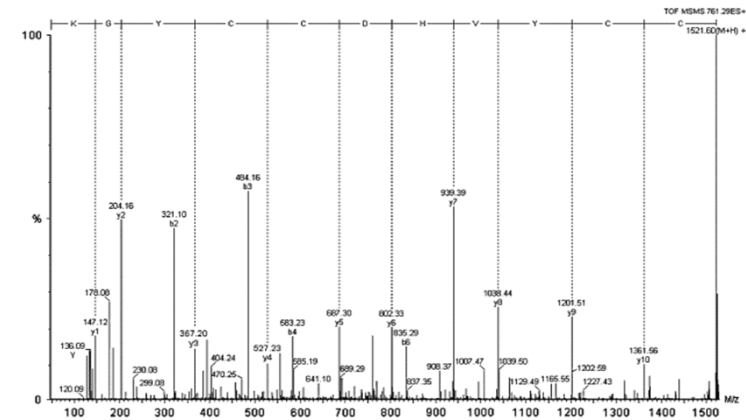


**Nanomate**

Injetor de amostras automatizado



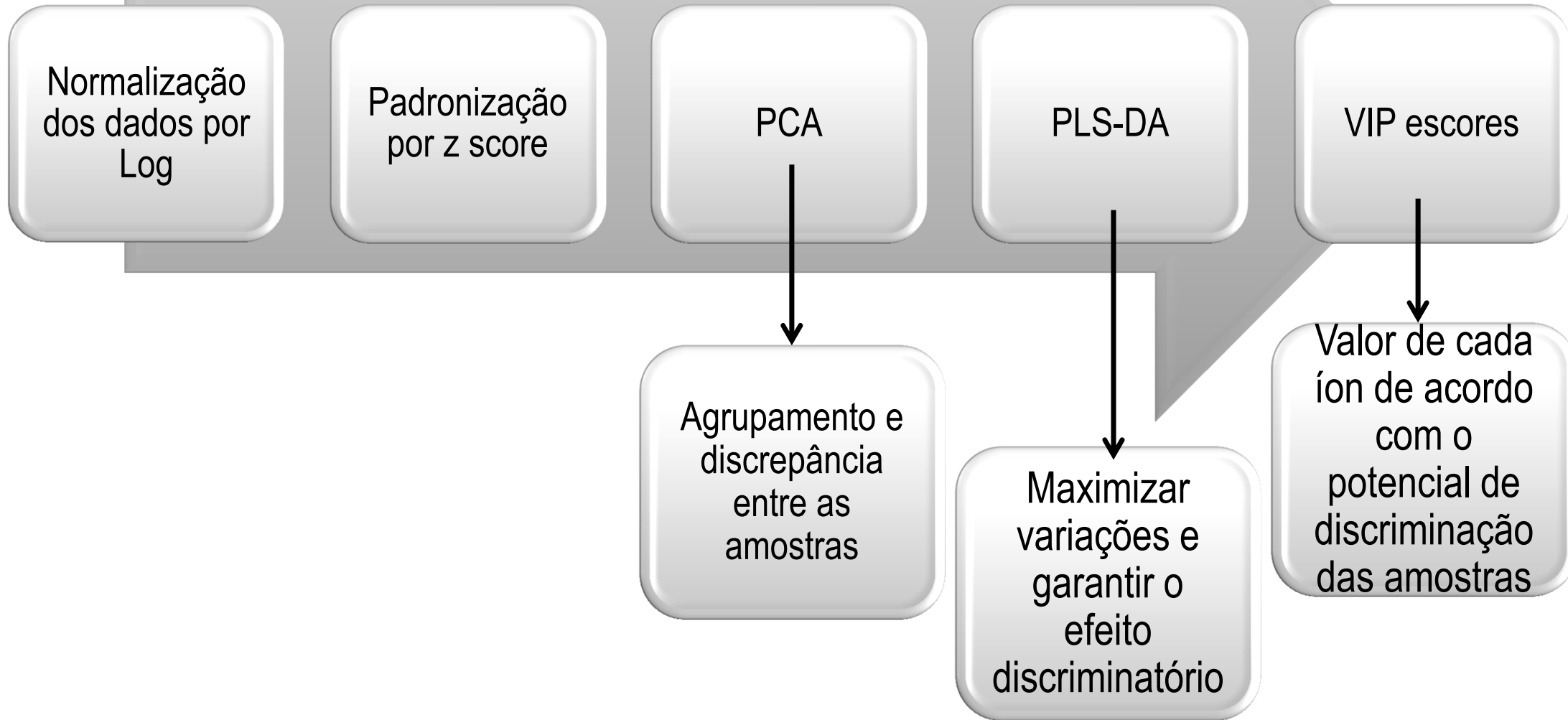
**Q-TOF**



**Aquisição de dados**

# MATERIAIS E MÉTODO

- ANÁLISE ESTATÍSTICA



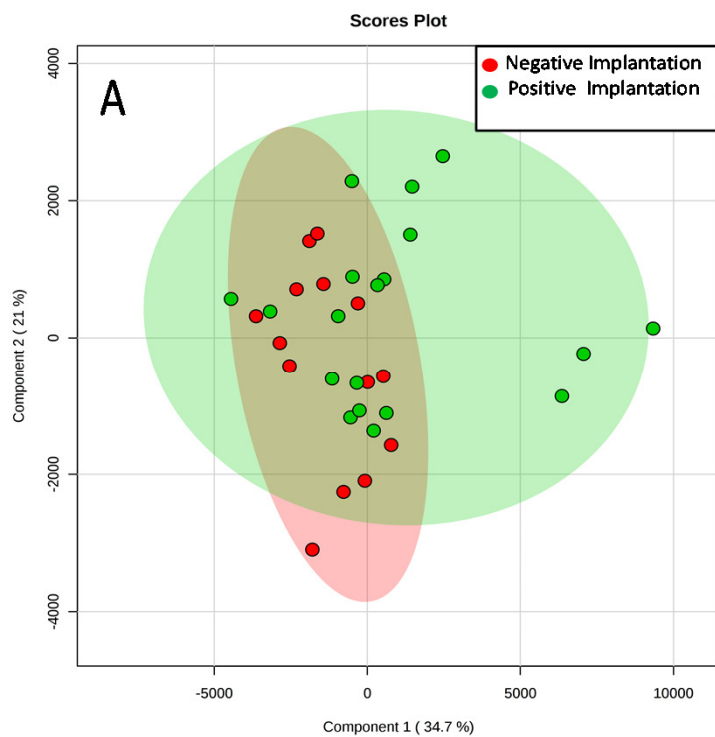
Metaboanalyst 3.0



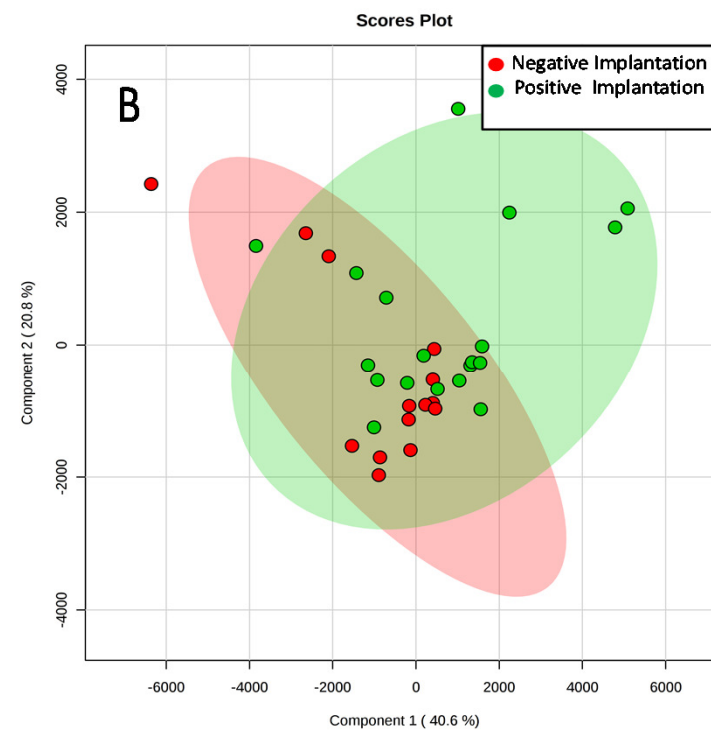
# RESULTADOS

PCA

Agrupamento das amostras do grupo de implantação negativo nos modos de ionização positivo e negativo



