

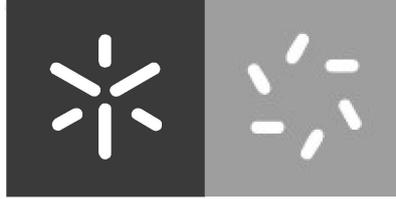


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luísa Cunha Oliani

**Quantificação de cell-free DNA
presente no fluido folicular de
mulheres submetidas a tratamentos
de procriação medicamente assistida
(PMA) e avaliação da relação com
fatores de infertilidade e sucesso do
tratamento**





Universidade do Minho
Escola de Ciências

Luísa Cunha Oliani

Quantificação de cell-free DNA presente no fluido folicular de mulheres submetidas a tratamentos de procriação medicamente assistida (PMA) e avaliação da relação com fatores de infertilidade e sucesso do tratamento

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação de
Doutora Ana Cristina Monteiro Ramalhinho
Doutora Andreia Ferreira Castro Gomes

DIREITOS DE AUTOR E CONDIÇÕES DE UTILIZAÇÃO DO TRABALHO POR TERCEIROS

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.



Atribuição-NãoComercial-SemDerivações
CC BY-NC-ND

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Agradecimentos

Realizar esta dissertação de Mestrado foi uma experiência verdadeiramente desafiadora e transformadora para mim, no entanto a conclusão da mesma não teria sido possível sem o apoio e orientação de várias pessoas.

Gostaria de deixar o meu primeiro obrigada à minha orientadora, Professora Doutora Ana Cristina Ramalhinho, por ter aceite este projeto e por todo o apoio e incentivo ao longo desta jornada. A sua orientação e o seu feedback constante foram imprescindíveis para a realização da presente investigação.

Um muito obrigada também à Mestre Maria Manuel Casteleiro, pela prestável disponibilidade em me ajudar a realizar qualquer ensaio e/ou resolver qualquer dúvida. Pela paciência, compreensão, e conhecimento transmitido.

À minha orientadora interna, Professora Doutora Andreia Castro Gomes, obrigada por toda a assistência prestada.

À Professora Doutora Luiza Grandeiro, por compartilhar do seu vasto conhecimento para a elucidação de diversos problemas.

Ao Professor Doutor Antônio Hélio Oliani e Professora Doutora Denise Oliani, obrigada por todas as oportunidades e suporte.

Por fim, deixo o meu último obrigada à minha família e amigos, por todos os carinhos, apoio, incentivo e oportunidades. Grata, especialmente, à minha família por todo o apoio económico, pelo encorajamento e toda a força que sempre me prestaram ao longo de toda a vida académica.

DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.

Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Quantificação de cell-free DNA presente no fluido folicular de mulheres submetidas a tratamentos de procriação medicamente assistida (PMA) e avaliação da relação com fatores de infertilidade e sucesso do tratamento

Resumo

A infertilidade conjugal é uma doença definida pela OMS como a ausência de gestação após 12 meses de relação sexual sem contraceptivo. As tecnologias médicas de diagnóstico e tratamento, como a procriação medicamente assistida (PMA) permitem, atualmente, respostas para os casais que vivenciam o problema da infertilidade, porém as taxas de sucesso ainda são consideradas baixas. Na tentativa de aumentar essas taxas, vários estudos estão sendo feitos com o objetivo de identificar novas técnicas, como o estudo de novos biomarcadores não invasivos que possam prever o prognóstico de FIV e melhorar a gestão da infertilidade feminina.

O cell-free DNA vem despertando bastante interesse como biomarcador não invasivos de diversas doenças, já sendo utilizado para o prognóstico de diversos tipos de cancro e complicações obstétricas, podendo ser detetados no sangue e em outros fluidos, sendo liberados de células necróticas e/ou apoptóticas. Sabendo da importância do fluido folicular (FF) para o crescimento e desenvolvimento do oócito, o cfDNA presente neste fluido tem sido visto como uma nova ferramenta para o desenvolvimento de biomarcadores.

Neste estudo, além de padronizar o método para a quantificação, foi investigado se os níveis de cfDNA presente em amostras de FF de mulheres submetidas a tratamentos de procriação medicamente assistida (PMA), podem estar relacionados com os fatores de infertilidade, número de oócitos recuperados e resultados da fertilização *in vitro* (FIV). Assim, 106 amostras (n=106) de FF foram recolhidas de mulheres submetidas a fertilização *in vitro* (FIV e ICSI). O cfDNA foi quantificado por amplificação da sequência ALU, por qPCR. Foi possível observar que o nível de cfDNA foi significativamente mais elevado em amostras de FF de mulheres que não conseguiram engravidar após o tratamento de PMA quando comparado aos níveis de cfDNA presente no FF de mulheres que tiveram sucesso com o tratamento através do diagnóstico de gravidez clínica (OR 3.098; 95% CI 1.137-8.439; p=0,02) e (OR 3.350; 95% CI 1.149-9.196; p=0,02).

Baseado nesses resultados podemos dizer o cfDNA pode constituir um promissor biomarcador para avaliar a qualidade do micro-ambiente folicular, podendo ser preditivo dos resultados da FIV, porém ainda se faz necessário uma otimização e padronização dos protocolos para a quantificação de cfDNA no fluido folicular bem como a realização de estudos mais amplos e aprofundados.

Palavras chave: cfDNA; Fluido Folicular; Infertilidade; FIV, Biomarcador.

Quantification of cell-free DNA present in the follicular fluid of patients undergoing assisted reproductive technology (ART) treatments and evaluation of the relationship with infertility factors and treatment success.

Abstract

Infertility is a disease defined by WHO as the absence of pregnancy after 12 months of sexual intercourse without contraception. Medical technologies of diagnosis and treatment, such as medically assisted procreation (MAP) currently provide answers for couples experiencing infertility, but success rates are still considered low. In an attempt to increase these rates, several studies are being done with the aim of identifying new techniques, such as the insertion of new non-invasive biomarkers that can predict the prognosis of IVF and improve the management of female infertility.

Cell-free DNA has been arousing much interest as a non-invasive biomarker of several diseases, already being used for the prognosis of several types of cancer and obstetric disorders, and can be detected in blood and other fluids, being released from necrotic and/or apoptotic cells. Knowing the importance of follicular fluid (FF) for oocyte growth and development, cfDNA present in this fluid is being seen as a new tool for biomarker development.

In this study, in addition to standardizing the method for quantification, it was investigated whether the levels of cfDNA present in FF samples from women undergoing medically assisted procreation (MAP) treatments, may be related to infertility factors, number of recovered oocytes and IVF results. Therefore, 106 samples (n=106) of FF were collected from women undergoing *in vitro* fertilization (IVF and ICSI) and then cfDNA was quantified by amplification of ALU sequence, by qPCR. It was observed that the level of cfDNA was significantly higher in FF samples from women who failed to become pregnant after PMA treatment when compared to the levels of cfDNA present in FF from women who were successful with treatment through clinical pregnancy diagnosis (OR 3,098; 95% CI 1,137-8,439; p=0.02) and (OR 3,350; 95% CI 1,149-9,196; p=0.02).

Based on these results, cfDNA may constitute a promising biomarker to evaluate the quality of the follicular microenvironment, thus predicting IVF results. However, it is still necessary to optimize and standardize protocols for the quantification of cfDNA in the follicular fluid, as well as to carry out broader and deeper studies.

Key words: cfDNA; Follicular Fluid; Infertility; IVF, Biomarker

Índice

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Infertilidade | 1 |
| 1.1.2 Fatores não patológicos da infertilidade | 2 |
| 1.1.3 Fatores Patológicos da Infertilidade | 3 |
| 1.2 Diagnóstico da Infertilidade..... | 5 |
| 1.3 Reserva Ovária | 5 |
| 1.4 Tratamentos e Técnicas de PMA..... | 6 |
| 1.4.1 Inseminação Intrauterina (IIU) | 7 |
| 1.4.2 Fertilização In Vitro (FIV) | 7 |
| 1.4.3 Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)..... | 8 |
| 1.5 Fluido Folicular | 8 |
| 1.6 Cell-free DNA..... | 9 |
| 1.6.1 Cell-free DNA no Fluido Folicular | 11 |
| 1.7 Problemas Biológicos e Objetivos Gerais | 13 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 2.1 Seleção da população estudada | 14 |
| 2.2 Fertilização in vitro e recolha de amostras de fluido folicular | 15 |
| 2.3. Preparação do Fluido Folicular | 15 |
| 2.4. Extração de cell-free DNA do fluido folicular | 16 |
| 2.5. Padronização de métodos para a quantificação de cell-free DNA proveniente do fluido folicular por ALU-qPCR..... | 16 |
| 2.6. Quantificação de cell-free DNA por ALU-qPCR..... | 17 |
| 2.7. Análise Estatística | 18 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 18 |
| 3.1 Características clínicopatológicas das mulheres submetidas ao tratamento de PMA.. | 18 |
| 3.1 Diferenças na concentração de cell-free DNA em pools de fluido folicular nos dois grupos de mulheres (casos e controlos) | 20 |
| 3.3 Relação entre a concentração de cell-free DNA do fluido folicular e o número de óocitos recuperados durante os tratamentos de PMA | 21 |
| 3.4 Valor preditivo de cell-free DNA em pools de fluido folicular para resultados clínicos de gravidez..... | 23 |
| 4. Conclusões e perspetivas futuras | 24 |
| 5. BIBLIOGRAFIA | 26 |

Lista de Acrónimos

AFC - Contagem de folículos antrais

AMH - Hormona Anti-Mulleriana

ASMR - American Society for Reproductive Medicine

CfDNA - *Cell-free* DNA

COS - Estimulação Ovária Controlada

DGPI - Diagnóstico Genético Pré-Implantação

DIP - Doença Inflamatória Pélvica

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FF - Fluido Folicular

FIV - Fertilização in vitro

FOP - Falência Ovariana Precoce

FSH - Hormona Foliculo-estimulante

GH - Hormona do Crescimento

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HSG - Histerosalpingografia

ICSI - Injeção Intracitoplasmática

IUI - Inseminação Intrauterina

IMC - Índice de Massa Corporal

LH - Hormona Luteinizante

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação de Cadeia de Polimerase

PK - Proteinase K

PMA - Procriação Medicamente Assistida

RH - Fator Rh

GnRH - Hormona Libertadora de Gonadotrofina

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

SOP - Síndrome dos Ovários Poliquísticos

UMR - Unidade de Medicina da Reprodução

β-hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana Beta

Lista de Figuras

- Figura 1** - Gráfico dos fatores patológicos que afetam a fertilidade de um casal. Adaptado de: Bayer e Alper, 2012. 3
- Figura 2** - Diferentes mecanismos de liberação de pequenos fragmentos de cfDNA na circulação por apoptose, necrose e secreção celular. Fonte: Oliveira e Hirata, 2018. 10
- Figura 3** - Origem dos ácidos nucleicos no sangue (cfDNA) por necrose ou apoptose. Adaptado de: Marzese et al., 2013. 11
- Figura 4** - Modelo esquemático que resume as relações significativas entre os níveis de cfDNA no fluido folicular humano (FF) e: duração da infertilidade, estado de reserva ovariana, estimulação ovariana, resposta ovariana à estimulação, desenvolvimento embrionário e resultados clínicos da gravidez, respetivamente. Adaptado de: Traver et al., 2015 12
- Figura 5** - Curvas de calibração para o ALU 247 nas diluições 10, 5, 1 e 0,5 ng/ml (A); 0,5, 0,25 e 0,1 ng/ml (B); 0,1, 0,01 e 0,001 pg/ml (C). **Erro! Marcador não definido.**
- Figura 6** - Curvas de calibração para o ALU 115 nas diluições 10, 5 e 1 ng/ml (A); 1, 0,5 e 0,25 ng/ml (B); 0,25, 0,1 e 0,01 ng/ml (C); 0,01, 0,001 e 0,0001 pg/ml (D). 16

