

# MIR-142-3P AS A BIOMARKER OF BLASTOCYST IMPLANTATION FAILURE – A PILOT STUDY

Edson Borges Jr<sup>1</sup>; Amanda Setti Raize<sup>1</sup>, Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga<sup>1</sup>; Murilo Vieira Geraldo<sup>2</sup>; Rita de Cássia Sávio Figueira<sup>1</sup>; Assumpto Iaconelli Jr<sup>1</sup>

1



2



# INTRODUÇÃO

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

	ESHRE	ASRM	RED LARA
Gestação por aspiração(%)	29.9	35.0	30.2
Gestação / transferência (%)	30.9	43.2	33.5

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 e 2010

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

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

Tx de bebê em casa < 20,0%

# INTRODUÇÃO



The American College of  
Obstetricians and Gynecologists  
WOMEN'S HEALTH CARE PHYSICIANS

## COMMITTEE OPINION

Number 671 • September 2016

(Replaces Committee Opinion No. 324, November 2005)

### Committee on Obstetric Practice Committee on Genetics

*The American Society for Reproductive Medicine and the Society for Maternal-Fetal Medicine endorse this document. This Committee Opinion was developed by the American College of Obstetricians and Gynecologists' Committee on Obstetric Practice and the Committee on Genetics in collaboration with committee members James Summers, MD and Jeffrey L. Ecker, MD, and the U.S. Food and Drug Administration's representative member Rhonda Hearn-Stokes, MD. The views do not necessarily represent those of the Food and Drug Administration or the U.S. government.*

*This document reflects emerging clinical and scientific advances as of the date issued and is subject to change. The information should not be construed as dictating an exclusive course of treatment or procedure to be followed.*

## Perinatal Risks Associated With Assisted Reproductive Technology

RHA

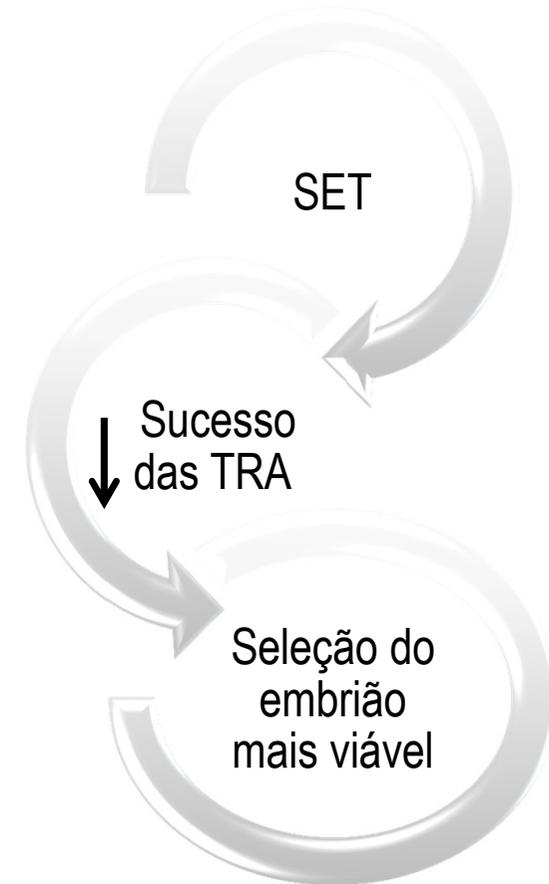
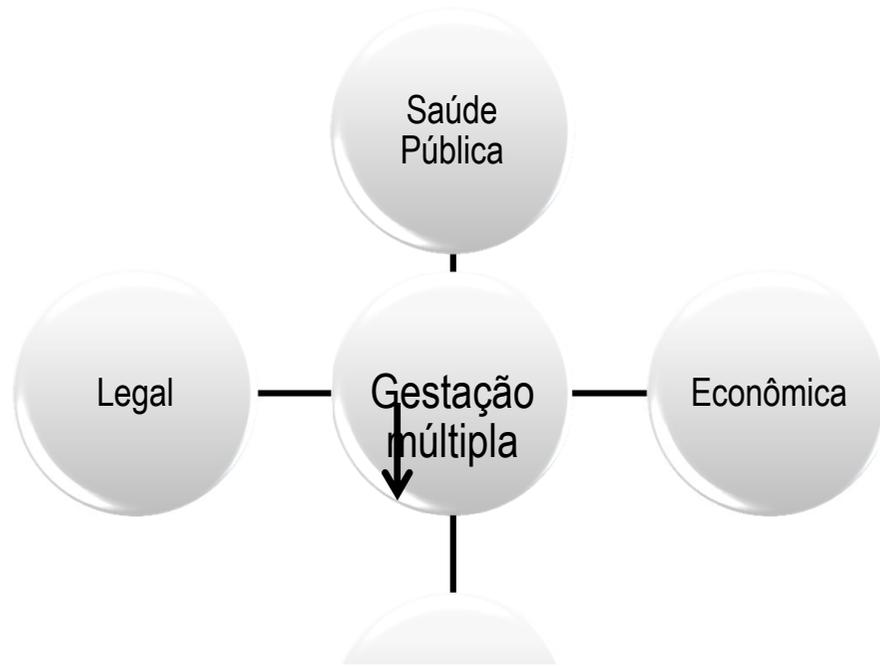
Gestações  
múltiplas:  
30 vezes  
mais risco