Modo Positivo

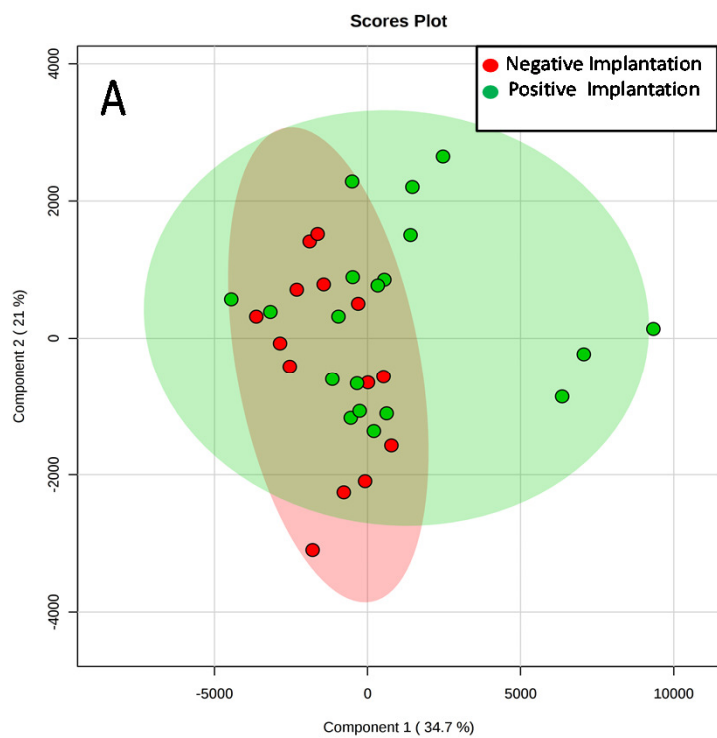


Modo Negativo

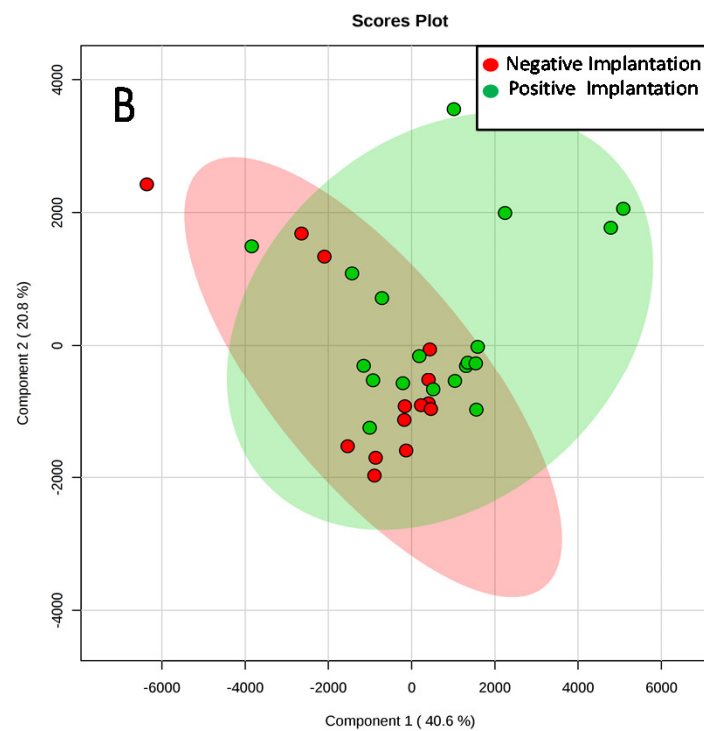
# RESULTADOS

PLS-DA

Discriminação das amostras do grupo de implantação negativo nos modos de ionização positivo e negativo