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Características clínicas e estatísticas descritivas das mulheres submetidas a técnicas de PMA | 18 |
| Tabela 2 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de casos (n=88) e controlos (n=18) para ALU 115 (cutoff = 24,71) | 21 |
| Tabela 3 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de casos (n=88) e controlos (n=18) para ALU 247 (cutoff = 25.47) | 21 |
| Tabela 4 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de ≤ 6 oócitos aspirados (n=23) e >6 oócitos aspirados (n=83) para ALU 115 (cutoff = 24,71) | 22 |
| Tabela 5 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de ≤ 6 oócitos aspirados (n=23) e >6 oócitos aspirados (n=83) para ALU 247 (cutoff = 25,47) | 22 |
| Tabela 6 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos β -hCG positivo (n=38) e β -hCG negativo (n=46) para ALU 115 (cutoff = 24,71) | 23 |
| Tabela 7 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos β -hCG positivo (n=38) e β -hCG negativo (n=46) para ALU 247 (cutoff = 25,47) | 24 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infertilidade

A infertilidade é definida como uma doença do sistema reprodutor masculino ou feminino caracterizada pela incapacidade de alcançar uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares desprotegidas (OMS, 2018). No sistema reprodutor feminino, a infertilidade pode ser causada por uma série de anomalias dos ovários, útero, trompas, entre outros. Já no sistema reprodutor masculino, a infertilidade é mais comumente causada por problemas na ejeção do sêmen, ausência ou baixos níveis de esperma, ou anormalidade na forma e/ou movimento do espermatozoide (OMS, 2018). A infertilidade pode ser definida como primária, no qual engloba casais que nunca tiveram filhos e não conseguem atingir uma gravidez, e secundária, quando existe a incapacidade de conceber após uma gestação anterior (ASRM, 2013). As intervenções de fertilidade podem ser iniciadas em menos de um ano, com base na história médica, sexual e reprodutiva, idade e testes de diagnóstico (Zegers-Hochschild et al., 2017).

Essa doença é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2018) como um problema de saúde pública de grande relevância, uma vez que afeta não somente a capacidade reprodutiva do indivíduo, como também acresce significativas consequências sociais, económicas e demográficas. Estima-se que, a nível global, 48,5 milhões de casais tenham apresentado algum fator que leve à infertilidade (COSTA et al., 2016), dos quais 19,2% apresentam infertilidade primária e 29,3% apresentam infertilidade secundária (Mascarenhas et al., 2012).

A prevalência da infertilidade varia entre diferentes estudos. Isto provavelmente ocorre devido à utilização de definições inconsistentes e de ferramentas variáveis para o diagnóstico desta condição (Messini et al, 2016). Em algumas regiões do mundo, como nos países em desenvolvimento, a percentagem de casais inférteis pode atingir uma média de 30%. No entanto, recentemente, os efeitos do estilo de vida na saúde reprodutiva feminina receberam nova atenção. Peso corporal, composição corporal, atividade física e ingestão de nutrientes são fatores que podem afetar a fertilidade feminina (Fontana & Torre, 2016).

Em 2009 foi realizado um estudo com o objetivo de caracterizar a infertilidade em Portugal e segundo este, estima-se que, em Portugal, 15 a 20% dos casais em idade reprodutiva (cerca de 300 mil) sofra de infertilidade, sendo que apenas 43% a 48% das mulheres com infertilidade procuram ajuda médica, da qual apenas 25% recorrem a ciclos de reprodução medicamente assistida (Carvalho e Santos, 2009). Segundo os últimos dados disponíveis, em 2016 o número de crianças originadas em tratamentos

com PMA (Procriação Medicamente Assistida) representou cerca de 3% do total de crianças nascidas em Portugal.

O avanço da tecnologia médica trouxe esperança a muitos casais inférteis. Especialmente em países mais desenvolvidos. A introdução das técnicas de procriação medicamente assistida fez com que houvesse um avanço significativo no tratamento da infertilidade masculina e feminina. Desde o primeiro relato de uma criança concebida por FIV (Steptoe e Edwards, 1978), muitas outras tecnologias foram desenvolvidas.

1.1.2 Fatores não patológicos da infertilidade

Ao longo dos anos e com o aumento dos estudos na área da fertilidade humana, tornou-se essencial entender quais fatores podem levar a infertilidade e que tipo de tecnologia é adequada para casais que tenham causas conhecidas. As respostas a essas perguntas podem ajudar a solucionar os problemas do casal com mais rapidez e, conseqüentemente, a um custo menor (Cardona, 2013).

A idade é um fator decisivo para a fertilidade de um casal, afetando tanto membros femininos como masculinos. O pico da fertilidade feminina dá-se por volta dos 25 anos, sendo que a partir dos 35 anos, a capacidade de conceber diminui gradualmente, cessando quando a mulher atinge a menopausa. Isto acontece, pois à medida que as mulheres envelhecem, o processo de atresia folicular acelera, originando uma diminuição significativa no número e na qualidade dos ovócitos (Bayer, 2012a). Com a idade, a baixa qualidade ovocitária, reflete-se num risco maior de anomalias cromossômicas embrionárias, risco de morte fetal, aumento do risco de aborto espontâneo e gravidez ectópica. O excesso de peso também tem sido apontado como um fator não-patológico que contribui para a diminuição da fertilidade. Como consequência, tal condição pode afetar a função reprodutora feminina, estando relacionada com alterações da composição do fluido folicular, metabolismo e função ovocitária, podendo prejudicar a qualidade embrionária. (Valckx et al., 2014).

O consumo de drogas, tabaco e álcool, além de afetar a saúde geral de um indivíduo, pode ter também implicações na saúde reprodutiva, afetando negativamente tanto a fertilidade feminina, a nível de maturação do folículo e do transporte de embriões, quanto a fertilidade masculina, a nível de parâmetros espermáticos e seminais, por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), e disfunção erétil. (Dechanet et al., 2011; Rooney e Domar, 2014)

Acredita-se que o stresse também possa ter um impacto na fertilidade, ainda que seja difícil determinar seu mecanismo biológico, em grande parte devido à complexidade da sua definição e avaliação dentro da comunidade científica (Lynch et al., 2014). Além do stress, outro fator não-patológico

tem disso relatado ao logo dos anos, sendo ele a exposição a produtos químicos e poluentes, como pesticidas, poluentes atmosféricos, metais pesados e /ou radiação. Sabe-se que tais exposições levam a disrupções endócrinas, alterações nos parâmetros espermáticos e taxa de implantação reduzida (Sharma et al., 2013).

1.1.3 Fatores Patológicos da Infertilidade

São ditos fatores patológicos todos aqueles que envolvem anomalias anatômicas ou funcionais. Esses fatores afetam a função normal do sistema reprodutor masculino ou feminino, a capacidade de fertilização ou o progresso de uma gravidez. Cerca de 30% das causas de infertilidade em casais são causadas por fatores masculinos, enquanto 45% são causadas por fatores femininos e os 25% restantes são casos de infertilidade idiopática (Figura 1) (Bayer e Alper, 2012).

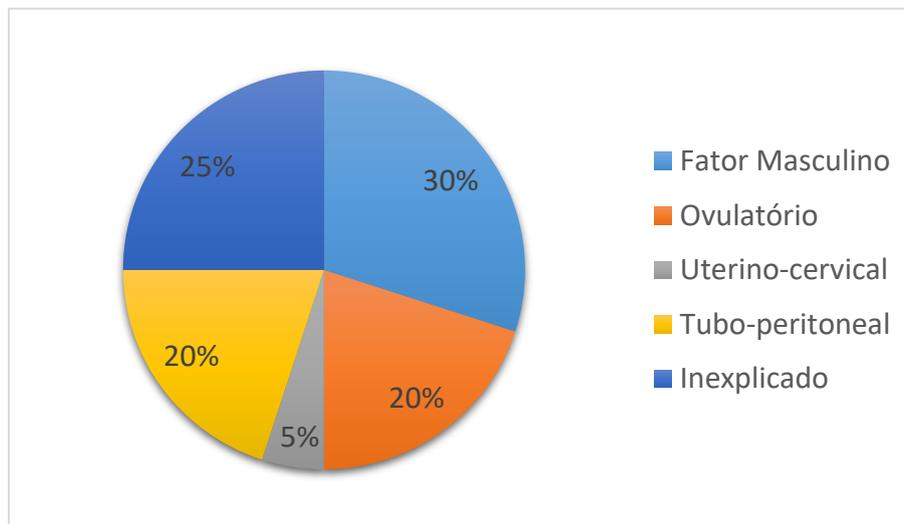


Figura 1 - Gráfico dos fatores patológicos que afetam a fertilidade de um casal. Adaptado de: Bayer e Alper, 2012.

Podem observar-se como fatores de infertilidade feminina: idade, fatores hormonais ovarianos, fatores tubulares peritoneais e uterinos, fatores imunológicos e genéticos. Dentre eles, a idade é o mais comum, seguido por fatores relacionados ao desequilíbrio hormonal, como ovário poliquístico, anovulação, amenorreia, endometriose e disfunção na produção de ovócitos de um modo geral. Em relação às trompas e ao útero, os fatores de infertilidade incluem infecção, endometriose, aderências, miomas, pólipos e alterações cervicais (Lima e Lourenço,2016).

Um dos principais fatores da infertilidade feminina está relacionado com disfunções ovulatórias. Tais disfunções normalmente resultam de défices hormonais, sobretudo de gonadotrofina, afetando assim o ciclo menstrual, sendo então caracterizada por ciclos menstruais irregulares e anovulação (Blundell, 2007). Tal patologia pode ser diagnosticada por medição dos níveis de gonadotrofinas ao

terceiro dia do ciclo. Os tratamentos da disfunção ovulatória geralmente são feitos com administração de suplementos hormonais, restabelecendo assim os níveis de LH e FSH (Bayer e Alper, 2012).

Uma das patologias mais comuns relacionadas à disfunção ovulatória é a Síndrome do Ovário Poliquístico (SOP), onde os quistos impedem a formação de ovócitos maduros ou mesmo a ovulação, pois, com a produção anormalmente elevada da LH e anormalmente baixa de FSH, os quistos crescem, ocupando o espaço livre necessário para o desenvolvimento do ovócito (Cardona, 2013). Tal síndrome é caracterizada pela apresentação de sintomas como obesidade, pilosidade aumentada, acne e/ou ciclos irregulares. As mulheres com ovários poliquísticos apresentam sinais e sintomas que levantam a sua suspeita, como obesidade, pilosidade aumentada, acne e/ou irregularidades menstruais (Rachoń e Teede, 2010). O risco de falha reprodutiva nestes casos não se deve unicamente a falhas na ovulação, mas também ao risco aumentado de parto prematuro, pré-eclampsia e diabetes gestacionais (Unuane et al., 2011). As disfunções ovulatórias incluem também, falência ovárica prematura, amenorreia hipotalâmica, hiperprolactinemia e anomalias da fase lútea (Costa, 2016).

A infertilidade feminina também pode ser causada por fatores tubo-peritoneais, que afetam cerca de 20% dos casais inférteis (Bayer e Alper, 2012). A causa mais comum de lesão tubária é a doença inflamatória pélvica (DIP), que se deve a uma infecção bacteriana do trato genital superior (Abrao et al., 2013). Tal patologia afeta principalmente mulheres jovens e sexualmente ativas, causando cicatrizes e consequente obstrução tubar, aumentando assim a probabilidade de desenvolver infertilidade (Gradison, 2012).