Baixa taxa de  
bebês em  
casa

Transferência  
de múltiplos  
embriões

Gestações  
múltiplas

# INTRODUÇÃO



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

# DISCUSSÃO

## Seleção do embrião mais viável para transferência

- Morfologia Estática
- Morfologia Dinâmica
- Cultura de Blastocistos

# INTRODUÇÃO

Parâmetros morfológicos avaliados pontualmente em microscopia de luz



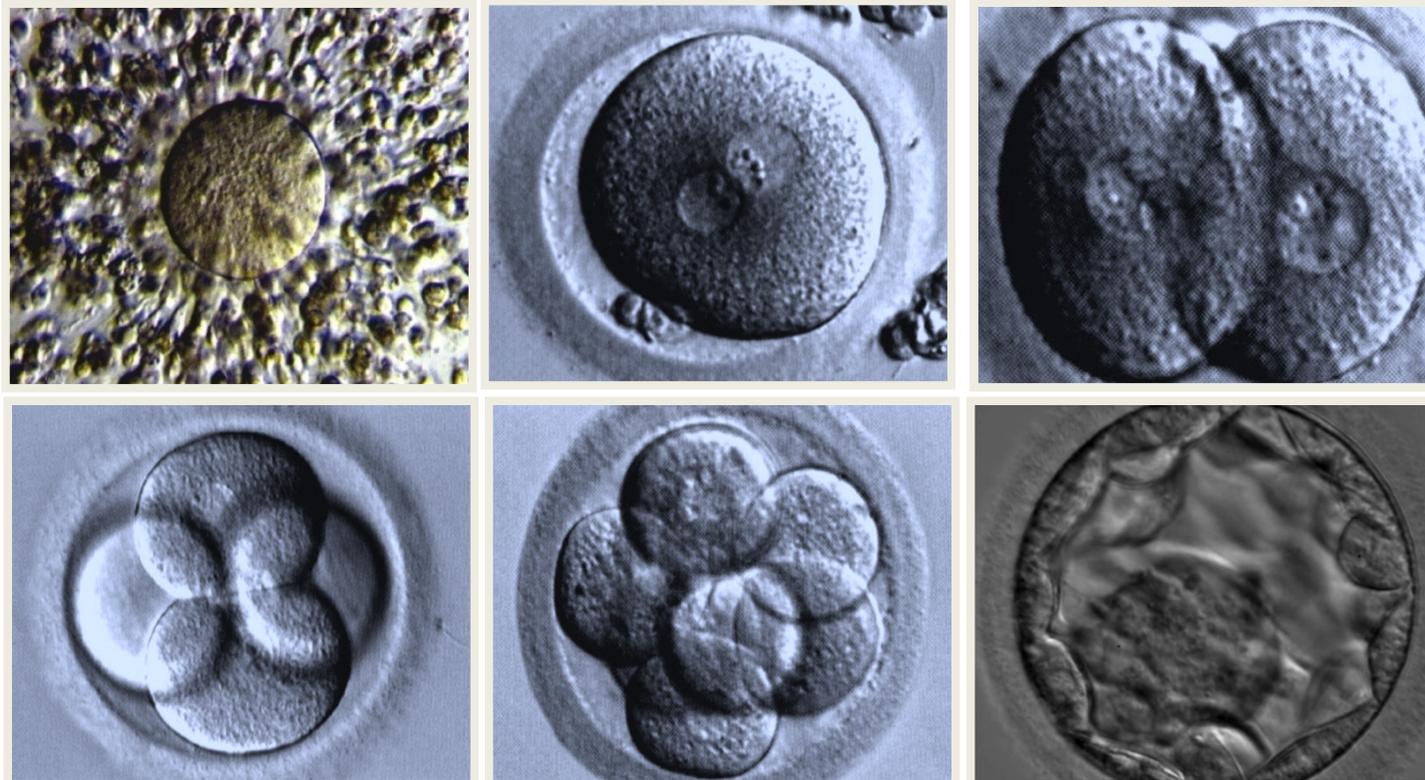
Subjetivo



Resultados contraditórios



Valor preditivo questionável



# INTRODUÇÃO

## Time lapse

Ferramenta não invasiva para selecionar o melhor embrião para transferência



Aquisição da imagem não é simples:

Equipamentos sofisticados e caros

Rienzi et al. 2010

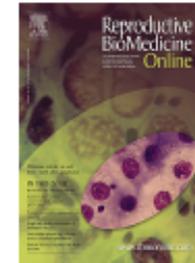
# INTRODUÇÃO

Reproductive BioMedicine Online (2014) 29, 156–158



ELSEVIER

www.sciencedirect.com  
www.rbmonline.com



COMMENTARY

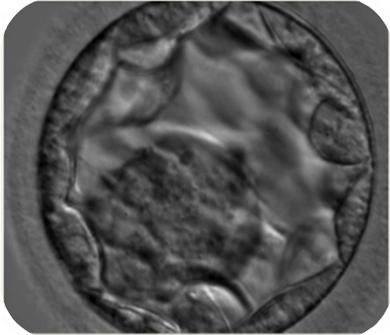
## Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multicentre outcome analysis



Kirstine Kirkegaard<sup>a,b,\*</sup>, Alison Campbell<sup>c</sup>, Inge Agerholm<sup>d</sup>,  
Ursula Bentin-Ley<sup>e</sup>, Anette Gabrielsen<sup>f</sup>, John Kirk<sup>g</sup>, Shabana Sayed<sup>h</sup>,  
Hans Jakob Ingerslev<sup>a,b</sup>

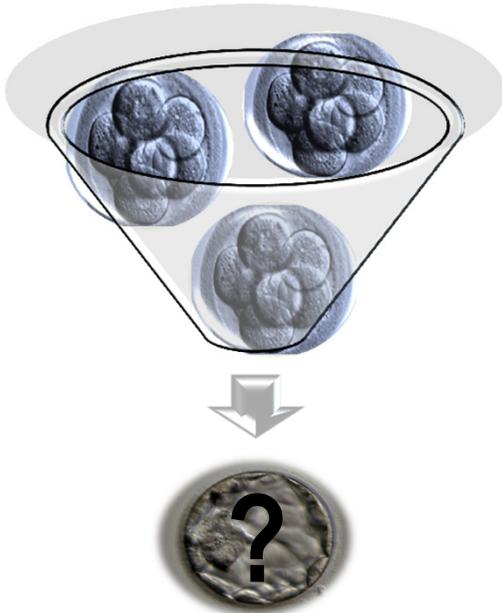
- Time Lapse: Baixa especificidade: descartando embriões com alto potencial de implantação

# INTRODUÇÃO



Cultivo estendido  
de embriões

- Expressão do genoma embrionário: maior potencial de implantação
- Laboratórios relutantes em adotar o cultivo estendido: Risco de cancelamentos
- Mais um blastocisto disponível para transferência: Qual transferir ?