Modo Positivo

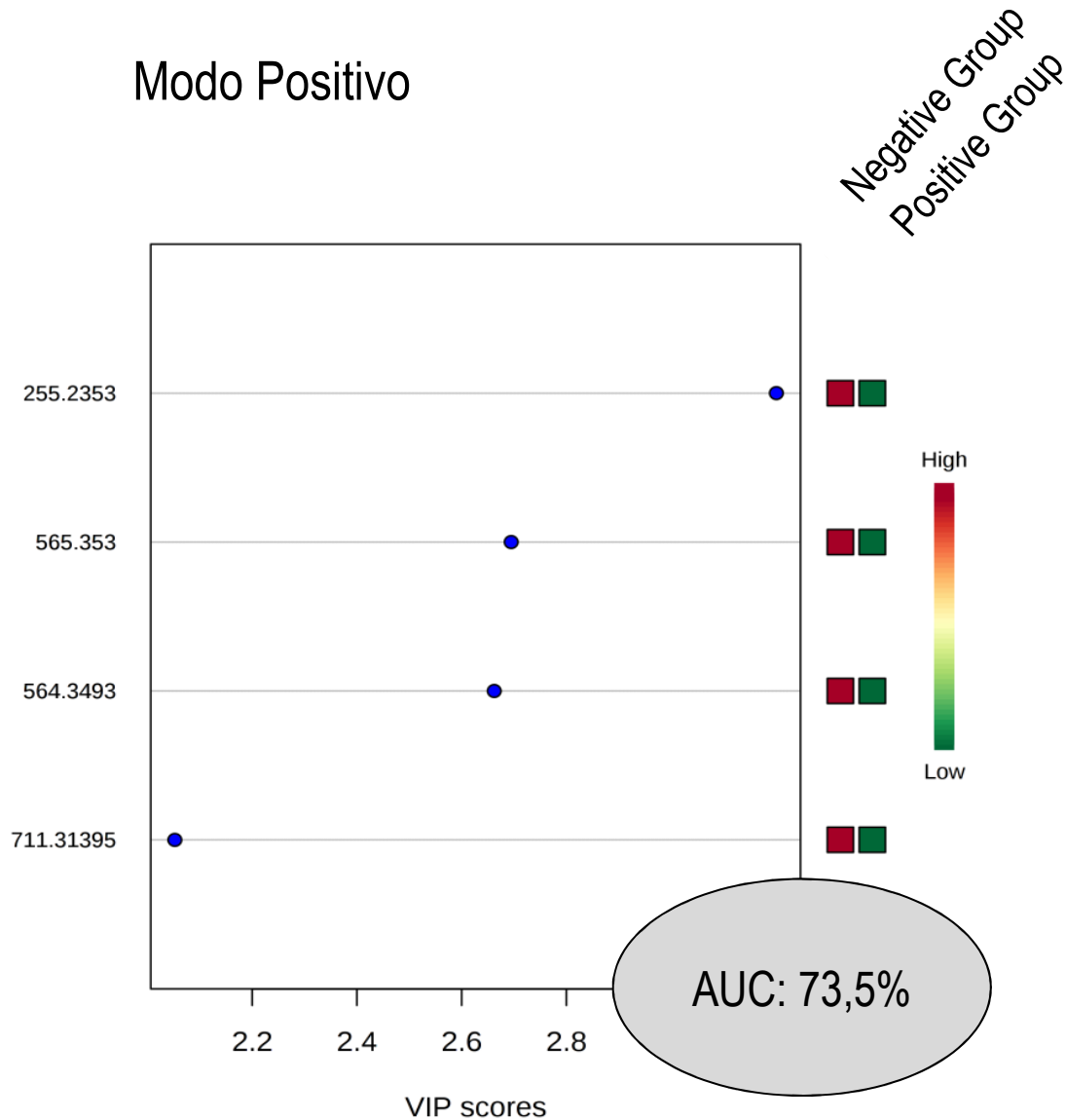


Modo Negativo

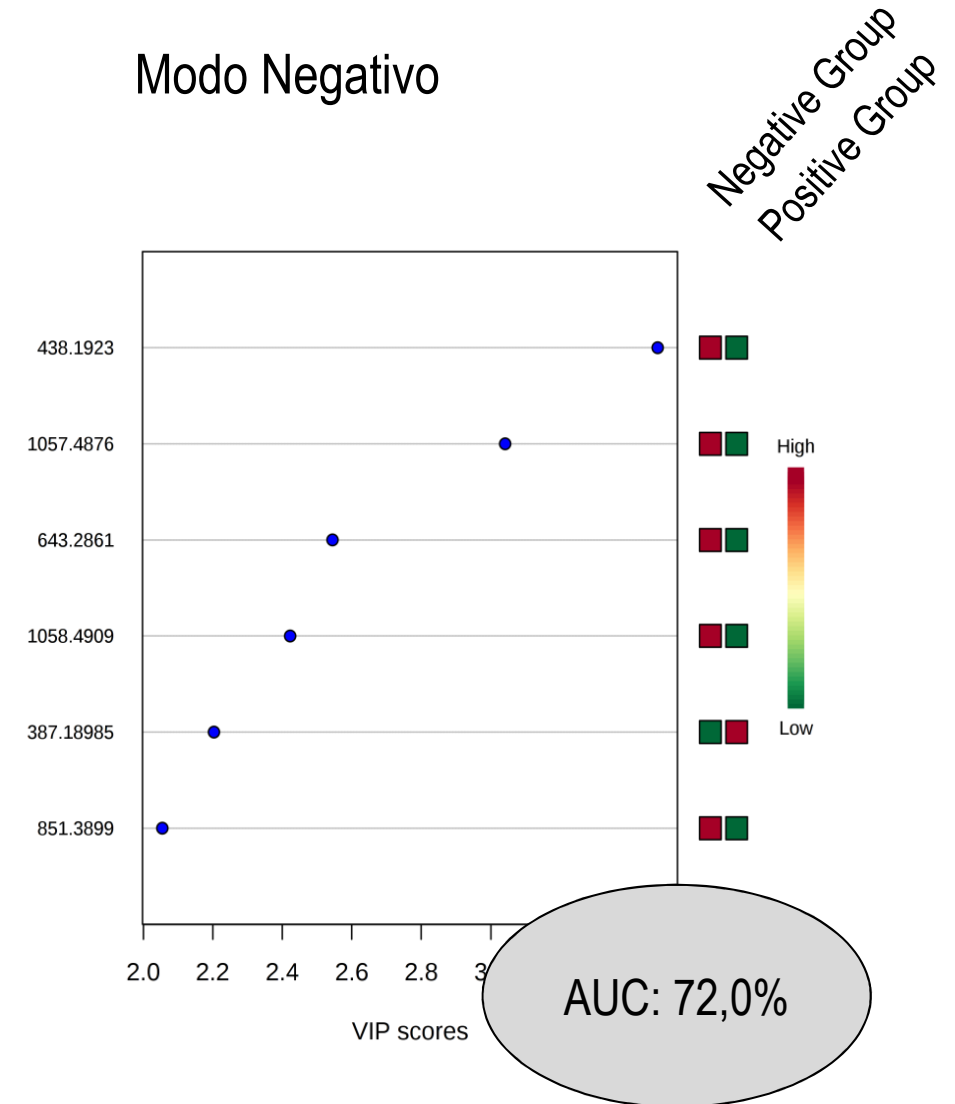
# RESULTADOS

- Principais íons responsáveis pela discriminação entre os grupo

Modo Positivo

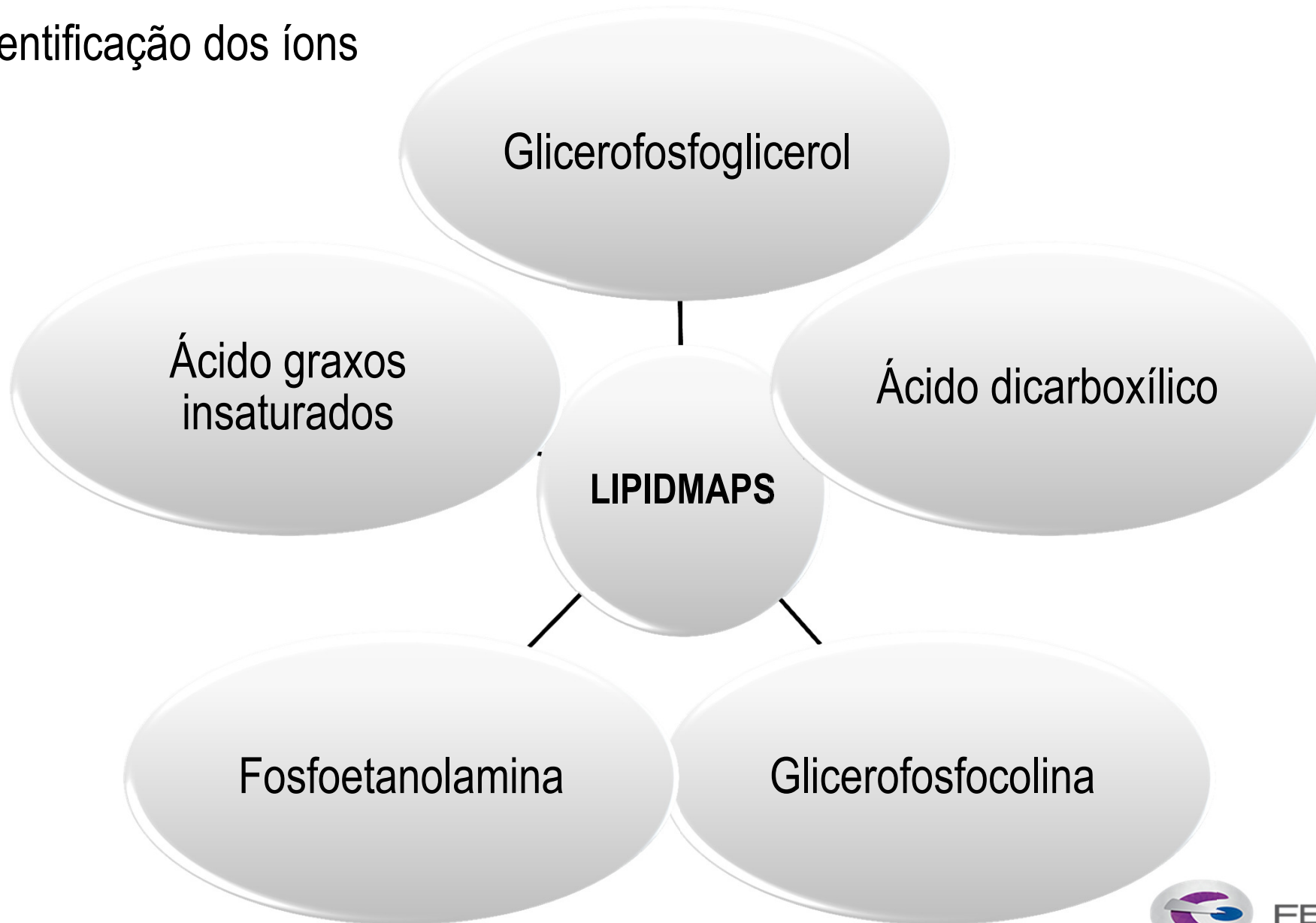


Modo Negativo