Cerca de 25% a 50% das mulheres inférteis sofrem de endometriose, uma patologia definida com uma doença inflamatória benigna estrogênio-dependente, sendo caracterizada pela presença de tecido endometrial ectópico (Macer e Taylor, 2012). Os sintomas associados à endometriose incluem dismenorreia, problemas intestinais, dor pélvica crônica, fadiga e infertilidade (Dunselman et al., 2014). Os casos menos graves desta doença têm um efeito mínimo sobre a fertilidade, porém, em casos mais graves, podem haver formações de aderências ou tecido cicatricial, tendo assim um impacto negativo e podendo levar a infertilidade.

Em alguns casos, a infertilidade do casal pode não ter um diagnóstico claro, seja ela feminina ou masculina. Nestes casos, o casal é diagnosticado com infertilidade idiopática. Apesar dos avanços nas técnicas de diagnóstico das causas da infertilidade, cerca de 25% dos casais inférteis sofrem de infertilidade idiopática (Bayer e Alper, 2012). Atualmente acredita-se que esses casos se devam a fatores moleculares que influenciam essencialmente no processo de fertilização e podem estar ligados à incompatibilidade bioquímica dos gametas do casal (Ray et al., 2012). Portanto, o diagnóstico da

infertilidade idiopática se dá por exclusão, pois decorre de uma ineficácia da avaliação médica do casal, demonstrando assim a importância do desenvolvimento e disponibilização de novos métodos diagnósticos para estes casos onde não é possível diagnosticar o fator de infertilidade com base nos procedimentos padrões.

1.2 Diagnóstico da Infertilidade

A avaliação da infertilidade é geralmente iniciada após um ano de relações sexuais regulares sem proteção em mulheres com menos de 35 anos de idade e após seis meses de relações sexuais sem proteção em mulheres com 35 anos de idade ou mais (Bayer e Alper, 2012). Contudo, a avaliação pode ser iniciada mais cedo em mulheres com ciclos menstruais irregulares ou fatores de risco conhecidos como fatores de infertilidade, tais como endometriose, histórico de doença inflamatória pélvica, ou malformações do trato reprodutivo (Kuohung, Hornstein e Barss, 2016).

O Comitê Prático da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015) divulgou diretrizes para padronizar a avaliação da infertilidade. Tais diretrizes incluem avaliação da ovulação, espermograma, histerossalpingografia (HSG), que é um exame ginecológico que utiliza raios x com contraste com o objetivo de identificar a condição do útero e das trompas, e, avaliação da reserva ovariana. Quando os resultados desta avaliação padronizada da infertilidade são normais, os especialistas podem atribuir um diagnóstico de infertilidade inexplicável. Embora haja uma variação nas estimativas, a possibilidade de que todos os resultados de tais testes apontem uma infertilidade inexplicável é de aproximadamente 15 a 30% (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015).

1.3 Reserva Ovárica

Reserva ovárica é um termo tradicionalmente utilizado para descrever especificamente o potencial reprodutivo da mulher, ou seja, o número e qualidade de oócitos que ela possui (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2015). O tamanho deste pool é instituído precocemente, ainda durante a vida fetal feminina. Ao nascimento, há aproximadamente 2 milhões de folículos primordiais, este número diminuiu durante a infância, resultando em cerca de 400.000 folículos primordiais na menarca, devido à atresia folicular natural. O declínio da fertilidade feminina está diretamente relacionado com o avanço da idade, quando uma mulher ultrapassa os 30 anos o ritmo de esgotamento dos oócitos começa a aumentar, quando se aproxima dos 40 anos o número de folículos decresce a aproximadamente 25.000, concomitantemente com um aumento significativo da taxa de abortos espontâneos (Tal e Seifer, 2017). Este fato decorre do envelhecimento ovariano, que leva à

diminuição gradativa do número e da qualidade do pool folicular, processo denominado de redução da reserva ovárica.

A avaliação da reserva ovárica possui uma grande importância no aconselhamento de mulheres inférteis, pois permite avaliar a probabilidade de sucesso do tratamento. Porém, os marcadores de reserva ovárica comumente utilizados servem apenas como um indicador da quantidade de oócitos (Tal e Seifer, 2017), como a ecografia transvaginal, que se tornou rotineira nos centros de reprodução assistida. Dentro da diversidade de testes e marcadores existem os doseamentos hormonais da hormona de estimulação folicular (FSH), da hormona luteinizante (LH), da hormona Anti-Mulleriana (AMH), do estradiol e da inibina B. (Kahapola et al., 2012; Dewailly et al., 2014), porém, assim como a contagem ultrassonográfica de folículos antrais, todos eles refletem apenas o aspecto quantitativo desta reserva, não sendo capazes de avaliar a qualidade da mesma, para a qual a idade continua a ser o melhor preditor (Tal e Seifer, 2017). Deste modo, pesquisas futuras são necessárias para aprimorar a confiança na análise da população folicular e de suas características.

1.4 Tratamentos e Técnicas de PMA

No sentido mais amplo, o termo Procriação Medicamente Assistida (PMA) abrange qualquer tratamento destinado a aumentar as hipóteses de concepção de casais com infertilidade (Cardona, 2013). Este termo refere-se a intervenções destinadas a auxiliar a fertilização, seja para casos em que a fertilização ocorre fora do corpo, como acontece na fertilização *in vitro* (FIV) e na microinjeção intracitoplasmática (ICSI), ou para casos em que se tem o objetivo apenas aproximar os espermatozoides do ovócito, como é o caso da inseminação artificial ou inseminação intrauterina (IIU) (Zegers-Hochschild et al., 2009).

Tendo em conta o fator de infertilidade, são determinados os tratamentos de PMA mais adequados, podendo recorrer-se a ciclos de inseminação intrauterina (IIU), fertilização *in vitro* (FIV) ou microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Os ciclos de PMA iniciam-se com um protocolo específico de estimulação ovárica e envolvem o processamento das amostras de gametas masculinos (Alper, 2012). À exceção da IIU, em que a fertilização dos oócitos acontece *in vivo* (Bayer, 2012b), após a estimulação hormonal controlada, é realizada a punção folicular para recolha dos múltiplos folículos, os quais, após avaliação da sua maturidade e qualidade, são inseminados. Os ovócitos corretamente fertilizados são mantidos em cultura embrionária e sujeitos a classificação diariamente, até ao momento da transferência intrauterina dos embriões selecionados (Alper, 2012).

1.4.1 Inseminação Intrauterina (IIU)

A inseminação intrauterina (IIU) é uma técnica que consiste na deposição de uma amostra de espermatozoides previamente selecionados diretamente na cavidade uterina por meio de um cateter de inseminação, sendo este um dos tratamentos de fertilidade mais comumente usados (Bayer, 2012b). Para casais que sofrem de infertilidade, este é um tratamento relativamente simples, sendo a técnica de PMA menos invasiva e mais econômica (Yang et al., 2016). Este procedimento visa promover mais facilmente o transporte de gâmetas masculinos ao longo do canal feminino até atingirem o ovócito, ultrapassando assim os obstáculos naturais. Portanto, a IIU é um tratamento indicado para fatores cervicais, ou fatores masculinos de disfunção ejaculatória e/ou sem comprometimento da qualidade dos espermatozoides, e é considerado como o tratamento de primeira linha para casos de infertilidade inexplicados (Bayer, 2012b).

1.4.2 Fertilização In Vitro (FIV)

A fertilização in vitro (FIV) convencional é considerada um dos avanços mais importantes na área da medicina reprodutiva. Desde o seu início, com o nascimento do primeiro “bebê proveta”, Louise Brown, em 1978, todos os passos dos protocolos de FIV foram aprimorados, tornando-a a técnica de PMA mais eficaz para o tratamento da infertilidade atualmente (Alper, 2012). Inicialmente tal técnica era usada no fator de infertilidade tubar, sendo atualmente utilizada em outras causas de infertilidade feminina, tais como anovulação, endometriose, síndrome do ovário poliquístico ou fator masculino não grave (Gianaroli et al., 2012). O objetivo da fertilização in vitro é reproduzir o processo de fertilização natural, para isso, o complexo cumulus-ovócito coletado é posto em contacto com os espermatozoides, desenvolvendo-se de forma natural até atingir o ovócito e penetrando ativamente através de suas camadas circundantes (Costa, 2016)

A taxa média de sucesso por cada ciclo de FIV depende do tipo e número de embriões transferidos, mas a transferência de blastocistos dá uma taxa de gravidez clínica de aproximadamente 60% (Costa et al., 2011). O tratamento de FIV deve ser realizado em conjunto com um programa apropriado de estimulação ovárica, a fim de obter vários folículos maduros em um único ciclo. Esse processo aumenta a probabilidade de sucesso da técnica porque permite um maior número de oócitos coletados, e assim aumentar a possibilidade de obter um número de embriões de alta qualidade e, portanto, maior a probabilidade de gravidez (Alper, 2012).

1.4.3 Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

Com o objetivo de melhorar o êxito da fertilização nos programas de FIV convencional, foram desenvolvidas práticas de micromanipulação de ovócitos, sendo que a grande evolução neste campo finalmente veio com a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, do inglês Intracytoplasmic Sperm Injection), sendo tal técnica descrita pela primeira vez por Palermo et al. em 1992. O procedimento consiste na microinjeção de um único espermatozoide, previamente selecionado, diretamente no citoplasma de um oócito com a ajuda de um microscópio invertido de platina aquecida e micropipetas (Costa et al., 2011), permitindo assim ultrapassar os acontecimentos naturais de fertilização, como a capacitação dos espermatozoides e posterior reação acrossômica, assim como a capacidade de penetração no ovócito (Alper, 2012).

A técnica de ICSI é utilizada em casos em que o procedimento de FIV convencional não produziu embriões, má morfologia ou baixo número oocitário, infertilidade masculina grave, ovócitos com zona pelúcida espessa e também em relatos de polispermia recorrente (Palermo et al., 2015). Além desta técnica ser altamente indicada para tais causas de infertilidade grave, a ICSI também é recomendada em alguns casos particulares, como casais em que um dos indivíduos sejam portadores de HIV, evitando assim a transmissão do vírus para o seu parceiro e descendentes; no caso de criopreservação de ovócitos; ou ainda em casos de diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) (Neri et al., 2012).

1.5 Fluido Folicular

O fluido folicular (FF) é o ambiente *in-vivo* dos oócitos que preenche a cavidade ou o antro de um folículo maduro, e contém metabolitos importantes para o crescimento e desenvolvimento de oócitos, tendo como as principais funções: controlar o crescimento folicular, regular a maturação do oócito e facilitar a captação e o transporte do oócito pelo oviduto (Fahiminiya e Gérard 2010). As concentrações hormonais presentes no FF influenciam a diferenciação dos oócitos de duas formas, direta (via ação genómica e não genómica) e indiretamente (através de células somáticas dentro dos folículos). As principais hormonas observadas no líquido folicular são a FSH, LH, hormona de crescimento (GH), a gonadotrofina coriônica humana (hCG), progesterona e estradiol e, em condições elevadas de hCG, FSH e LH, que beneficiam a maturação do oócito, correlacionado com a alta taxa de fertilização (Combelles, 2012).