Desenvolvimento de métodos não invasivos para  
determinação do blastocisto com maior potencial de  
implantação

**CRUCIAL**

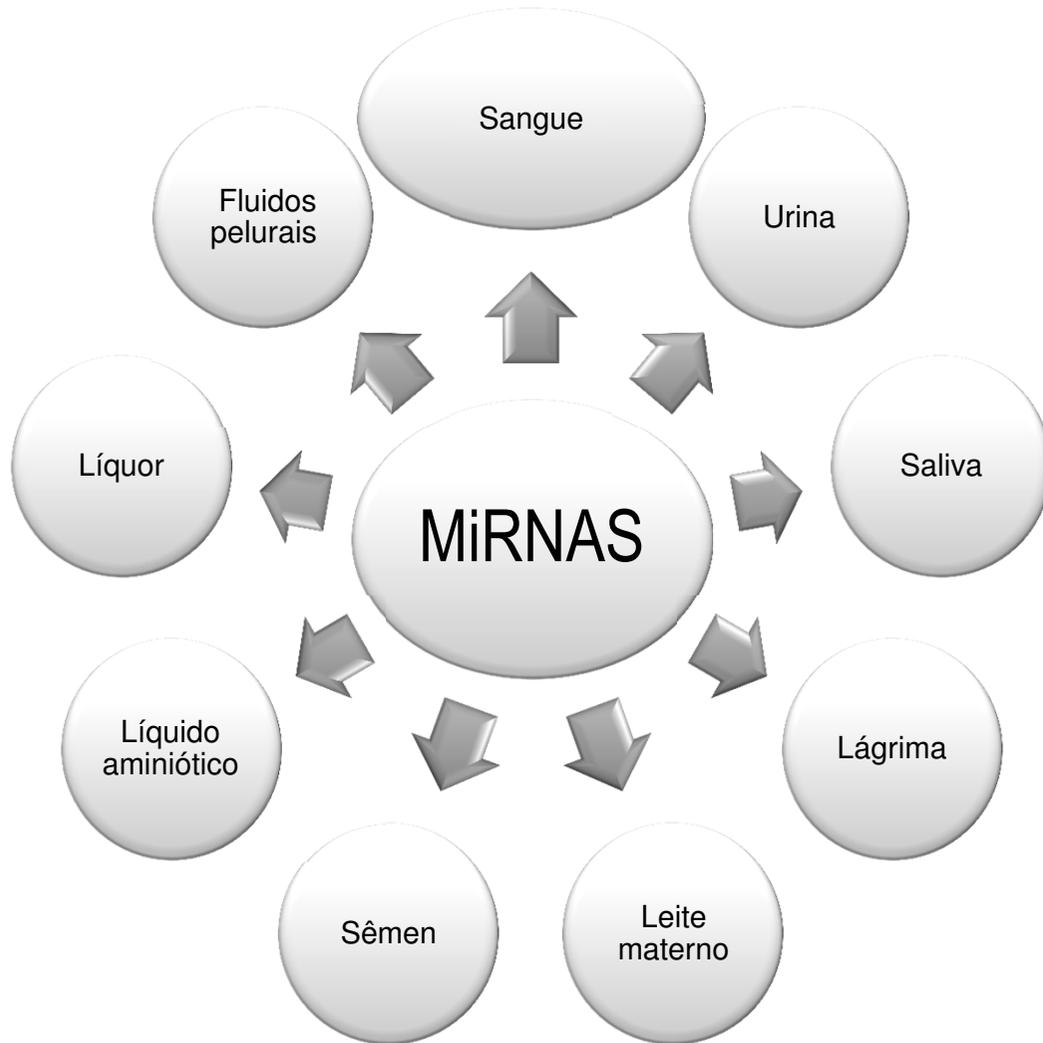
Development 138, 1653-1661 (2011) doi:10.1242/dev.056234  
© 2011. Published by The Company of Biologists Ltd

## Small RNAs in early mammalian development: from gametes to gastrulation

Nayoung Suh and Robert Blelloch\*

- Recentemente o papel dos miRNAs no desenvolvimento embrionário e potencial de implantação tem sido investigado
- MiRNAs: moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos
- MiRNAs: não codificadores de proteínas
- MiRNAs: potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica

# INTRODUÇÃO



MiRNAs: isolados de meio de cultivo de diferentes linhagens celulares

Wang et al. 2010, Wang et al. 2010, Weber et al. 2010

# INTRODUÇÃO

2500 miRNAs

(Laurent 2008, Carleton et al. 2007, Barbarotto et al. 2008, Sullivan and Ganem 2005, Tatsuguchi et al. 2007)

# INTRODUÇÃO

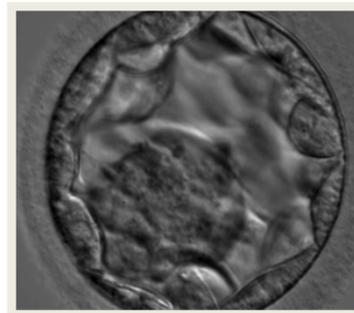
DEVELOPMENTAL DYNAMICS 237:2315–2327, 2008

RESEARCH ARTICLE

## Determination of microRNAs in Mouse Preimplantation Embryos by Microarray

Yanhong Yang,<sup>1</sup> Wentao Bai,<sup>2</sup> Liang Zhang,<sup>3</sup> Guowu Yin,<sup>1</sup> Xiaohong Wang,<sup>1</sup> Jun Wang,<sup>1</sup> Hongxi Zhao,<sup>1</sup> Yibing Han,<sup>4\*</sup> and Yuan-Qing Yao<sup>1,5\*</sup>

- MiRNAs: papel importante durante o desenvolvimento embrionário



# INTRODUÇÃO

## MicroRNA expression in the human blastocyst

Evan M. Rosenbluth, M.D.,<sup>a</sup> Dawne N. Shelton, Ph.D.,<sup>a</sup> Amy E. T. Sparks, Ph.D.,<sup>a</sup> Eric Devor, Ph.D.,<sup>a</sup> Lane Christenson, Ph.D.,<sup>b</sup> and Bradley J. Van Voorhis, M.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Obstetrics & Gynecology, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa; and <sup>b</sup> University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas

VOL. 99 NO. 3 / MARCH 1, 2013

Fertility and Sterility®



>130 MiRNAs expressos em blastocistos

# INTRODUÇÃO

## REPRODUCTIVE BIOLOGY

### Aberration of blastocyst microRNA expression is associated with human infertility

*Blair McCallie, B.Sc.,<sup>a</sup> William B. Schoolcraft, M.D.,<sup>b</sup> and Mandy G. Katz-Jaffe, Ph.D.<sup>a,b</sup>*

<sup>a</sup> Colorado Foundation for Fertility Research; and <sup>b</sup> Colorado Center for Reproductive Medicine,  
Lone Tree, Colorado

