



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

Aplicabilidade de um software de assistência à seleção embrionária baseado num algoritmo de IA a uma população com indicação para PGT-A no contexto legal português

Dissertação de Mestrado defendida em provas públicas para a obtenção do grau de mestre
em Embriologia e Reprodução Humana, orientada pela Professora Dra. Mafalda Rato.

Ana Alexandra Marques Póvoa, nº22207115

2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
ESCOLA DE PSICOLOGIA E CIÊNCIAS DA VIDA
MESTRADO EM EMBRIOLOGIA E REPRODUÇÃO HUMANA

Aplicabilidade de um software de assistência à seleção embrionária baseado num algoritmo de IA a uma população com indicação para PGT-A no contexto legal português

VERSÃO FINAL

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade
Lusófona, Centro Universitário de Lisboa no dia 25/10/2024,
perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº
945/2024, de 2024, com a seguinte composição:
Presidente: Prof.^ª Doutora Patrícia Carla Coelho Rodrigues;
Arguente: Prof. Doutor Bruno Daniel da Costa Gomes;
Orientadora: Prof.^ª Doutora Mafalda Leal Rato

Ana Alexandra Marques Póvoa, nº22207115

2024

*A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens, mas em
ver com novos olhos.*

(Marcel Proust, 1923)

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha mais sincera gratidão a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desta dissertação de mestrado.

Em primeiro lugar, dirijo um agradecimento especial à minha orientadora, professora Mafalda Rato, cuja orientação excecional, vasto conhecimento científico e constante disponibilidade foram cruciais ao longo deste percurso. Sou imensamente grata pela oportunidade de ter realizado o meu estágio na Clínica *Instituto Extremeño de Reproducción Asistida* (IERA) Lisboa sob a sua orientação, o qual me proporcionou uma experiência muito enriquecedora e fundamental para o início do meu percurso na área da Reprodução Medicamente Assistida. A sua dedicação incansável foi essencial para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Agradeço igualmente às embriologistas da clínica IERA Lisboa, Marta Ramos e Catarina Corrêa de Mello. A colaboração e o apoio que me proporcionaram foram essenciais para o sucesso da minha pesquisa. A vossa generosidade em partilhar conhecimento e esclarecer dúvidas, juntamente com o carinho e simpatia com que me acolheram, enriqueceram significativamente o desenvolvimento deste estudo. A vossa contribuição foi muito importante e sou profundamente grata por todo o apoio.

À professora doutora e coordenadora do mestrado, Patrícia Rodrigues, deixo o meu agradecimento por todo o apoio ao longo destes dois anos de formação. A sua dedicação, paixão e perseverança inspiradoras foram fundamentais para a criação e sucesso do Mestrado em Embriologia e Reprodução Humana, pioneiro em Portugal.

À minha família, amigos e namorado, o meu profundo reconhecimento. Aos meus pais, agradeço pela oportunidade de prosseguir com o mestrado e pelo suporte emocional e financeiro que me permitiu concentrar-me plenamente no meu estágio e dissertação. A vossa paciência, compreensão e encorajamento foram determinantes para que pudesse superar os desafios e alcançar este objetivo académico. Aos meus amigos e restante família, que estiveram sempre ao meu lado, com palavras de incentivo e apoio moral, o meu sincero obrigado. E ao meu namorado, pelo apoio e suporte constantes, compreensão e pelo incentivo nos momentos mais exigentes, expresso a minha gratidão.

A todos, o meu mais sincero agradecimento por fazerem parte deste percurso e contribuírem para a realização desta dissertação.

Resumo

A seleção embrionária é crucial para o sucesso das técnicas de Procriação Medicamente Assistida, motivando o desenvolvimento de tecnologias que identifiquem embriões com maior probabilidade de resultar num nado-vivo saudável. O presente estudo avalia o desempenho do *software* de assistência à seleção embrionária baseado em Inteligência Artificial, *Life Whisperer*, no contexto legal português.

Foram analisados 176 embriões do Centro IERA Lisboa relativamente à concordância entre a classificação atribuída pelo *software* e os resultados genéticos pré-implantação. Para tal, foi utilizado o teste qui-quadrado para tendência linear, observando-se uma tendência linear significativa ($p = 0,01$) para embriões em D5 de desenvolvimento. Identificou-se também um novo limiar ótimo para a distinção entre embriões euploides e aneuploides (9,55). Adicionalmente detetou-se uma proporção de embriões euploides abaixo do esperado em todas as categorias, que poderá ser reflexo da idade das pacientes elegíveis para PGT-A, condicionada pelo contexto legal português.