Nos últimos anos, o FF ganhou um interesse crescente, uma vez que mantém uma relação íntima com o oócito, pode ser facilmente recolhido (sendo aspirado juntamente com oócitos durante procedimentos de FIV) e por sua composição ser um importante indicativo de qualidade oocitária e

embrionária, podendo representar uma fonte segura de novos biomarcadores que irão possibilitar a identificação e padronização de um método mais eficaz e não invasivo de qualidade oocitária (Wallace et al., 2012; Baka e Malamitsi-Puchner et al., 2006), podendo ser utilizados como instrumentos de prognóstico/diagnóstico suplementar na PMA.

1.6 Cell-free DNA

A presença de DNA livre (cell-free DNA – cfDNA ou circulating cell-free DNA - ccfDNA) no plasma humano foi descrita pela primeira vez em 1948 por Mendel e Metais (Mendel e Metais,1948). O cfDNA foi estudado em uma vasta gama de patologias, incluindo doenças inflamatórias, stress oxidativo e neoplasia, estando também presente em indivíduos saudáveis em menores concentrações no sangue que variam de 0 a 100 ng/ml, com uma média de 30 ng/ml (Huang,2006).

O cfDNA é caracterizado por fragmentos de DNA de cadeia dupla, não vinculado às células, presentes no plasma ou sêrum de humanos (Stroun,1987). A descoberta destes ácidos nucleicos livres no plasma trouxe diversas inovações em várias áreas da medicina, tornando-o um marcador com crescente interesse devido às suas aplicações clínicas, ampliando as possibilidades de diagnósticos e prognósticos não-invasivos (Wong,2013). Fluidos biológicos como sangue periférico, fluido cérebroespinal, urina, saliva, fluido folicular, entre outros podem ser utilizados em biópsia líquida para detecção e isolamento de cfDNA (Volik,2016; Scalici et. al 2014)

O DNA livre vem sendo amplamente aplicado, através da detecção específica do cfDNA libertado de tumores, como teste de diagnóstico em oncologia, podendo ser utilizado na monitorização da carga tumoral, detecção de doença residual mínima após cirurgia ou terapêutica e monitorização da resistência aos fármacos (Vasques, 2014). Alguns autores chamam esta técnica de “biópsia líquida” por não haver necessidade de excisar fragmentos de tecido, possibilitando a recolha de sucessivas amostras de sangue e consequentemente permitindo traçar alterações no cfDNA durante o tratamento da doença (Crowley,2013). Na área da medicina fetal, o cfDNA vem sendo aplicado no diagnóstico pré-natal não-invasivo, a sua análise na circulação sanguínea materna é altamente indicada para investigação não-invasiva das características genéticas do feto, determinação do sexo, determinação do fator RH, detecção de aneuploidias e teste de paternidade (Vasques, 2014).

A forma como o cfDNA é libertado na corrente sanguínea ainda é pouco conhecida. Estudos apontam que eventos celulares como necrose, apoptose e a secreção pelas próprias células determinam a quantidade de fragmentos de cfDNA, que podem ser libertados através de um mecanismo ativo ou passivo (Figura 2) (Diaz Jr., Bardeli, 2014); O DNA nuclear e mitocondrial podem ser libertados

passivamente no sangue a partir de células apoptóticas ou necróticas (Schwarzenbach et al., 2011), sendo em seguida fagocitados por macrófagos em indivíduos saudáveis, mantendo o nível basal de cfDNA baixo (Pisetsky e Fairhurst, 2007). O DNA circulante também pode ser libertado de forma ativa pelas células, levando a um aumento significativo no nível de cfDNA, sendo este caso observado em alguns cânceros e outras patologias graves (Gahan et al., 2012).

Células que sofrem morte celular programada (apoptose) são acompanhadas de uma deterioração fisiologicamente orquestrada do DNA genômico, a qual resulta em pequenos fragmentos (180-200 pares de base). Por outro lado, na necrose celular forma-se uma grande variedade de fragmentos com tamanhos diversos como consequência da digestão ao acaso (Figura 3) (Marzese et al., 2013)

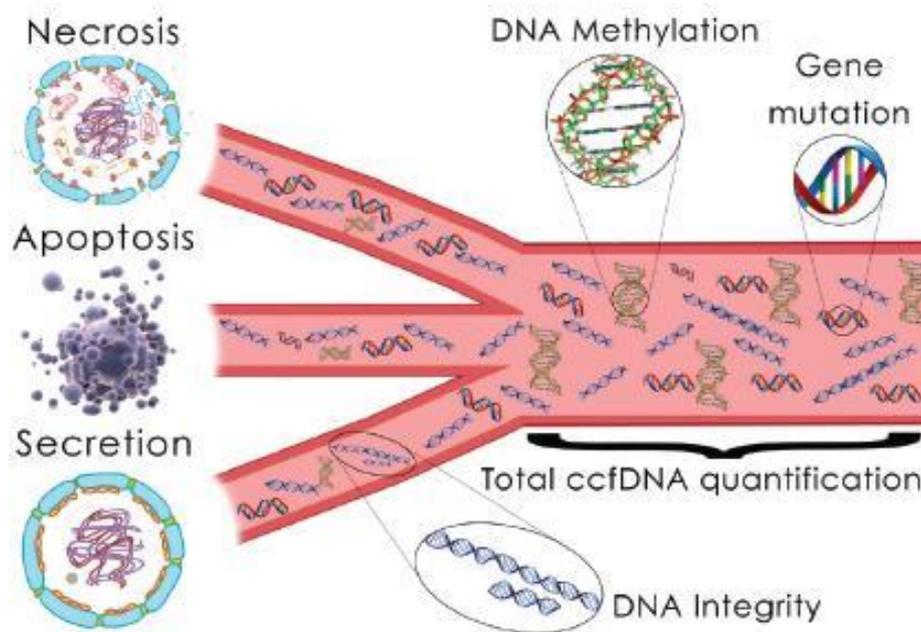


Figura 2 - Diferentes mecanismos de liberação de pequenos fragmentos de cfDNA na circulação por apoptose, necrose e secreção celular. Fonte: Oliveira e Hirata, 2018.

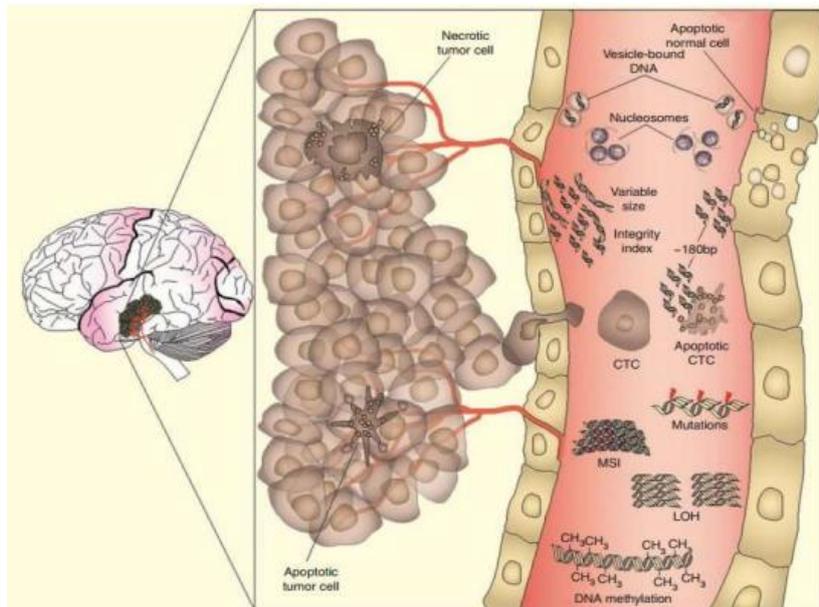


Figura 3 - Origem dos ácidos nucleicos no sangue (cfDNA) por necrose ou apoptose. Adaptado de: Marzese et al., 2013.

1.6.1 Cell-free DNA no Fluido Folicular

Diversos estudos já demonstraram que o fluido folicular, que circunda o oócito, está diretamente envolvido na maturação folicular, no crescimento do oócito e no seu desenvolvimento (Yanaiharu et al., 2007; Estes et al., 2009; Revelli et al., 2009). Por consequência, o FF está sendo visto como uma nova ferramenta para o desenvolvimento de biomarcadores, auxiliando no prognóstico e diagnóstico na área da medicina reprodutiva (Baka e Malamitsi-Puchner, 2006; Angelucci et al., 2006). Na Procriação Medicamente Assistida (PMA) a seleção de embriões com maior potencial de implantação é limitada dependendo apenas de critérios morfológicos, sendo recentemente descrito um novo método baseado em imagens do desenvolvimento embrionário em *time-lapse*, porém conta com diversas limitações (Herrero e Mesenguer, 2013) Assim como a seleção de embriões, a avaliação da reserva ovariana, que é uma ferramenta de grande importância na otimização de procedimentos na PMA, também é limitada, uma vez que os biomarcadores utilizados atualmente não são suficientemente fiáveis. Mostra-se assim necessário identificar novos biomarcadores que apresentem maior precisão, permitindo adaptar os tratamentos de PMA a cada mulher, tornando-os mais específicos e eficazes (Traver et al., 2015).

Sabendo destas limitações, Scalici et al, (2014) realizaram um estudo acerca da detecção e quantificação de cfDNA no fluido folicular, questionando-se se este poderia ser utilizado para o desenvolvimento de um teste prognóstico inovador para a avaliação da qualidade embrionária. Para isto, o nível e a integridade do cfDNA foi relacionado com o tamanho do folículo, com as características clínicas das mulheres submetidas a FIV ou ICSI e aos resultados da fertilização in vitro. Como resultado, Scalici et al., (2014) descobriram que níveis elevados de cfDNA em amostras de FF estavam correlacionados

com a má qualidade do embrião no terceiro dia de implantação (Figura 4), sugerindo que a quantificação do cfDNA tanto no fluido folicular como no soro poderia dar uma melhor previsão da qualidade do embrião, e poderia ser usada rotineiramente para além dos critérios morfológicos subjetivos.

Anteriormente, Czamanski-Cohen et al., (2013) já haviam relatado que o aumento dos níveis de cfDNA no plasma estava associado a baixas taxas de gravidez em mulheres submetidas a FIV (Figura 3). Sugerindo ainda que este alto nível, causado provavelmente por eventos apoptóticos de células maternas, poderia criar um ambiente hostil para a concepção. Posteriormente, o mesmo grupo mostrou que o stress causado pelo procedimento de FIV foi responsável pelo aumento do cfDNA no sangue das mulheres (Figura 4), onde técnicas de relaxamento ajudaram a reduzir significativamente os níveis de cfDNA no sangue, e, portanto, melhorar os resultados da FIV (Czamanski-Cohen et al., 2014).

Traver et al., (2015) investigaram se os níveis de cfDNA em amostras de fluido folicular de mulheres submetidas a FIV poderiam estar relacionados com o seu estado de reserva ovariana, protocolos de estimulação ovárica controlada (COS) e com os resultados da FIV. Foi observado que o nível de cfDNA era significativamente mais alto em amostras de FF de mulheres com doenças que afetam a reserva ovariana do que de mulheres com reserva ovariana normal (Figura 4). Os níveis de cfDNA também foram significativamente mais elevados em mulheres que receberam longa estimulação ovariana ou elevadas doses de gonadotrofinas (Figura 3). Também foi demonstrado que os níveis de cfDNA teve um valor preditivo significativo para o resultado de gravidez, com 88% de especificidade e 60% de sensibilidade (Figura 4).