Fertility and Sterility® Vol. 93, No. 7, May 1, 2010



miRNAs em blastocistos de pacientes inférteis tem um perfil atípico

# INTRODUÇÃO

## Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation

Evan M. Rosenbluth, M.D., Dawne N. Shelton, Ph.D., Lindsay M. Wells, M.D., Amy E. T. Sparks, Ph.D., and Bradley J. Van Voorhis, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City, Iowa

**Fertility and Sterility**® Vol. 101, No. 5, May 2014 0015-0282/



Identificação e quantificação de miRNAs no meio de cultivo

Técnica promissora para determinação de biomarcadores de viabilidade embrionária

## OBJETIVO

Identificar miRNAs secretados por embriões no meio de cultivo como possíveis biomarcadores de implantação

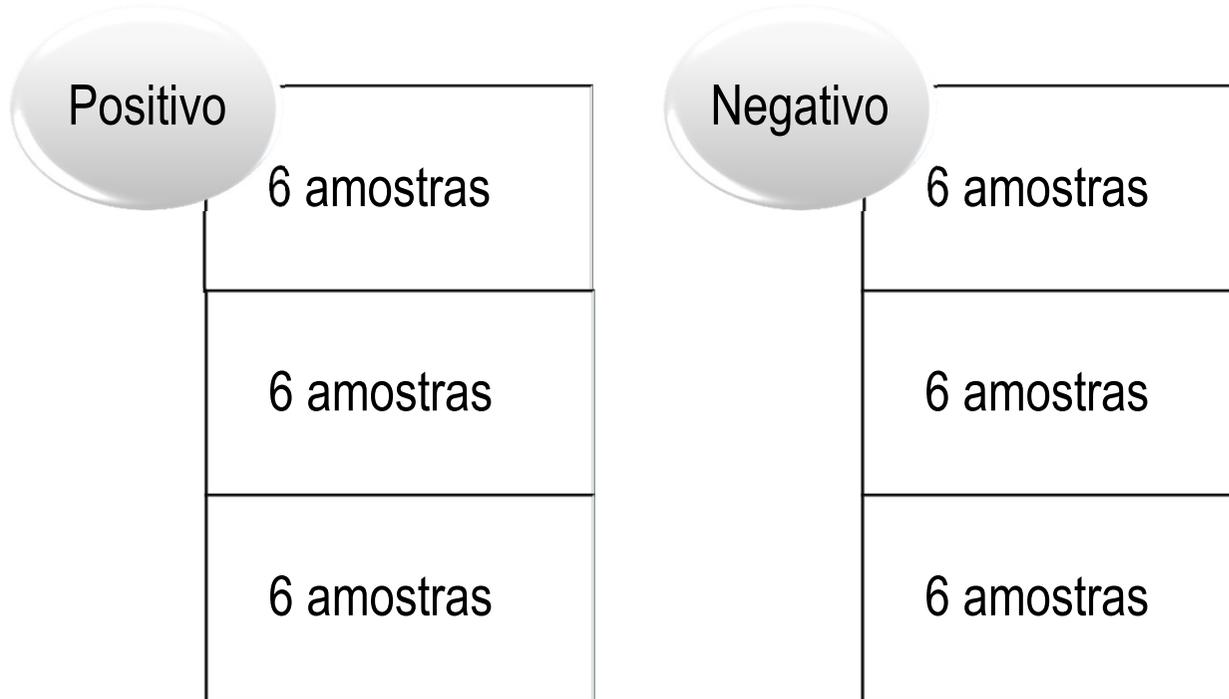
# MATERIAIS E MÉTODO

- DESENHO DO ESTUDO: PRIMEIRA ANÁLISE

Amostras de meio  
de cultivo de  
embriões em D3

# MATERIAIS E MÉTODO

- DESENHO DO ESTUDO: PRIMEIRA ANÁLISE



- Testados 7 miRNAs selecionados de acordo com a literatura
- Expressão comparada entre os grupos