Os resultados obtidos sugerem que a aplicabilidade do LW é influenciada pela idade da mulher e pelo dia de desenvolvimento embrionário, sendo mais efetivo quando aplicado em D5 e após ajustar os limites de inclusão nas categorias “Alta” e “Muito Alta” e confirmam a importância de validar o *software in loco*, antes da sua implementação.

Palavras-chave: seleção embrionária, *Life Whisperer*, PGT-A, euploidia, inteligência artificial.

Abstract

Embryo selection is crucial to the success of Assisted Reproductive Technology techniques, motivating the development of technologies that identify embryos most likely to result in a healthy live birth. This study evaluates the performance of the Artificial Intelligence-based embryo selection assistance software, Life Whisperer, within the Portuguese legal framework.

A total of 176 embryos from the IERA Lisboa Center were analyzed regarding the agreement between the classification given by the software and the pre-implantation genetic results. The results were analyzed using a chi-square test for linear trend and a significant linear trend ($p = 0.01$) was identified for embryos at D5 of development. Furthermore, a new optimal threshold for differentiating between euploid and aneuploid embryos was identified (9.55). In addition, a lower-than-expected proportion of euploid embryos was detected in all categories, which may reflect the age of patients eligible for PGT-A, conditioned by the Portuguese legal context.

The results suggest that the applicability of LW is influenced by the woman's age and the day of embryonic development, being more effective when applied on D5 and after adjusting the inclusion limits in the 'High' and 'Very High' categories and confirm the importance of validating the software on site before its implementation.

Keywords: embryo selection, Life Whisperer, PGT-A, euploidy, artificial intelligence.

Abreviaturas e Siglas

OMS – Organização Mundial da Saúde

PMA – Procriação Medicamente Assistida

CNPMA – Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida

PGT – *Preimplantation genetic testing* (Teste Genético Pré-Implantação)

PGT-A – *Preimplantation genetic testing for aneuploidy* (Teste Genético Pré-Implantação para Aneuploidias)

PGT-M – *Preimplantation genetic testing for monogenic disorders* (Teste Genético Pré-Implantação para doenças monogénicas)

PGT-SR – *Preimplantation genetic testing for structural chromosome rearrangements* (Teste Genético Pré-Implantação para anomalias cromossómicas estruturais)

FIV – Fertilização *in vitro*

ICSI – *Intracytoplasmic sperm injection* (Injeção intracitoplasmática de espermatozoides)

DET – *Double Embryo Transfer* (transferência de dois embriões)

SET – *Single Embryo Transfer* (transferência de um único embrião)

ICM – *Inner cell mass* (Massa celular interna)

TE – trofotoderme

ASEBIR – *Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

FISH – *Fluorescence in situ hybridization* (Hibridação *in situ* fluorescente)

aCGH – *array Comparative Genomic Hybridization* (Hibridação Genómica Comparativa em array)

NGS – *Next-Generation Sequencing* (Sequenciação de Nova Geração)

D3 – Terceiro dia de desenvolvimento embrionário

D5 – Quinto dia de desenvolvimento embrionário

D6 – Sexto dia de desenvolvimento embrionário

AMH – Hormona Anti Mülleriana

niPGT-A – *Non-invasive Preimplantation genetic testing for aneuploidy* (Teste Genético Pré-Implantação não invasivo para Aneuploidias)

cfDNA – Cell-free DNA (DNA livre)

IA – Inteligência Artificial

LW – *Life Whisperer*

ERICA – *Embryo Ranking Intelligent Classification Algorithm*

APA – *American Psychological Association*

IERA – *Instituto Extremeño de Reproducción Asistida*

VP – Verdadeiros Positivos

VN – Verdadeiros Negativos

FP – Falsos Positivos

FN – Falsos Negativos

VPP – Valor Preditivo Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

TTP – Time To Pregnancy (tempo até se atingir uma gravidez)