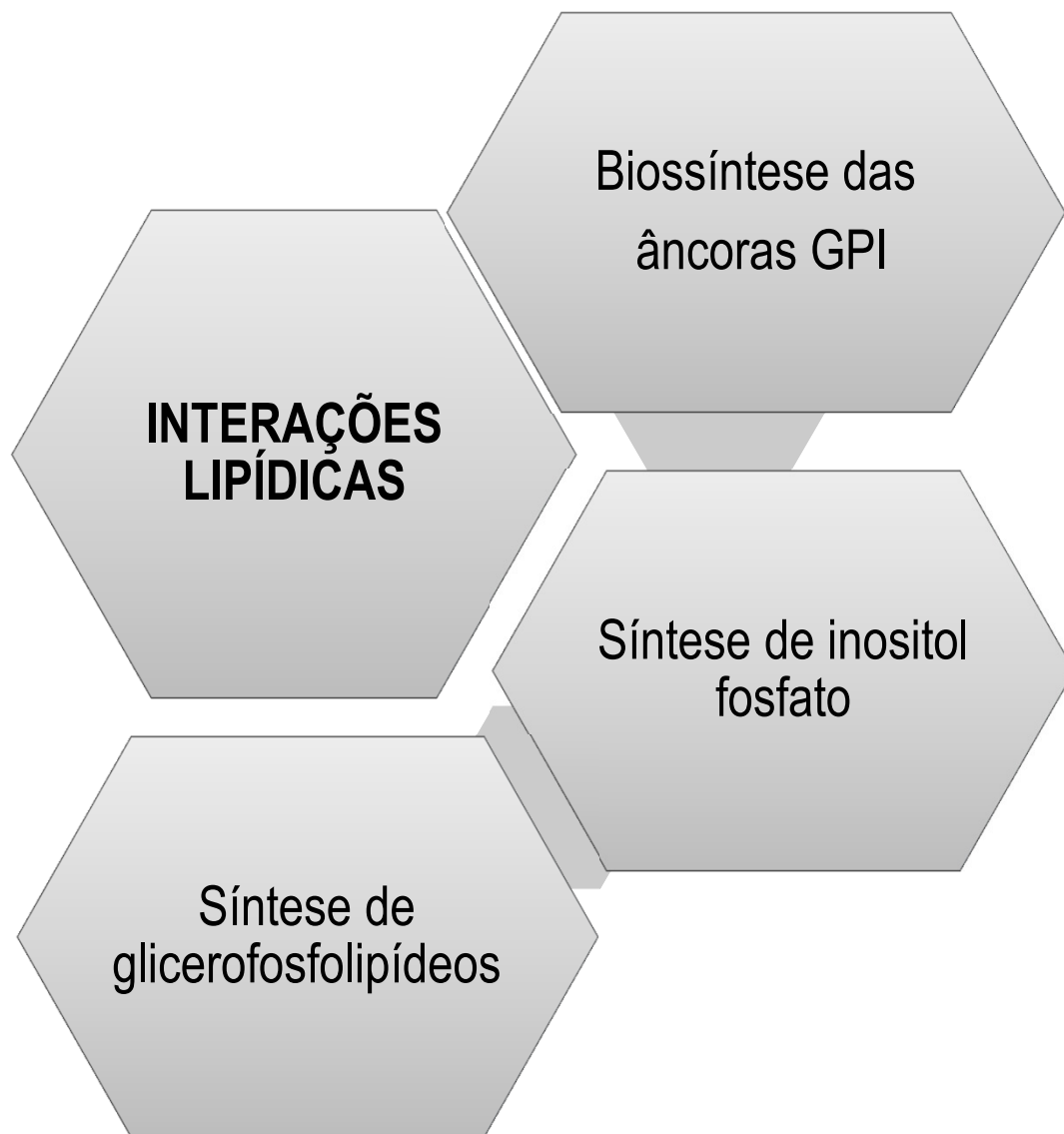


# RESULTADOS

- Identificação dos íons



# RESULTADOS



Lipídeos envolvidos na reestruturação celular



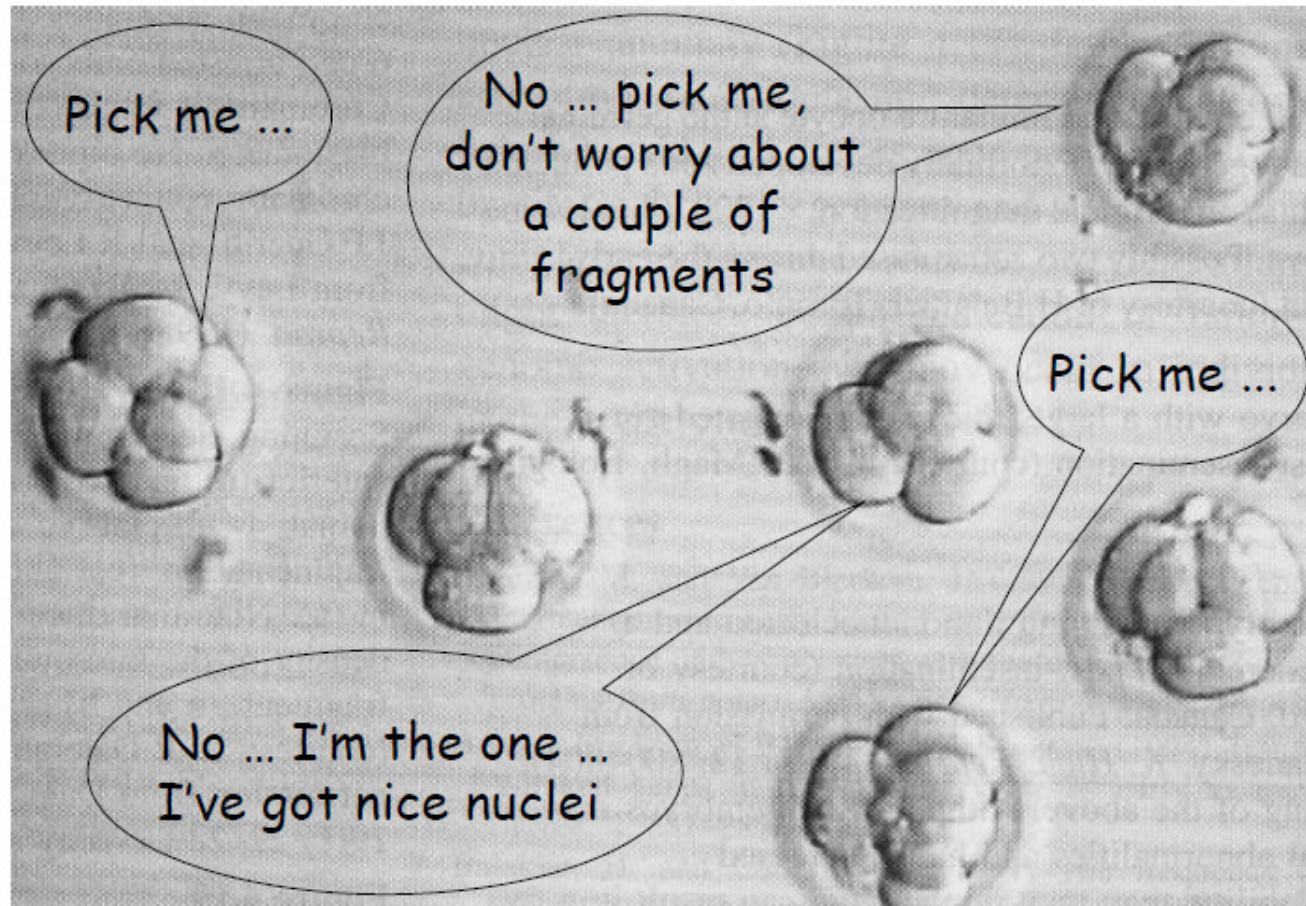
Embriões com pior potencial de implantação



Maquinaria à exaustão

# DISCUSSÃO

## The Embryologist's Dilemma....



# INTRODUÇÃO

## Cultivo de blastocistos

- Expressão do genoma embrionário: maior potencial de implantação
- Mais de um blastocisto disponível para transferência: Qual transferir ?





**Cochrane**  
**Library**

Cochrane Database of Systematic Reviews

Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D.  
Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology.  
*Cochrane Database of Systematic Reviews* 2016, Issue 6. Art. No.: CD002118.  
DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub5.

## Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review)

Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM, Alvarez Sedo CR, Blake D



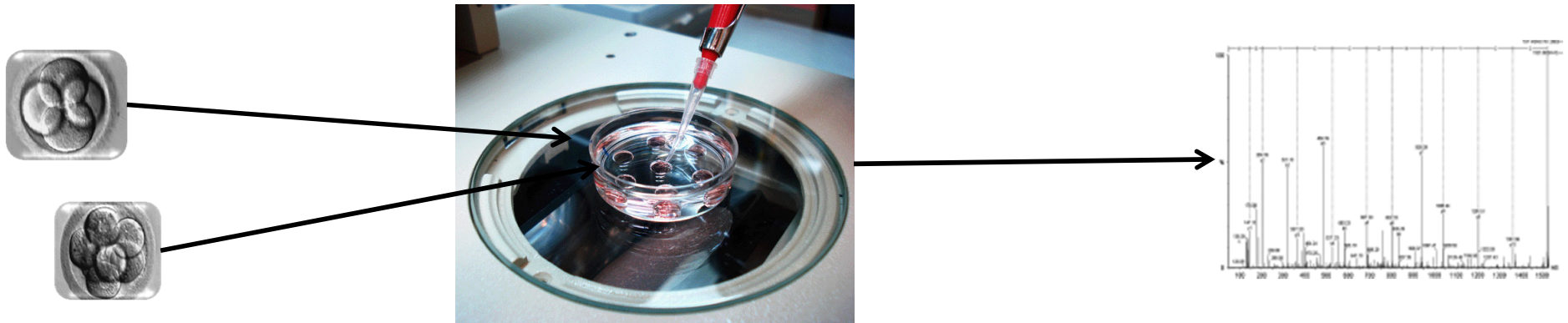
Gestação  
Múltipla



# DISCUSSÃO



# DISCUSSÃO



## Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study

Richard Scott, M.D.,<sup>a</sup> Emre Seli, M.D.,<sup>b</sup> Kathy Miller, B.S.,<sup>a</sup> Denny Sakkas, Ph.D.,<sup>b</sup> Katherine Scott, B.S.,<sup>a</sup> and David H. Burns, Ph.D.<sup>c</sup>

Fertility and Sterility® Vol. 90, No. 1, July 2008

Copyright ©2008 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

## Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization

Emre Seli, M.D.,<sup>a</sup> Lucy Botros, M.Sc.,<sup>b,c</sup> Denny Sakkas, Ph.D.,<sup>a,d</sup> and David H. Burns, Ph.D.<sup>b</sup>

Fertility and Sterility®

## Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer

Emre Seli, M.D.,<sup>a</sup> Carlijn G. Vergouw, M.Sc.,<sup>b</sup> Hiroshi Morita, B.Agr.,<sup>c</sup> Lucy Botros, M.Sc.,<sup>d</sup> Pieter Roos, Ph.D.,<sup>d</sup> Cornelius B. Lambalk, M.D., Ph.D.,<sup>b</sup> Naoki Yamashita, M.D.,<sup>c</sup> Osamu Kato, M.D.,<sup>c</sup> and Denny Sakkas, Ph.D.<sup>a,d</sup>

Fertility and Sterility®

Human Reproduction Vol.23, No.7 pp. 1499–1504, 2008

Advance Access publication on April 18, 2008

doi:10.1093/humrep/den111

## Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection

C.G. Vergouw<sup>1,4</sup>, L.L. Botros<sup>2</sup>, P. Roos<sup>2</sup>, J.W. Lens<sup>1</sup>, R. Schats<sup>1</sup>, P.G.A. Hompes<sup>1</sup>, D.H. Burns<sup>3</sup> and C.B Lambalk<sup>1</sup>

### **Prediction of embryo implantation potential by mass spectrometry fingerprinting of the culture medium**

Sylvia Sanches Cortezzi<sup>1</sup>, Elaine Cristina Cabral<sup>2</sup>, Marcello Garcia Trevisan<sup>3,4</sup>,  
Christina Ramires Ferreira<sup>2</sup>, Amanda Souza Setti<sup>1,5</sup>, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga<sup>1,5</sup>,  
Rita de Cássia Sávio Figueira<sup>5</sup>, Assumpto Iaconelli Jr<sup>1,5</sup>, Marcos Nogueira Eberlin<sup>2</sup>  
and Edson Borges Jr<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Sapientiae Institute – Educational and Research Center in Assisted Reproduction, Rua Vieira Maciel, 62, 04503-040 São Paulo, SP, Brazil, <sup>2</sup>ThomSON Mass Spectrometry Laboratory, Institute of Chemistry, University of Campinas - UNICAMP, 13083-970 Campinas, SP, Brazil, <sup>3</sup>Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-000 Alfenas, MG, Brazil, <sup>4</sup>National Institute of Science and Technology of Bioanalytical - INCTBio, 13084-971 Campinas, SP, Brazil and <sup>5</sup>Fertility – Assisted Fertilization Center, Avenida Brigadeiro Luis Antônio, 4545, 01401-002 São Paulo, SP, Brazil

Reproduction (2013) 145 453–462

- Perfil metabólico do meio de cultivo embrionário por EM como ferramenta preditora da viabilidade embrionária

## Non-Invasive Prediction of Blastocyst Formation by Day Three Embryo Culture Medium Mass Spectrometry Lipid Fingerprinting

Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga<sup>1,2,3</sup>, Amanda Souza Setti<sup>2,3</sup>, Elaine Cristina Cabral<sup>4</sup>, Marcos Eberlin<sup>5</sup>, Edson Guimarães Loturco<sup>1</sup>, Edson Borges Jr<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Disciplina de Urologia, Departamento de Cirurgia – UNIFESP - Brasil

<sup>2</sup>Instituto Sapientiae – Centro de Estudos e Pesquisa em Reprodução Assistida - Brasil

<sup>3</sup>Fertility – Medical Group – Sao Paulo - Brasil

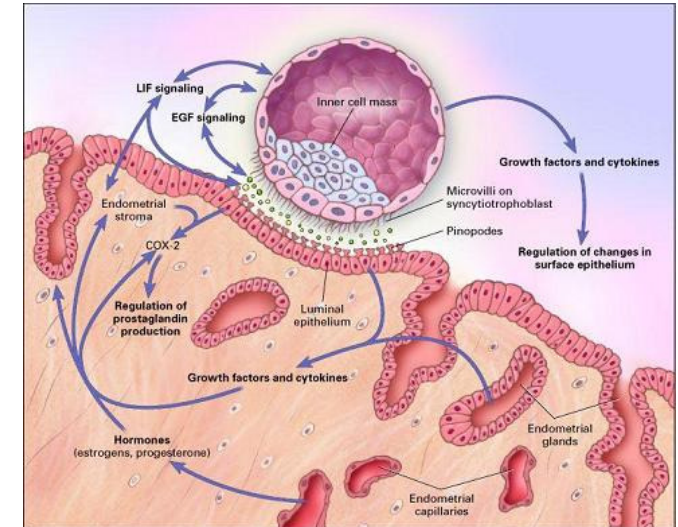
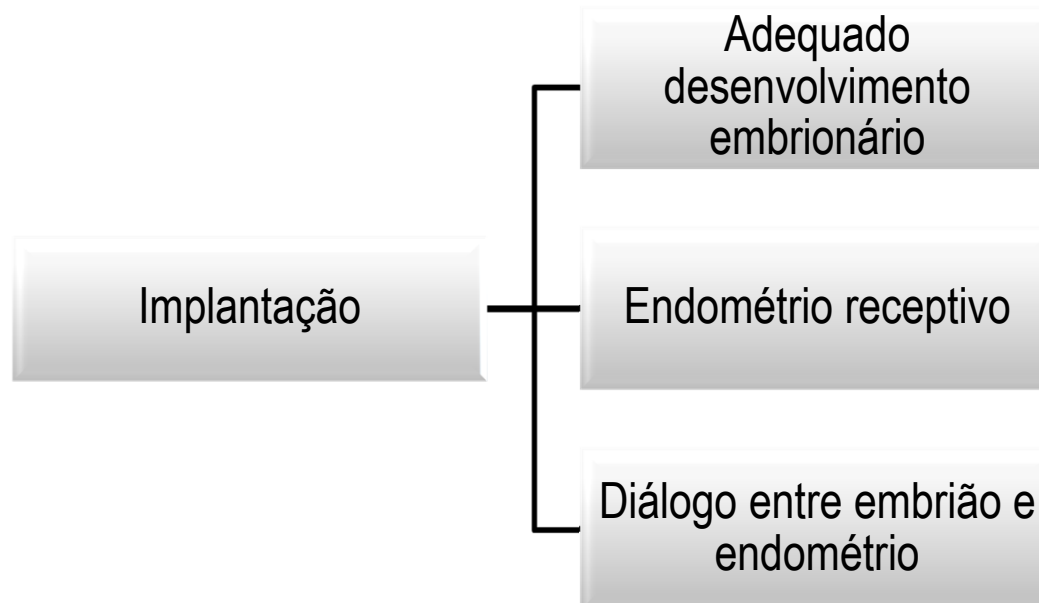
<sup>4</sup>Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA – UNICAMP - Brasil

<sup>5</sup>Laboratório ThomSON de Espectrometria de Massas – Instituto de Química – UNICAMP - Brasil

- Perfil lipídico acessado por EM para identificar embriões capazes de atingir o estágio de blastocisto

# DISCUSSÃO

- Perfil lipídico acessado por EM para identificar blastocistos capazes de implantar
- Blastocistos capazes de levar a gestação e nascidos vivos
- Poder de predição não é totalmente conclusivo



Fonte: The cell

# DISCUSSÃO

- Transferidos blastocistos baseados na morfologia dos oócitos, embriões em dia 1, 2, 3 e 5



- Ainda assim, estratégia capaz de identificar lipídeos diferencialmente representados no meio de cultivo de blastocistos de boa qualidade que implantaram vs aqueles que não implantaram

# DISCUSSÃO



Caro

Robusto

Complicado

Difícil acesso

# CONCLUSÃO

## LIPIDÔMICA DO MEIO DE CULTIVO EM D3 POR EM

- Ferramenta rápida, confiável e não invasiva para predição dos embriões com melhor potencial de implantação;
- Usada como complemento à avaliação morfológica;
- Melhorando a chance de implantação e nascidos vivos, diminuindo a taxa gestações múltiplas.





**FERTILITY**<sup>®</sup>  
MEDICAL GROUP



[www.fertility.com.br](http://www.fertility.com.br)