Figura 4 - Modelo esquemático que resume as relações significativas entre os níveis de cfDNA no fluido folicular humano (FF) e: duração da infertilidade, estado de reserva ovariana, estimulação ovariana, resposta ovariana à estimulação, desenvolvimento embrionário e resultados clínicos da gravidez, respetivamente. Adaptado de: Traver et al., 2015

Sabendo-se que os níveis de cfDNA no fluido folicular variam entre as mulheres, vem se tornando cada vez mais frequente estudos com o objetivo de tentar relacioná-los com as taxas de sucesso dos tratamentos de PMA e com o desenvolvimento embrionário (Guan et al., 2017). Altos níveis de cell-free DNA indicam microambientes foliculares pobres e baixa qualidade embrionária durante os tratamentos de PMA, que está positivamente relacionado com a apoptose de células granulares (Guan et al., 2017). Em conjunto, esses resultados apontam para uma importante participação do cfDNA em diferentes eventos biológicos e patologias. Desta forma, torna-se pertinente compreender como essas moléculas atuam em diferentes distúrbios que afetam a fertilidade. Conseqüentemente, a identificação de novos biomarcadores que tenham uma maior precisão na avaliação da reserva ovariana e na resposta esperada aos tratamentos com gonadotrofinas pode contribuir para uma melhoria na personalização dos tratamentos de infertilidade e, por consequência, para o aumento do sucesso da FIV (Traver et al., 2015), onde a avaliação da concentração de cfDNA nas amostras de fluido folicular pode então funcionar como um biomarcador não invasivo da qualidade oocitária (Khan et al., 2020).

1.7 Problemas Biológicos e Objetivos Gerais

Na procriação medicamente assistida (PMA) as taxas de gravidez e de nascimento, após a tentativa de fertilização in vitro, são ainda muito baixas. Durante os procedimentos de FIV, o estado da reserva ovariana deve ser avaliado com o intuito de otimizar a resposta à estimulação ovárica controlada (COS), aumentando assim as chances de sucesso. Os biomarcadores atualmente utilizados para avaliar tal reserva, como a hormona antiMulleriana (AMH) e a contagem de folículos antrais (AFC) não são considerados suficientemente fiáveis para tais avaliações, bem como os parâmetros morfológicos subjetivos que continuam a ser os principais critérios de seleção de embriões saudáveis para procedimentos de FIV e ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoides). A identificação de novos biomarcadores que possuam uma maior precisão na avaliação da reserva ovariana é necessária para obter-se melhores resultados clínicos na PMA, aumentando o sucesso dos tratamentos através do aperfeiçoamento nos cuidados personalizados. Por conseguinte, muitos estudos recentes centraram-se na identificação destes novos biomarcadores não invasivos baseados na análise do microambiente de oócitos.

Fragments de DNA livre (cell-free DNA - cfDNA) podem ser encontrados na corrente sanguínea, originados de processos apoptóticos ou necróticos, sendo absorvido por macrófagos em indivíduos saudáveis, onde o nível basal de cfDNA é constantemente baixo. A sua quantificação tem sido utilizada

como biomarcador não invasivo para a descoberta precoce e/ou prognóstico de diversas doenças como cânceros, doenças ginecológicas e obstétricas, onde ocorre um aumento significativo nos níveis de cfDNA, podendo ser facilmente detetado em diversos fluidos corporais, incluindo sangue, saliva, urina e fluido folicular. O fluido folicular é importante para o desenvolvimento de oócitos e contém componentes e fatores plasmáticos secretados por células granulares durante a formação do folículo. Estudos anteriores confirmaram a presença de cfDNA no FF e a sua potencial utilização como biomarcador da qualidade do microambiente folicular, sendo necessário aprofundar a investigação nesta área e explorar as suas aplicações. Assim, este projeto de investigação teve como objetivos:

- i. Investigar e padronizar métodos para extração e quantificação de cell-free DNA proveniente do fluido folicular de mulheres submetidas aos tratamentos de PMA.
- ii. Quantificar e avaliar os níveis de cfDNA em pools de FF e investigar se os mesmos estão relacionados com o estado de reserva ovariana, fatores de infertilidade, protocolos de COS, resposta ovariana ao tratamento de estimulação, número e qualidade de embriões e ao sucesso do tratamento

Para tais objetivos, testou-se a efetividade de primers ALU 115/247 em diversas concentrações até atingir um resultado favorável para o estudo. Realizou-se a extração de cell-free DNA de fluidos foliculares provenientes de 103 mulheres submetidas ao tratamento de FIV/ICSI, seguida da quantificação por ALU-qPCR. Posteriormente os resultados foram relacionados com as características clínicas das mulheres que passaram por tratamentos de PMA para estabelecer possíveis relações com os níveis de cell-free DNA detetado nas amostras.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Seleção da população estudada

Foi realizado um estudo prospetivo que incluiu 106 mulheres submetidas a estimulação ovariana controlada e procedimentos de FIV (n=62), ICSI (n=41) ou FIV e ICSI (n=3) na Unidade de Medicina da Reprodução (UMR), no Hospital da Covilhã, Portugal. Foi obtido o consentimento informado por escrito para a utilização de amostras de fluido folicular no momento da colheita de oócitos e a Comissão de Ética local aprovou o estudo. As características das mulheres estão detalhadas na tabela 1. A média de idade das mulheres foi de $34,2 \pm 3,5$ anos (média \pm SD; variação: 19 a 39 anos) e um índice de massa corporal (IMC) de $23,9 \pm 3,8$ kg/m² média \pm SD; variação: 17 a 33 kg/m²). A duração da infertilidade foi de 4.3 ± 2.7 anos (média \pm SD). 90% dos casais foram considerados como tendo infertilidade

primária e 10% infertilidade secundária. Neste estudo, a infertilidade feminina foi a principal causa da consulta para 82% dos casais, a infertilidade mista para 10% e a infertilidade inexplicada para 8%. A reserva ovariana (baseada no nível hormonal anti-Mulleriano e na contagem de folículos antrais) era normal em 93% das mulheres. O estado hormonal basal foi avaliado em cada paciente no 3º dia do ciclo

2.2 Fertilização in vitro e recolha de amostras de fluido folicular

A resposta ovariana foi monitorizada através da medição da concentração sérica de 17 β -estradiol (E2) e da avaliação por ecografia transvaginal do crescimento folicular e endometrial. Quando pelo menos dois folículos tinham atingido um diâmetro de 17 mm ou mais, a ovulação foi induzida por uma única injeção de gonadotrofina coriônica humana. A recuperação dos ovócitos foi realizada por aspiração transvaginal guiada por ultra-som 36 horas após a injeção e cada folículo foi aspirado individualmente sem lavagem. Foram recolhidas amostras individuais de fluido folicular e os complexos de cumulus-oócito correspondentes foram isolados para procedimentos convencionais de FIV ou ICSI. Os oócitos eram considerados como normalmente fertilizados se dois pronúcleos e dois corpos polares fossem observados 18-20 h após microinjeção ou inseminação. A clivagem precoce foi verificada às 25 a 27 h após microinjeção ou inseminação.

Nos dias 2 e 3, a morfologia do embrião foi avaliada pela observação microscópica de critérios morfológicos, tais como número de blastómeros, regularidade dos blastómeros e taxa de fragmentação, a qualidade do embrião foi classificada de A a D. Embriões de qualidade superior (grau A e B) foi definido como um embrião com 4-5 ou 6-8 blastómeros regulares, no dia 2 ou 3, respetivamente, e contendo menos de 20% de fragmentos. No dia 3, os embriões de qualidade superior foram selecionados para transferência ou congelamento, enquanto os outros foram cultivados até ao dia 5 e congelados por vitrificação. Quatro semanas após a transferência, a gravidez clínica foi confirmada pela presença de pelo menos um saco gestacional e pela visualização da atividade cardíaca embrionária no exame ultrassónico.

2.3. Preparação do Fluido Folicular

Após a aspiração do FF de folículos individuais, as amostras foram reunidas em um volume de 15 ml, que foi centrifugado a 3000g durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados com filtros de 0,45 μ m de modo a eliminar detritos celulares e depois foram armazenados a -80°C até à quantificação cfDNA. Para este estudo foram recolhidas 106 amostras de FF.

2.4. Extração de cell-free DNA do fluido folicular

As amostras de fluido folicular foram preparadas para a quantificação de cfDNA, com base nos relatos de Umetani et al. (2006). 20µl de cada amostra de FF foi digerido com 16 µg proteinase K (PK) (Qiagen) em 20 µl de tampão (25 ml/l Tween 20, 50 mmol/l Tris e 1 mmol/l EDTA) a 50°C durante 20 minutos, seguido de inativação do PK e insolubilização a 95°C durante 5 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 10 000g durante 5 minutos, e em seguida os sobrenadantes foram removidos e armazenados a -80°C para a posterior quantificação do cfDNA (Umetani et al., 2006).

2.5. Padronização de métodos para a quantificação de cell-free DNA proveniente do fluido folicular por ALU-qPCR

A concentração de cfDNA nas amostras de FF foi determinada utilizando uma curva padrão obtida por diluições sucessivas de DNA genómico (Traver et al., 2015). As curvas padrão de ALU-247 e ALU-115 de DNA genómico com diluições em série de 10 ng a 0,0001 pg foram utilizados para determinar a concentração absoluta correspondente do ALU-247 e ALU-115 em cada amostra (Fig. 5a, b) (Umetani et al., 2006).

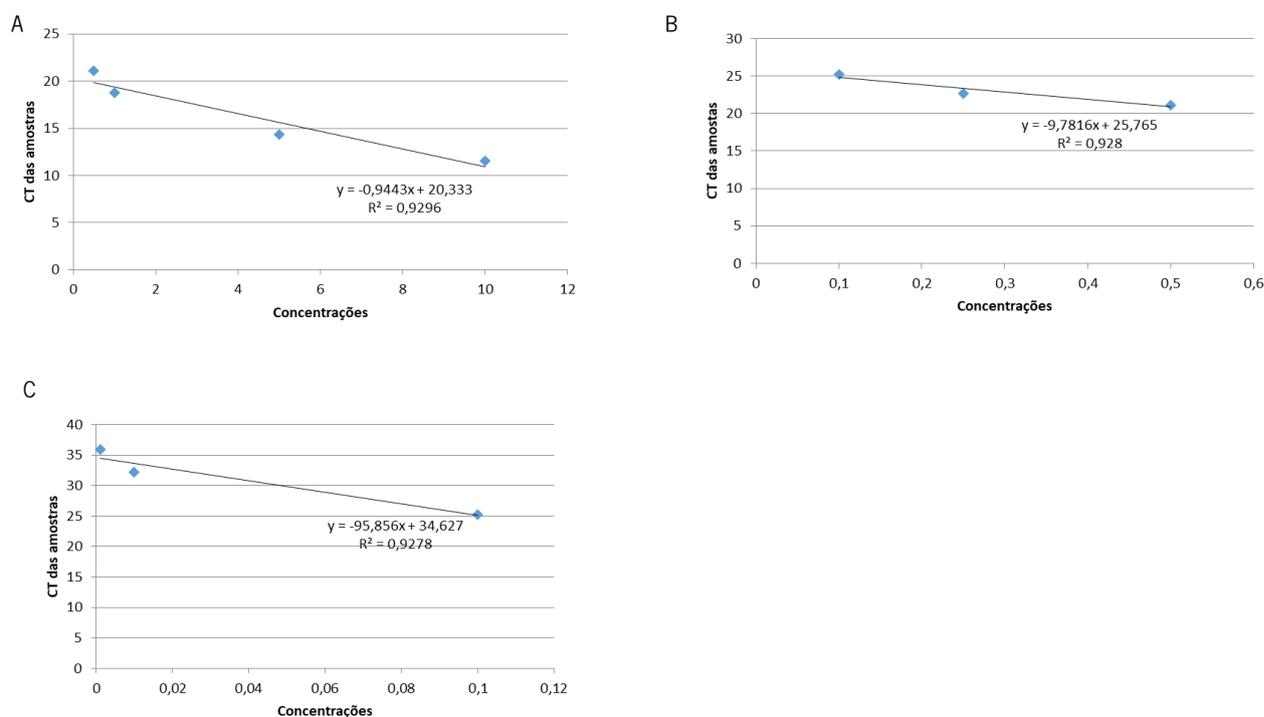


Figura 5 - Curvas de calibração para o ALU 247 nas diluições 10, 5, 1 e 0,5 ng/ml (A); 0,5, 0,25 e 0,1 ng/ml (B); 0,1, 0,01 e 0,001 pg/ml (C).