# MATERIAIS E MÉTODO

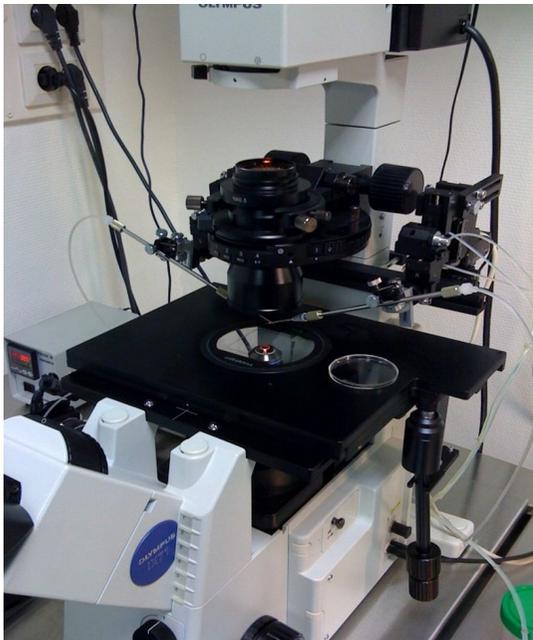
- DESENHO DO ESTUDO: SEGUNDA ANÁLISE

10 Amostras de meio de cultivo de embriões em D3

Testadas individualmente para a presença de miRNAs

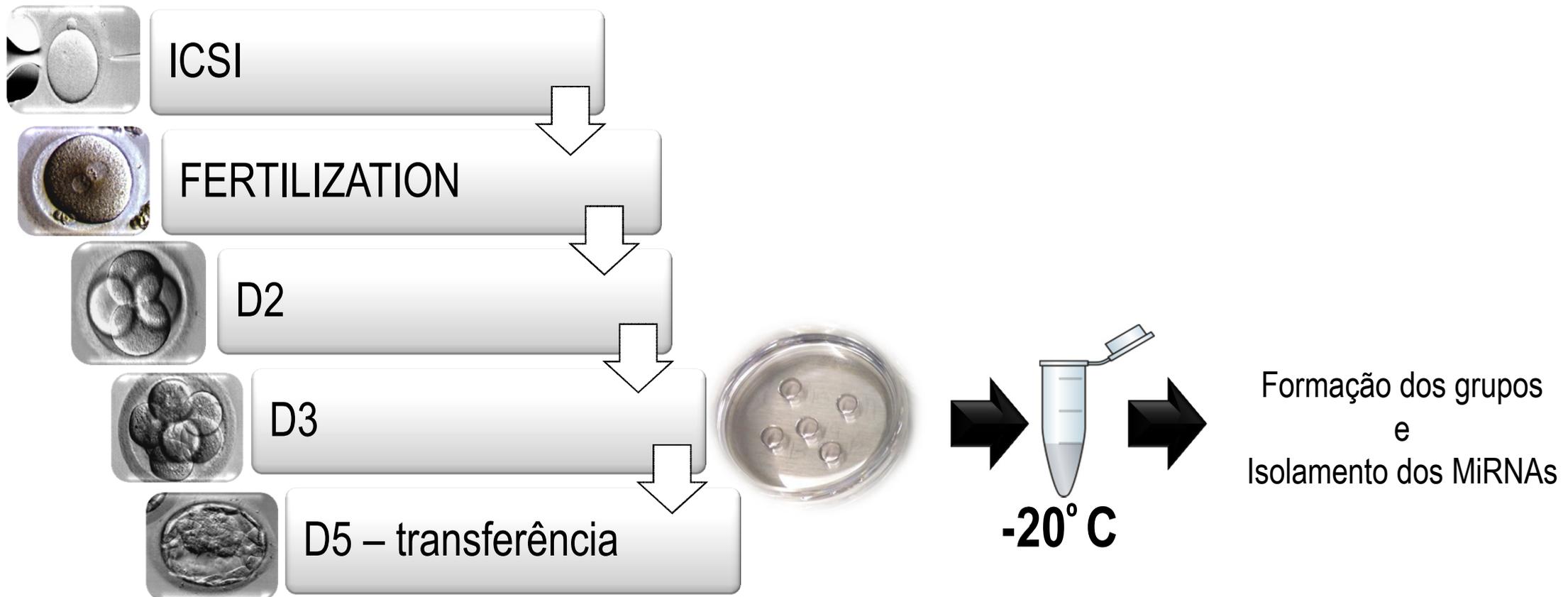
# MATERIAIS E MÉTODO

- 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

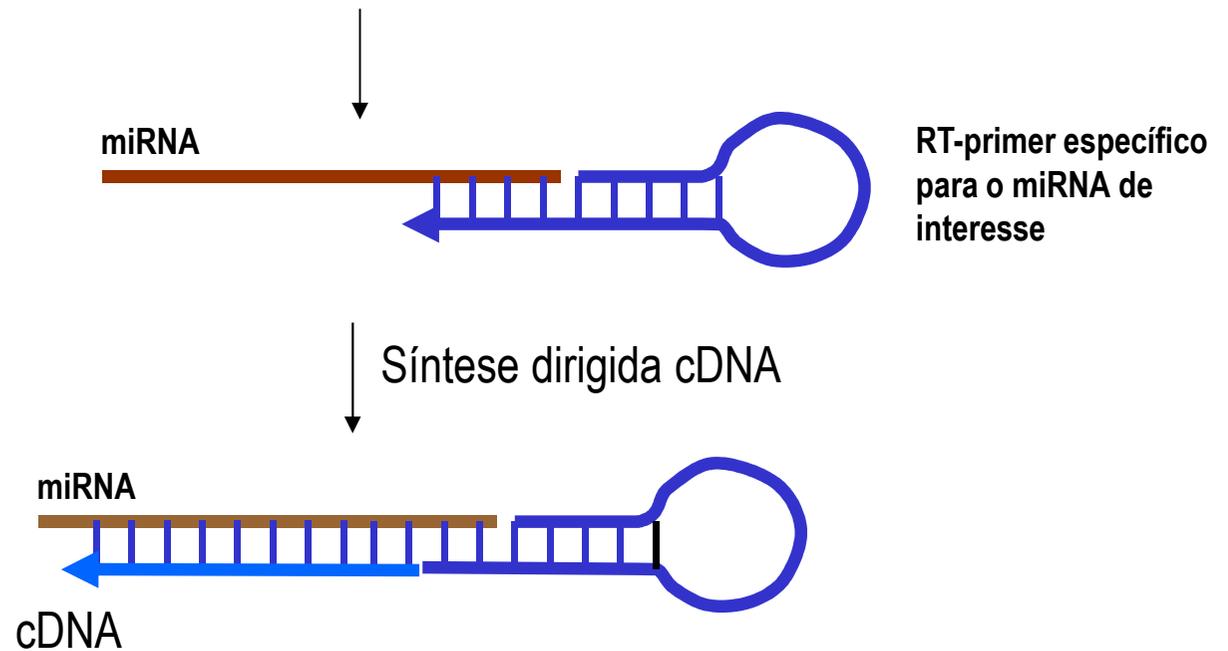
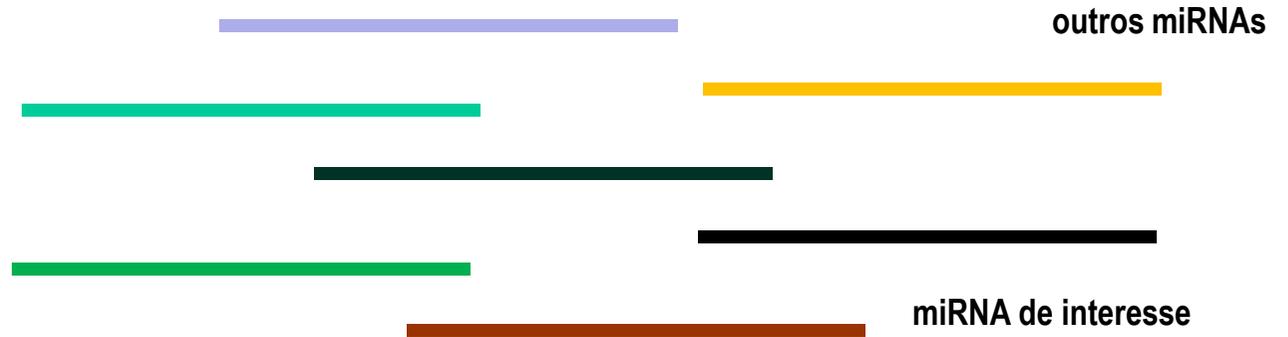


# MATERIAIS E MÉTODO

## • ISOLAMENTO E DETECÇÃO DOS MIRNAS

- Extração do RNA total com kit comercial

- Síntese de cDNA por transcrição reversa

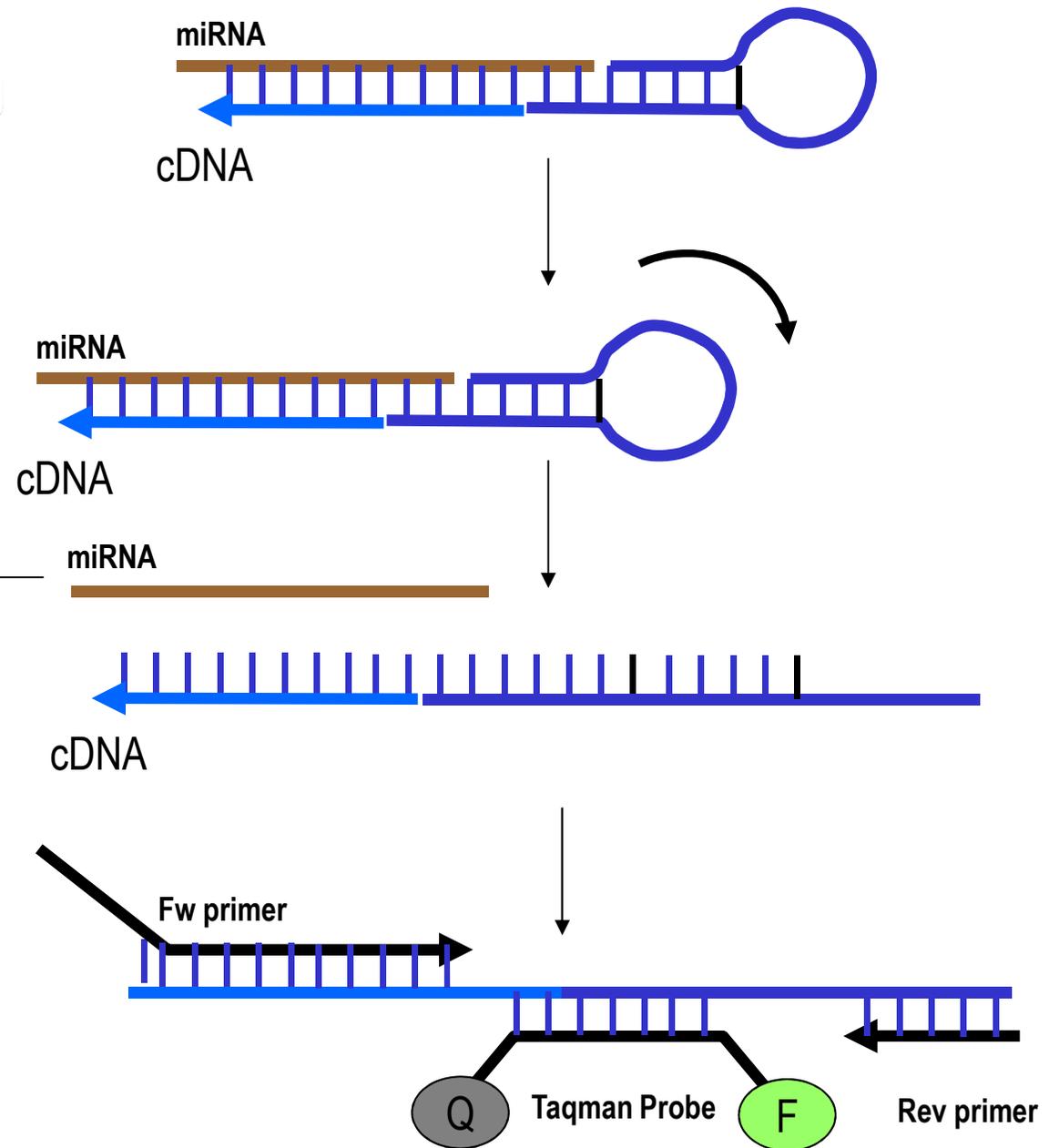


# MATERIAIS E MÉTODO

• Síntese de cDNA

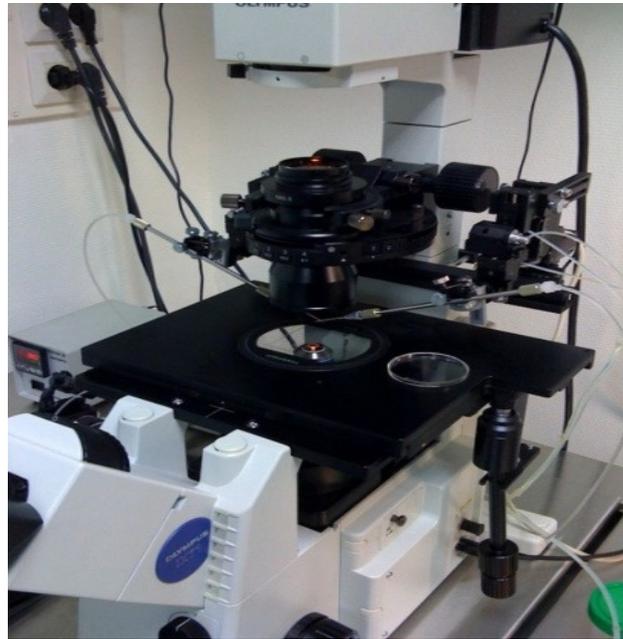
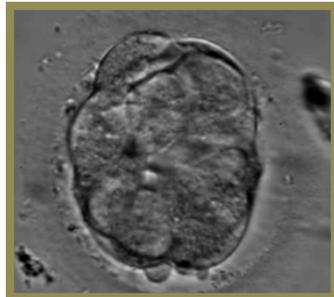
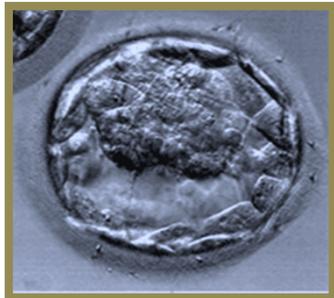
• Quantificação dos miRNAs em cada amostra