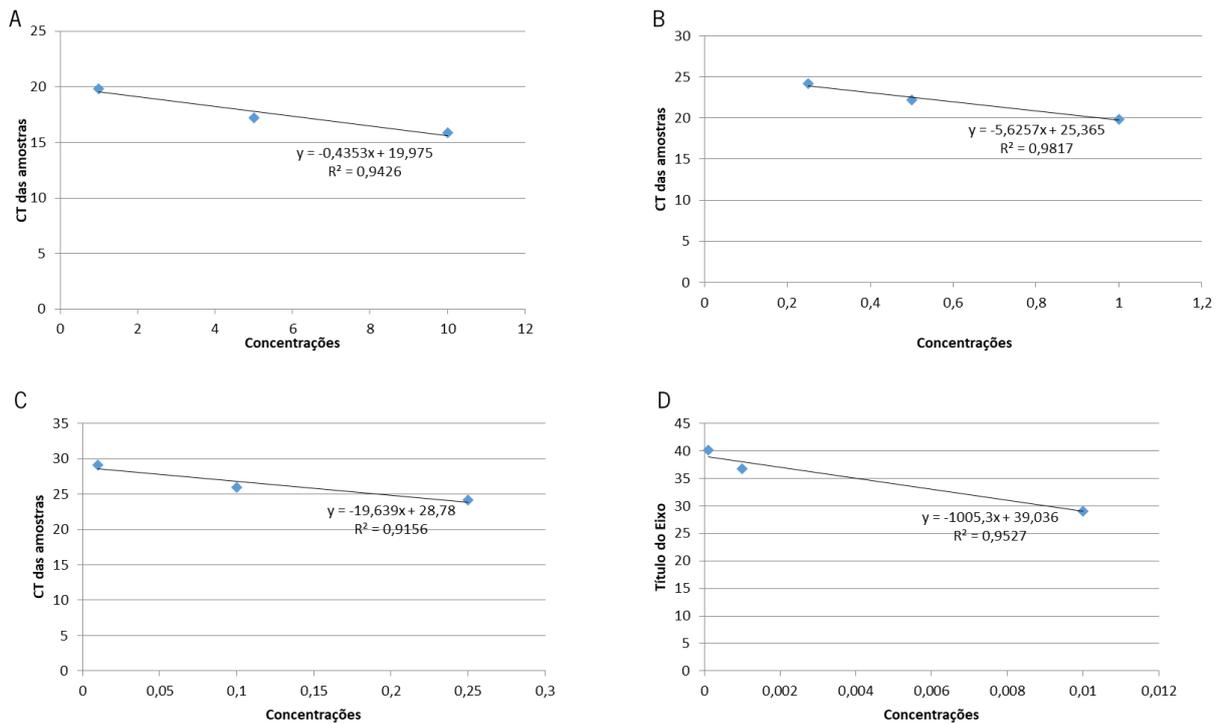


Figura 6 - Curvas de calibração para o ALU 115 nas diluições 10, 5 e 1 ng/ml (A); 1, 0,5 e 0,25 ng/ml (B); 0,25, 0,1 e 0,01 ng/ml (C); 0,01, 0,001 e 0,0001 pg/ml (D).

2.6. Quantificação de cell-free DNA por ALU-qPCR

Diversos testes foram realizados com diferentes concentrações de primers com o objetivo de otimizar os resultados. Cada reação de ALU-qPCR incluiu 1µl de fluido folicular digerido com PK e uma mistura reacional contendo 0,25 µM de primers forward e reverse e 10 µL de Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific). Um controlo negativo (sem template) foi adicionado em cada placa de qPCR e cada amostra de FF foi analisada em duplicado. As condições da PCR foram 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de anealing a 64°C e 30 segundos a 72°C. A determinação da concentração de cfDNA foi feita da mesma forma que descrito do ponto anterior (2.5).

Noutro trabalho do grupo de investigação, foi determinado o valor de cut-off para dividir as concentrações de cfDNA em “alta concentração” e “baixa concentração”, utilizando uma curva de ROC, que se baseia na escolha do valor mais adequado em especificidade e sensibilidade. No caso da concentração de cfDNA determinada pela amplificação da sequência ALU115, o valor de cut-off determinado foi 24,71 µg/µL. Para a concentração de cfDNA determinada pela amplificação da sequência ALU247, o valor de cut-off determinado foi 25,47 µg/µL.

2.7. Análise Estatística

O método de tabulação cruzada foi utilizado para definir a frequência conjunta dos valores das variáveis e o teste qui-quadrado de Pearson foi usado para analisar os dados de frequência conjunta e avaliar se as variáveis eram associadas ou independentes. Os dados foram analisados no SPSS (IBM) versão 20.0. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características clínicopatológicas das mulheres submetidas ao tratamento de PMA

Os dados fornecidos pela UMR apontam que o recurso ao tratamento de PMA é, em média, aproximadamente após 4 anos de infertilidade e numa idade média da mulher de 34,2 +/- 3,42 (Tabela 1). A média do índice de massa corporal (IMC) destas mulheres é de 24,1 kg/m², considerado normal. Enquanto à etnia, houve uma predominância de mulheres caucasianas (98,1%). A média da menarca foi de 12,3 anos. 74,5% das mulheres deste grupo de estudo nunca apresentaram hábitos tabágicos, 10,4% pararam de fumar e 15,1 % apresentaram hábitos tabágicos presentes (Tabela 1).

A maioria das mulheres estudadas não apresentam antecedentes obstétricos (96 mulheres com infertilidade primária), e dez mulheres sofrem de infertilidade secundária. Enquanto à etiologia da infertilidade nos casos selecionados, foi observado que, entre o grupo com fator feminino, 26% das mulheres foram diagnosticadas com alterações tubárias, 18% com endometriose, 37 % com Síndrome do Ovário Poliquístico (SOP) e 19% com Falência Ovariana Precoce (Tabela 1)

Tabela 1 - Características clínicas e estatísticas descritivas das mulheres submetidas a técnicas de PMA

| Variável | Média | n (total = 106) | Min-Max | SD |
|--------------------------|-------|--------------------|---------|------|
| Idade (anos) | 34.2 | - | 19 - 39 | 3.42 |
| ≤ 30 anos | | 14 | | |
| >30 anos | | 94 | | |
| IMC (kg/m ²) | 24.1 | - | 17 - 33 | 3.77 |
| ≤25 | | 70 | | |
| >25 | | 36 | | |
| Etnia | | - | | |
| Caucasiana (%) | | 104 (98.1) | | |
| Cigana (%) | | 1 (0.9) | | |
| Negra (%) | | 1 (0.9) | | |

| | | | | |
|-------------------------------|------|-----------|------------|------|
| Menarca | 12.3 | - | | 1.85 |
| ≤12 anos | | 63 (60.6) | | |
| 13-14 anos | | 30 (28.9) | | |
| ≥15 anos | | 11 (10.5) | | |
| Hábitos tabágicos | | - | | |
| Nunca | | 79 (74.5) | | |
| Anteriores | | 11 (10.4) | | |
| Presentes | | 16 (15.1) | | |
| Tempo de infertilidade (anos) | 4.3 | - | 1.5 - 16 | 4.7 |
| 2-4 | | 58 (54.7) | | |
| < 2 | | 5 (4.8) | | |
| > 4 | | 43 (40.5) | | |
| Etiologia da infertilidade | | - | | |
| Fator masculino | | 12 | | |
| Fator feminino | | 84 | | |
| Alterações tubárias (%) | | 22 (26) | | |
| Endometriose (%) | | 15 (18) | | |
| Disfunção ovulatória (%) | | 31 (37) | | |
| Fator uterino (%) | | 6 (19) | | |
| Infertilidade mista | | 11 | | |
| Infertilidade inexplicada | | 9 | | |
| Infertilidade primária | | 96 | | |
| Infertilidade secundária | | 10 | | |
| Avaliação basal | | | | |
| FSH (IU/l)* | 2.7 | | 0.1 - 13.4 | 2.8 |
| < 10 | | 2 | | |
| ≥ 10 | | 99 | | |
| LH (IU/l)* | 1.0 | | 0.0 - 8.6 | 2.0 |
| 3-5 | | 11 | | |
| < 3 | | 84 | | |
| > 5 | | 8 | | |
| E2 (pg/ml)* | 16.1 | | 9 - 224 | 27.7 |
| ≤ 45 | | 99 | | |
| > 45 | | 4 | | |
| AMH (ng/ml)* | 3.6 | | 0.1 - 27 | 4.1 |
| ≤ 1 | | 21 | | |

| | | | | |
|------|------|----|--------|-----|
| | > 1 | 82 | | |
| AFC* | 10 | | 3 - 25 | 4.4 |
| | < 10 | 43 | | |
| | ≥ 10 | 57 | | |

FF, fluido folicular

SD, desvio padrão

IMC, índice de massa corporal

FSH, hormona foliculo estimulante

LH, hormona luteinizante

E2, 17β-estradiol

AMH, hormona anti-Muleriana

AFC, contagem de foliculo antral

*Número total de mulheres < 106

3.1 Diferenças na concentração de cell-free DNA em pools de fluido folicular nos dois grupos de mulheres (casos e controlos)

A infertilidade afeta aproximadamente de 10 a 15 % dos casais, sendo que o componente masculino isolado é responsável por 30% das causas de infertilidade conjugal e, em associação com o fator feminino, por mais de 20% (Bayer e Alper, 2012). Neste estudo foram analisadas as concentrações de cfDNA em mulheres com patologias que provocam a infertilidade (casos) (n=88) e em mulheres saudáveis que foram seguidas em consulta de infertilidade e precisaram fazer tratamento de PMA devido a presença do fator masculino (controlos) (n=18).

A razão entre Q247/Q115 determinou-se para todas as amostras em estudo, sendo a média igual a 1,03 (SD:0,12), sugerindo que o cfDNA analisado é de origem necrótica. A tabela 2 mostra a distribuição de casos e controlos de acordo com as concentrações de cfDNA (qALU115). 29.6 % das amostras pertencentes aos casos e 33.3% dos controlos apresentaram baixas concentrações de cfDNA , enquanto que 70.4% dos casos e 66.7 dos controlos apresentaram altas concentrações de cfDNA. Na comparação entre os dois grupos, concluiu-se que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR 1,192; 95% CI 0,404-3,517; P>0,05)

A tabela 3 mostra a distribuição de casos (n= 88) e controlos (n=18) de acordo com as concentrações de cfDNA (qALU247). 21.6% das amostras pertencentes aos casos e 22.3% pertencentes

ao controlo apresentaram baixas concentrações de cfDNA, enquanto que 78.4 % dos casos e 77.7% dos controlos apresentaram altas concentrações de cfDNA. Pode-se observar que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR 1.038; 95% CI 0.306-3.521; P>0,05).