• PCR em Tempo Real

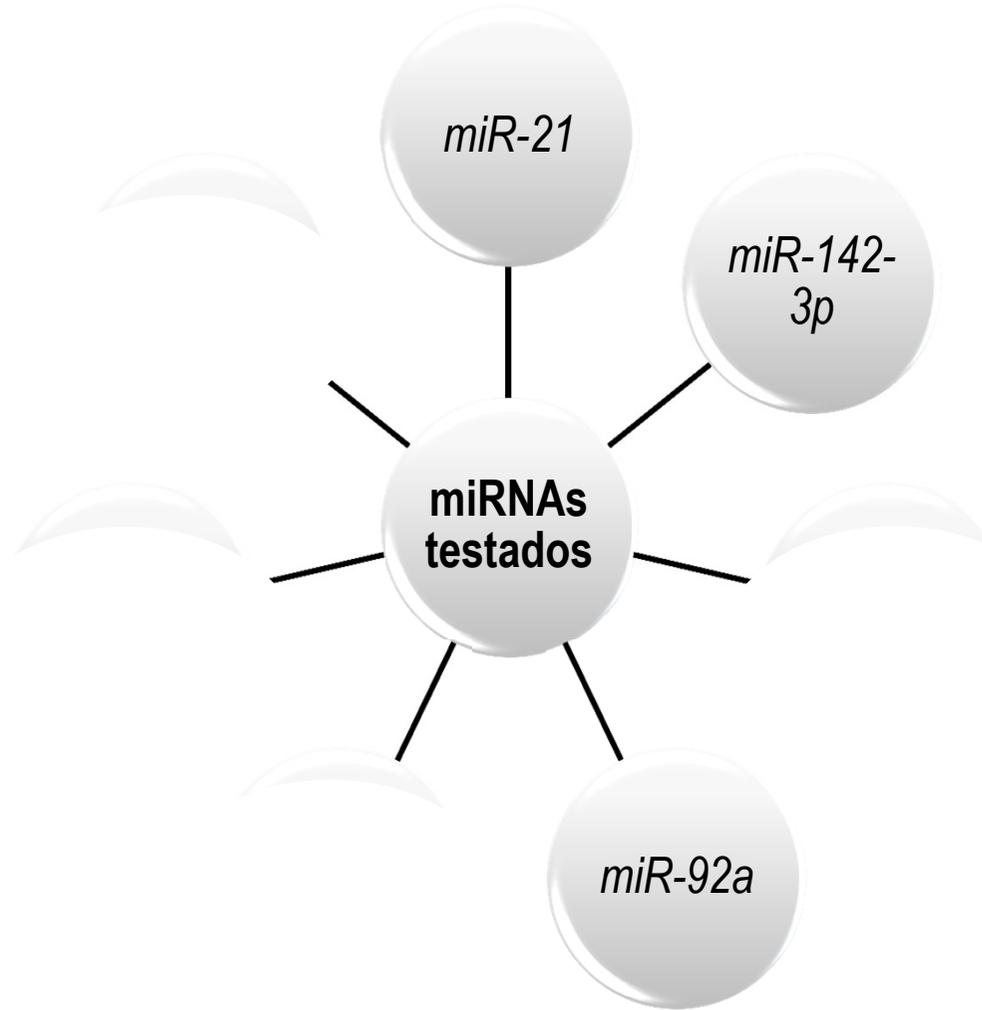


# MATERIAIS E MÉTODO

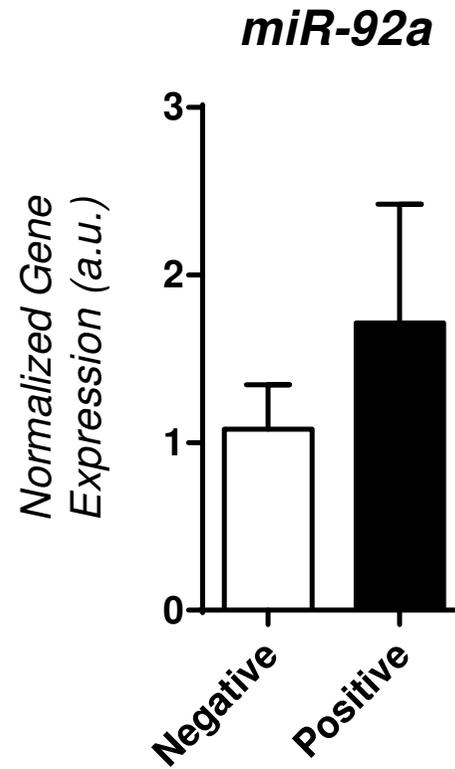
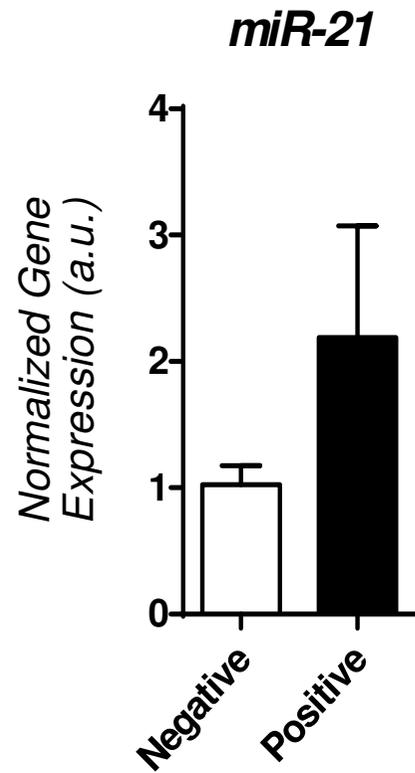
- AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA



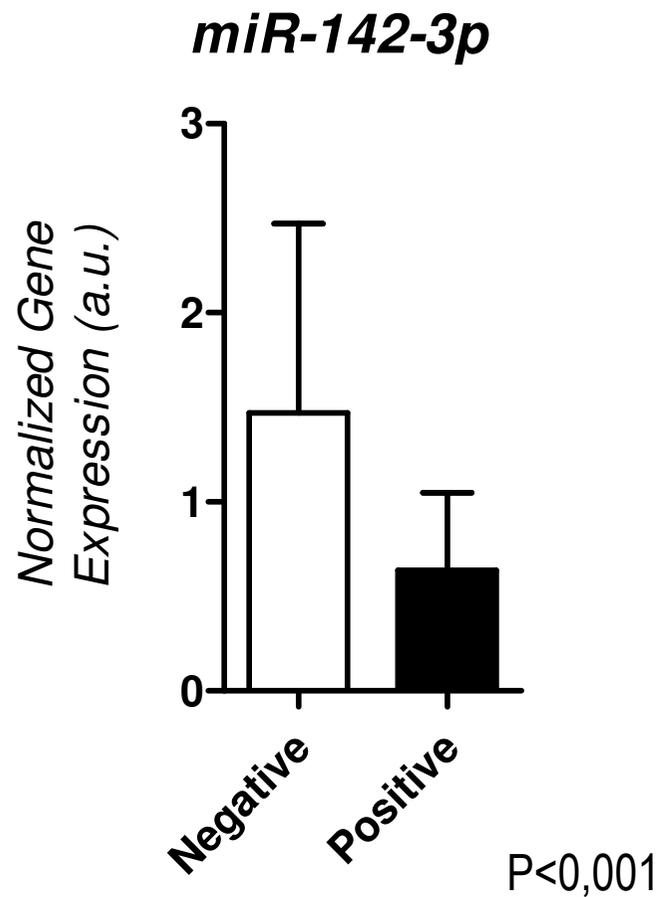
# RESULTADOS



# RESULTADOS



# RESULTADOS



10 amostras individuais de meio de cultivo



Amplificação específica de miRNAs, incluindo miR-142-3p

# DISCUSSÃO

- Importância miRNAs em gametas e início do desenvolvimento embrionário

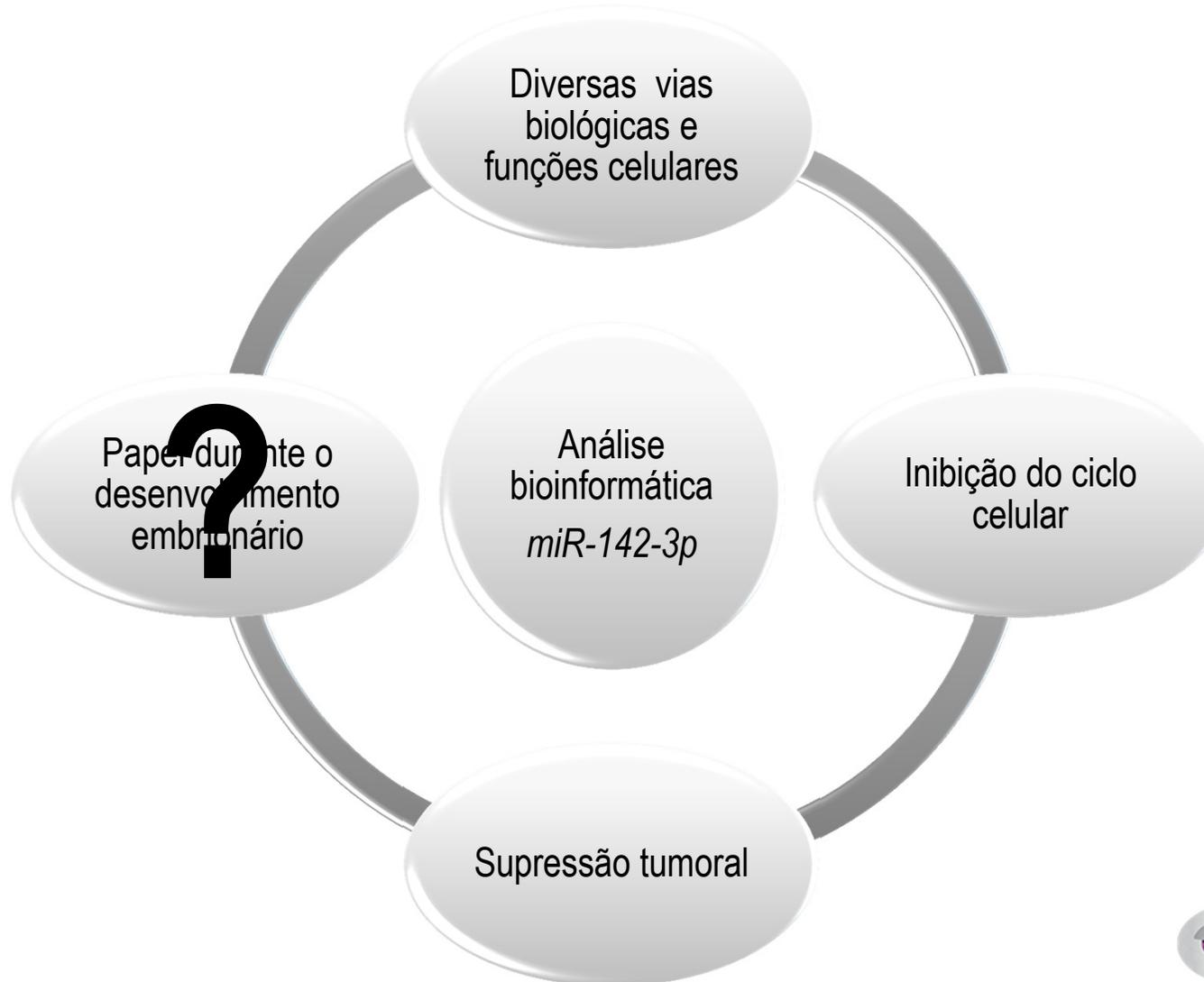


- Estudos a respeito da expressão de miRNAs no embrião humano são raros



# DISCUSSÃO

- Presente estudo: expressão do *miR-142-3p* associado a falha de implantação



### **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

- Acesso do perfil metabólico de embriões em meio de cultivo 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

- Acesso do perfil lipídico em meio de cultivo de embriões como ferramenta preditora de embriões capazes de atingir o estágio de blastocisto

# DISCUSSÃO

Biomarcador Ideal

Acesso não  
invasivo

Micro  
RNAs



Estáveis e  
resistem à  
degradação



PCR: sensível e  
segura



Não requer  
aparelhos caros  
ou robustos



(Capalbo et al., 2016)

# CONCLUSÃO

## Perspectivas

- Identificar a expressão diferencial de um miRNA, ou conjunto, no meio de cultivo individualmente, cuja expressão possa servir como marcador preditivo de implantação

## Determinação de miRNAS no meio de cultivo

- Fácil acesso, não requer equipamentos caros;
- Usada como complemento à avaliação morfológica;
- Ferramenta rápida, confiável e não invasiva para predição dos melhores embriões para transferência.



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



[dbraga@fertility.com.br](mailto:dbraga@fertility.com.br)