Tabela 2 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de casos (n=88) e controlos (n=18) para ALU 115 (cutoff = 24,71)

| | CONTROLOS | CASOS | OR | P-VALUE |
|------------------|------------------|--------------|---------------------|----------------|
| | N (%) | N (%) | (95% CI) | |
| TOTAL | 18 (100.0) | 88 (100.0) | | |
| <24.71 | 6 (33.3) | 26 (29.6) | 1.0 | |
| ≥ 24.71 | 12 (66.7) | 62 (70.4) | 1.192 (0,404-3,517) | 0,475 |

Tabela 3 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de casos (n=88) e controlos (n=18) para ALU 247 (cutoff = 25,47)

| | CONTROLOS | CASOS | OR | P-VALUE |
|-------------------|------------------|--------------|----------------------|----------------|
| | N (%) | N (%) | (95% CI) | |
| TOTAL | 18 (100.0) | 88 (100.0) | | |
| < 25.47 | 4 (22.3) | 19 (21.6) | 1.0 | |
| ≥ 25.47 | 14 (77.7) | 69 (78.4) | 1.038 (0.306.-3.521) | 0.585 |

3.3 Relação entre a concentração de cell-free DNA do fluido folicular e o número de oócitos recuperados durante os tratamentos de PMA

É amplamente conhecida a influência que o ambiente folicular tem sobre o desenvolvimento do oócito (Broekmans, 2014). Por isso foi avaliada a concentração de cell-free DNA nos pools de fluido folicular, e associada com o número de oócitos recuperados durante os tratamentos de PMA após a estimulação ovárica. Traver et al., (2015) observaram que a concentração de cfDNA foi significativamente mais elevada em mulheres que obtiveram poucos oócitos recuperados ou poucos embriões obtidos, demonstrando que concentrações elevadas de cfDNA no FF parecem estar associadas à fraca resposta ovariana aos protocolos de COS e também à qualidade embrionária.

A tabela 4 mostra a distribuição de amostras onde as mulheres obtiveram um baixo número de oócitos recuperados (≤ 6) ($n= 23$) e um alto número de oócitos aspirados (>6) ($n=83$) de acordo com as concentrações de cfDNA (qALU115). 39.2 % das amostras pertencentes ao grupo com 6 ou menos oócitos recuperados e 27.7% ao grupo com o número superior a 6 oócitos recuperados apresentaram baixas concentrações de cfDNA, enquanto 60.8% das amostras pertencentes ao grupo ≤ 6 e 72.3% ao grupo >6 apresentaram altas concentrações de cfDNA. Pode-se observar que não existe diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR 1.677; 95% CI 0.639-4.404; $P>0,05$).

A tabela 5 mostra a distribuição de amostras onde as mulheres obtiveram um baixo número de oócitos recuperados (≤ 6) ($n= 23$) e um alto número de oócitos recuperados (>6) ($n=83$) de acordo com as concentrações de cfDNA (qALU247). 21.7% pertencentes o grupo ≤ 6 e 21.6% pertencente o grupo >6 apresentaram baixas concentrações de cfDNA, enquanto que 78.3 % do grupo ≤ 6 e 78.4 % do grupo >6 apresentaram altas concentrações de cfDNA. Pode-se observar que não existe diferença estatisticamente significativa entre estes grupos (OR 1.003; 95% CI 0.327-3.074; $P>0,05$).

Tabela 4 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de ≤ 6 oócitos aspirados ($n=23$) e >6 oócitos aspirados ($n=83$) para ALU 115 (cutoff = 24,71)

| | ≤ 6 N (%) | >6 N (%) | OR (95% CI) | P-VALUE |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------|
| TOTAL | 23 (100.0) | 83 (100.0) | | |
| <24.71 | 9 (39.2) | 23 (27.7) | 1.0 | |
| ≥ 24.71 | 14 (60.8) | 60 (72.3) | 1.677 (0.639-4.404) | 0.210 |

Tabela 5 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos de ≤ 6 oócitos aspirados ($n=23$) e >6 oócitos aspirados ($n=83$) para ALU 247 (cutoff = 25,47)

| | ≤ 6 N (%) | >6 N (%) | OR (95% CI) | P-VALUE |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|----------------|
| TOTAL | 23 (100.0) | 83 (100.0) | | |
| <25.47 | 5 (21.7) | 18 (21.6) | 1.0 | |
| ≥ 25.47 | 18 (78.3) | 65 (78.4) | 1.003 (0.327-3.074) | 0.599 |

3.4 Valor preditivo de cell-free DNA em pools de fluido folicular para resultados clínicos de gravidez

A tabela 6 mostra a distribuição de amostras das quais as mulheres obtiveram um resultado positivo (n=38) e negativo (n=46) através do exame de β -hCG, de acordo com as concentrações de cfDNA (qALU115). O exame de sangue β -hCG detecta a hormona gonadotrofina coriônica humana (hCG), que está presente no sangue de mulheres grávidas e foi realizado 14 dias após a transferência embrionária. 39.4% das mulheres com resultados β -hCG positivos, ou seja, que apresentaram uma gravidez clínica, e 17.4% das mulheres que obtiveram um resultado negativo apresentaram baixa concentração de cfDNA (qALU115). Já 60.6% de mulheres com gravidez clínica e 85.6% de mulheres que obtiveram um β -hCG negativo apresentaram uma alta concentração de cfDNA. Pode-se observar uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos (OR 3.098; 95% CI 1.137-8.439; P<0,05).

Na tabela 7 podemos observar a distribuição de amostras das quais as mulheres obtiveram um resultado positivo (n=38) e negativo (n=46) através do exame de β -hCG, de acordo com as concentrações de cfDNA (qALU247). 36.8% das amostras pertencem ao grupo com BHCG positivo e 15.3% ao β -hCG negativo apresentaram baixas concentrações de cfDNA (qALU247). 63.2% das amostras do grupo β -hCG positivo e 84.7% das amostras pertencentes ao grupo β -hCG negativo apresentaram altas concentrações de cfDNA. Também foi verificada uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos de mulheres com β -hCG positivo e β -hCG negativo quando relacionados à concentração de cell-free DNA presente no fluido folicular (OR 3.350; 95% CI 1.149-9.196; P<0,05).

Tabela 6 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos β -hCG positivo (n=38) e β -hCG negativo (n=46) para ALU 115 (cutoff = 24,71)

| | POSITIVO N (%) | NEGATIVO N (%) | OR (95% CI) | P-VALUE |
|------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------|
| TOTAL | 38 (100.0) | 46 (100.0) | | |
| <24.71 | 15 (39.4) | 8 (17.4) | 1.0 | |
| ≥ 24.71 | 23 (60.6) | 38 (82.6) | 3.098 (1.137-8.439) | 0,022 |

Tabela 7 - Distribuição das amostras pertencentes aos grupos β -hCG positivo (n=38) e β -hCG negativo (n=46) para ALU 247 (cutoff = 25,47)

| | POSITIVO N (%) | NEGATIVO N (%) | OR (95% CI) | P-VALUE |
|------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|----------------|
| TOTAL | 38 (100.0) | 46 (100.0) | | |
| <25.47 | 14 (36.8) | 7 (15.3) | 1.0 | |
| ≥ 25.47 | 24 (63.2) | 39 (84.7) | 3.250 (1.149-9.196) | 0,021 |

Alguns estudos já descreveram a relação dos níveis de concentração de cfDNA no FF com as taxas de gravidez clínica de mulheres submetidas a tratamentos de PMA. Em 2013, Czamanski-Cohen et al. (2013) descreveram no seu estudo que mulheres que não conceberam durante o ciclo FIV tiveram concentrações médias de cell-free DNA significativamente mais elevadas do que as mulheres que tiveram gravidez clínica. Em 2015, Traver et al. (2015) descreveram um modelo multivariado que previu significativamente o resultado clínico da gravidez com elevada especificidade (88%), independentemente do número de tentativas de FIV/ICSI e do número de embriões obtidos.

4. Conclusões e perspectivas futuras

Fragmentos de cell-free DNA (cfDNA) detetados no sangue e outros fluidos biológicos são libertados de células apoptóticas ou necróticas, sendo atualmente usado como um biomarcador para a deteção de várias doenças, como certos tipos de cancros e doenças obstétricas e ginecológicas (Guan et al., 2017). Estudos recentes têm se concentrado na identificação desses novos biomarcadores não invasivos com base na análise do microambiente oocitário com objetivo de obter melhores resultados clínicos em tratamentos de PMA e aumentar as taxas de sucesso do tratamento, além de aprimorar o atendimento personalizado. (Scalici et al., 2014; (Traver et al., 2015; Khan et al., 2020).

A quantificação de cfDNA proveniente do fluido folicular é considerada uma técnica rápida, fácil de implementar e não invasiva que pode fornecer uma imagem global da qualidade do microambiente folicular e afetar positivamente os resultados de FIV (Traver et al., 2015). Portanto, para a procriação medicamente assistida, essa quantificação pode ser associada a métodos baseados na morfologia para melhorar a escolha de embriões, aumentando assim as chances de sucesso. Este biomarcador pode ser usado como uma ferramenta auxiliar para melhorar a gestão da infertilidade feminina e o desenvolvimento de planos de cuidados personalizados (Khan et al., 2020).

Devido à pouca reprodutibilidade e às diferenças entre os protocolos já descritos, mostra-se cada vez mais importante uma padronização da operação pré-analítica dos procedimentos para consolidar o potencial promissor da análise de cfDNA com uma importante e poderosa biópsia líquida, capaz de ser um biomarcador. Embora o cfDNA se mostre extremamente promissora como um novo biomarcador, muitas questões técnicas, clínicas, éticas e económicas permanecem sem resposta. Portanto, as pesquisas nesta área devem continuar de forma mais aprofundada, pois esse novo teste pode ser incorporado aos algoritmos de triagem da prática atual, ou mesmo substituí-los. Embora seja considerada uma técnica rápida e de fácil execução, atualmente é muita cara como uma triagem preliminar para todas as mulheres que irão realizar ciclos de tratamentos de PMA. Portanto, é crucial que, acompanhando a necessidade de standardização e aplicação ao maior número de mulheres, o custo da análise se torne mais acessível.

Através das análises feitas neste estudo podemos perceber que não foi possível observar uma relação significativa entre a concentração de cell-free DNA presente no fluido folicular de mulheres com fatores de infertilidade identificados (SOP, fator uterino, endometriose, alterações tubárias, etc.) em comparação com a concentração presente em mulheres sem qualquer causa identificada (controles). Nas análises onde foi comparada a concentração de cell-free DNA com o número de oócitos recuperados através da aspiração, também não se pode observar uma relação estatisticamente significativa entre o baixo número de oócitos aspirados e um nível aumentando de cell-free DNA.

Na análise feita com o objetivo de relacionar os níveis de cell-free DNA com o resultado do exame quantitativo β -hCG (positivo ou negativo para gravidez clínica), foi possível observar que as mulheres que não engravidaram durante os tratamentos de PMA tiveram concentrações médias de cell-free DNA mais elevadas do que as mulheres que obtiveram uma gravidez clínica confirmada, e essa diferença é estatisticamente significativa, podendo estabelecer-se uma relação entre a concentração de de cell-free DNA presente no fluido folicular e o resultado do exame β -hCG, podendo, futuramente ser usado para prever o resultado clínico da gravidez durante os tratamento de procriação medicamente assistida (PMA).

5. BIBLIOGRAFIA

- Abrao, M.S., Muzii, L., e Marana, R. (2013). Anatomical causes of female infertility and their management. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 123.
- Alper, M.M. (2012). Treatment options III: In vitro fertilization. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 69–82.
- Angelucci, S., Ciavardelli, D., Di Giuseppe, F., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Tiboni, G. M., ... & Di Ilio, C. (2006). Proteome analysis of human follicular fluid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1764(11), 1775-1785.
- Baka, S., & Malamitsi-Puchner, A. (2006). Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(4), 500-506.
- Bayer, S.R. (2012a). Factors affecting fertility. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 11–18.
- Bayer, S.R. (2012b). Treatment options II: Intrauterine inseminations. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 65–68
- Bayer, S.R., e Alper, M.M. (2012). The infertility workup. In *The Boston IVF Handbook of infertility*, S.R. Bayer, M.M. Alper, e A.S. Penzias, eds. (Informa Healthcare), pp. 19–34.
- Blundell, R. (2007). Causes of Infertility. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 3, 63–65.
- Broekmans, Frank J., et al. "Prognostic models for high and low ovarian responses in controlled ovarian stimulation using a GnRH antagonist protocol." *Human Reproduction* 29.8 (2014): 1688-1697.
- Cardona, D. R. V. (2013). Estudo Epidemiológico da Infertilidade-Prevalência e Importância Médico-Legal
- Carvalho, J. S., & Santos, A. (2009). Estudo Afrodite - Caracterização da Infertilidade em Portugal.
- Combelles, C. M. (2013). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10-11-12), 819-831.
- Costa, A. R., Beires, J., & Montenegro, N. (2011). *Protocolos de ginecologia e medicina da reprodução*. Lisboa: Lidel
- Costa, D. (2016). *Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o Tratamento da Infertilidade*.

- Crowley, E., Di Nicolantonio, F., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews Clinical oncology*, 10(8), 472.
- Czamanski-Cohen, J., Sarid, O., Cwikel, J., Levitas, E., Lunenfeld, E., Douvdevani, A., & Har-Vardi, I. (2014). Decrease in cell free DNA levels following participation in stress reduction techniques among women undergoing infertility treatment. *Archives of Women's Mental Health*, 17(3), 251-253.
- De Vasconcelos Costa, C. M., Tavares, R. L. C., de Melo, E. M., & Melo, V. H. (2016). Infertilidade: causa ou consequência da violência?. *Rev Med Minas Gerais*, 26(Supl 8), S355-S361.
- Dechanet, C., Anahory, T., Mathieu Daude, J.C., Quantin, X., Reyftmann, L., Hamamah, S., Hedon, B., e Dechaud, H. (2011). Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum. Reprod. Update* 17, 76–95
- Dewailly, D., Andersen, C. Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., ... & Mason, H. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human reproduction update*, 20(3), 370-385.
- Diaz Jr, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology*, 32(6), 579.
- Dunselman, G.A.J., Vermeulen, N., Becker, C., Calhaz-Jorge, C., D'Hooghe, T., De Bie, B., Heikinheimo, O., Horne, A.W., Kiesel, L., Nap, A., et al. (2014). ESHRE guideline: Management of women with endometriosis. *Hum. Reprod.* 29, 400–412.
- Estes, S. J., Ye, B., Qiu, W., Cramer, D., Hornstein, M. D., & Missmer, S. A. (2009). A proteomic analysis of IVF follicular fluid in women ≤ 32 years old. *Fertility and sterility*, 92(5), 1569-1578..
- Fahiminiya, S., & Gérard, N. (2010). Le liquide folliculaire chez les mammifères. *Gynécologie obstétrique & fertilité*, 38(6), 402-404.
- Fontana, R., & Torre, S. D. (2016). The deep correlation between energy metabolism and reproduction: A view on the effects of nutrition for women fertility. *Nutrients*, 8(2), 87.
- Gahan, P. B. (2012). Biology of circulating nucleic acids and possible roles in diagnosis and treatment in diabetes and cancer. *Infectious disorders drug targets*, 12(5), 360-370.
- Gianaroli, L., Racowsky, C., Geraedts, J., Cedars, M., Makrigiannakis, A., e Lobo, R.A. (2012). Best practices of ASRM and ESHRE: A journey through reproductive medicine. *Fertil. Steril.* 98, 1380–1394.
- Gradison, M. (2012). Pelvic inflammatory disease. *Am. Fam. Physician* 85, 791–796.

- Guan, Y., Zhang, W., Wang, X., Cai, P., Jia, Q., & Zhao, W. (2017). Cell-free DNA induced apoptosis of granulosa cells by oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 473, 213-217.
- Herrero, J., & Meseguer, M. (2013). Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertility and sterility*, 99(4), 1030-1034.
- Huang, Z. H., Li, L. H., & Hua, D. (2006). Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer letters*, 243(1), 64-70.
- Kahapola Arachchige, K. M., Wardrop, R., Lim, E. M., Stuckey, B., & Hadlow, N. (2012). Waiting for an elevated FSH—Too late a marker of reduced ovarian reserve?. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 52(5), 460-464.
- Khan, H. L., Bhatti, S., Khan, Y. L., Abbas, S., Munir, Z., Sherwani, I. A. R. K., ... & Aydin, H. H. (2020). Cell-free nucleic acids and melatonin levels in human follicular fluid predict embryo quality in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(1), 101624.
- Kuohung, W., Hornstein, M. D., Barbieri, R. L., & Barss, V. A. (2016). Evaluation of female infertility. *UpToDate*, Waltham, MA. Accessed Jan.
- Lima, A. P. W., & Lourenço, J. W. (2016). Infertilidade humana: comentando suas causas e consequências. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, 10(5), 110-124.
- Lynch, C.D., Sundaram, R., Maisog, J.M., Sweeney, A.M., e Buck Louis, G.M. (2014). Preconception stress increases the risk of infertility: Results from a couple-based prospective cohort study—the LIFE study. *Hum. Reprod.* 29, 1067–1075.
- Macer, M.L., e Taylor, H.S. (2012). Endometriosis and Infertility: A Review of the Pathogenesis and Treatment of Endometriosis-associated Infertility. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.* 39, 535–549.
- Mandel, P. (1948). Les acides nucleiques du plasma sanguin chez 1 homme. *CR Seances Soc Biol Fil*, 142, 241-243.
- Marzese, D. M., Hirose, H., & Hoon, D. S. (2013). Diagnostic and prognostic value of circulating tumor-related DNA in cancer patients. *Expert review of molecular diagnostics*, 13(8), 827-844.

Mascarenhas, M. N., Cheung, H., Mathers, C. D., & Stevens, G. A. (2012). Measuring infertility in populations: constructing a standard definition for use with demographic and reproductive health surveys. *Population health metrics*, 10(1), 17.

Messinis, I. E., Messini, C. I., Daponte, A., Garas, A., & Mahmood, T. (2016). The current situation of infertility services provision in Europe. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 207, 200-204.

Neri, Q. V., Monahan, D., Rosenwaks, Z., e Palermo, G.D. (2012). Intracytoplasmic sperm injection: Technical aspects. In *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*, D.K. Gardner, A. Weissman, C.M. Howles, e Z. Shoham, eds. (Informa Healthcare), pp. 172–185.

Oliveira, I. B. D. D., & Hirata, R. D. C. (2018). Circulating cell-free DNA as a biomarker in the diagnosis and prognosis of colorectal cancer. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1).

Palermo, G., & Joris, H. (1992). Pregnancy after intracytoplasmatic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, pp. 17-18.

Palermo, G.D., Neri, Q. V., e Rosenwaks, Z. (2015). To ICSI or not to ICSI. *Semin. Reprod. Med.* 33, 92–102.

Pisetsky, D. S., & Fairhurst, A. M. (2007). The origin of extracellular DNA during the clearance of dead and dying cells. *Autoimmunity*, 40(4), 281-284.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2013). Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 99(1), 63.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2015). Diagnostic evaluation of the infertile female: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 103(6), e44-e50.

Rachoń, D., e Teede, H. (2010). Ovarian function and obesity–interrelationship, impact on women’s reproductive lifespan and treatment options. *Mol. Cell. Endocrinol.* 316, 172–179.

Ray, A., Shah, A., Gudi, A., & Homburg, R. (2012). Unexplained infertility: an update and review of practice. *Reproductive biomedicine online*, 24(6), 591-602.

Revelli, A., Delle Piane, L., Casano, S., Molinari, E., Massobrio, M., & Rinaudo, P. (2009). Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reproductive biology and endocrinology*, 7(1), 40.

- Rooney, K.L., e Domar, A.D. (2014). The impact of lifestyle behaviors on infertility treatment outcome. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 26, 181–185.
- Scalici, E., Traver, S., Molinari, N., Mullet, T., Monforte, M., Vintejou, E., & Hamamah, S. (2014). Cell-free DNA in human follicular fluid as a biomarker of embryo quality. *Human Reproduction*, 29(12), 2661-2669.
- Schwarzenbach, H., Hoon, D. S., & Pantel, K. (2011). Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6), 426-437.
- Sharma, R., Biedenharn, K.R., Fedor, J.M., e Agarwal, A. (2013). Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 66–81.
- Stephoe, P., & Edwards, R. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2, 366.
- Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C., & Maurice, P. A. (1987). Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 23(6), 707-712.
- Tal, R., & Seifer, D. B. (2017). Ovarian reserve testing: a user’s guide. *American journal of obstetrics and gynecology*, 217(2), 129-140.
- Traver, S., Scalici, E., Mullet, T., Molinari, N., Vincens, C., Anahory, T., & Hamamah, S. (2015). Cell-free DNA in human follicular microenvironment: new prognostic biomarker to predict in vitro fertilization outcomes. *PloS one*, 10(8), e0136172.
- Umetani, N., Kim, J., Hiramatsu, S., Reber, H. A., Hines, O. J., Bilchik, A. J., & Hoon, D. S. (2006). Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical chemistry*, 52(6), 1062-1069.
- Unuane, D., Tournaye, H., Velkeniers, B., e Poppe, K. (2011). Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25, 861–873.
- Valckx, S.D.M., Arias-Alvarez, M., De Pauw, I., Fievez, V., Vlaeminck, B., Franssen, E., Bols, P.E.J., e Leroy, J.L.M.R. (2014). Fatty acid composition of the follicular fluid of normal weight, overweight and obese women undergoing assisted reproductive treatment: a descriptive cross-sectional study. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 13.

Vasques, J. D. A. (2014). Inibição mediada pelo EDTA protege o DNA fetal livre de células de degradação ex-vivo em amostras de sangue.

Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D., & Collins, C. (2016). Cell-free DNA (cfDNA): clinical significance and utility in cancer shaped by emerging technologies. *Molecular Cancer Research*, 14(10), 898-908.

Wallace, M., Cottell, E., Gibney, M. J., McAuliffe, F. M., Wingfield, M., & Brennan, L. (2012). An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome. *Fertility and sterility*, 97(5), 1078-1084.

Wong, B. C., & Lo, Y. D. (2003). Cell-free DNA and RNA in plasma as new tools for molecular diagnostics. *Expert review of molecular diagnostics*, 3(6), 785-797.

Yanaihara, A., Mitsukawa, K., Iwasaki, S., Otsuki, K., Kawamura, T., & Okai, T. (2007). High concentrations of lactoferrin in the follicular fluid correlate with embryo quality during in vitro fertilization cycles. *Fertility and sterility*, 87(2), 279-282.

Yang, S., Peng, H. Y., Li, Y., Zhou, L. Y., Yuan, L., Ma, Y. M., ... & Qiao, J. (2016). Intrauterine insemination treatment strategy for women over 35 years old: Based on a large sample multi-center retrospective analysis. *Chinese medical journal*, 129(23), 2873.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., ... & Van der Poel, S. (2009). The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Human reproduction*, 24(11), 2683-2687.

Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., De Mouzon, J., Sokol, R., ... & Simpson, J. L. (2017). The international glossary on infertility and fertility care, 2017. *Human reproduction*, 32(9), 1786-1801