Índice

Agradecimentos.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Abreviaturas e Siglas.....	6
Índice de figuras e tabelas	9
1 Introdução.....	11
1.1 Infertilidade e técnicas de Procriação Medicamente Assistida	11
1.2 Enquadramento legal da PMA em Portugal.....	11
1.3 Seleção Embrionária e Sucesso das técnicas de PMA.....	12
1.4 Causas e consequências das aneuploidias embrionárias.....	13
1.5 Efeito da idade da mulher na incidência de aneuploidias	14
1.6 Testes de Diagnóstico Genético Pré-Implantação: PGT.....	15
1.7 Técnicas não invasivas para prever a ploidia dos embriões.....	17
1.8 IA na Embriologia Clínica e Medicina da Reprodução	18
1.9 <i>Life Whisperer</i> e outros <i>softwares</i> de Inteligência Artificial.....	19
2 Objetivo do estudo	20
3 Materiais e Métodos	21
3.1 Desenho Experimental	21
3.2 Análise Estatística	23
4 Desenvolvimento e Resultados	24
4.1 Distribuição dos embriões em classes de probabilidade de euploidia.....	24
4.2 Avaliação do desempenho do modelo.....	27
4.3 Determinação do ponto de corte para distinguir entre embriões euploides e aneuploides.....	30
4.4 Análise de anomalias cromossómicas.....	34
4.5 Estudo Piloto sobre a pontuação da Viabilidade embrionária vs Classificação morfológica.....	36
4.6 Discussão dos resultados	38
Conclusão.....	43
Bibliografia	47

Índice de figuras e tabelas

Figura 1. Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria de probabilidade de euploidia para cada uma das populações estudadas. A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento; C: população de embriões no 6º dia de desenvolvimento. O método estatístico utilizado foi o teste qui-quadrado para tendência linear (gl, graus de liberdade).....	26
Figura 2. Curvas ROC e de Precisão-Sensibilidade para as populações em estudo: A, C: população total de embriões; B, D: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento. .	29
Figura 3. Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria de probabilidade de euploidia, reestabelecendo os limites das categorias “Alta” e “Muito alta” tendo em consideração o ponto de corte = 9,55, para cada uma das populações estudadas. A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento. .	32
Figura 4. Média da pontuação atribuída pelo <i>Life Whisperer Genetics</i> para cada uma das anomalias cromossômicas e para os embriões euploides para as populações em estudo: população total de embriões; população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.	36
Figura 5. Média da pontuação atribuída pelo <i>Life Whisperer Viability</i> para cada Grau de classificação embrionária (A, B e C) relativamente aos blastocistos não expandidos e expandidos para as populações em estudo: população total de embriões; população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.	38
Tabela 1. Caracterização das populações em estudo: “Total de embriões” e “Embriões D5” (1 – número de imagens de embriões correspondente ao número de embriões biopsados). ...	22
Tabela 2. Distribuição dos embriões euploides e aneuploides nas quatro categorias de probabilidade de euploidia para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.	27
Tabela 3. Matrizes de confusão e métricas de desempenho do <i>Life Whisperer Genetics</i> na classificação de embriões euploides e aneuploides, para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento, utilizando o 5 como ponto de corte. VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; C. <i>Matthews</i> : Coeficiente de correlação de <i>Matthews</i>	28
Tabela 4. Distribuição dos embriões euploides e aneuploides pelas categorias de probabilidade de euploidia, reestabelecendo os limites das categorias “Alta” e “Muito alta” tendo em consideração o ponto de corte = 9,55, para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.	31

Tabela 6. Matrizes de confusão e métricas de desempenho do *Life Whisperer Genetics* na classificação de embriões euploides e aneuploides, para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento, utilizando o 9,55 como ponto de corte. VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; C. *Matthews*: Coeficiente de correlação de *Matthews*. 34

Tabela 7. Frequência de aneuploidias para cada um dos 22 autossomas e para o cromossoma X dos embriões da população em estudo..... 35

1 Introdução

1.1 Infertilidade e técnicas de Procriação Medicamente Assistida

Ao longo das últimas décadas, tem sido evidente um crescimento global na incidência da infertilidade a nível mundial (Cox et al., 2022), definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a “incapacidade de conceber uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares desprotegidas” (WHO, 2023). Diante deste cenário, tem-se verificado um aumento na procura por tratamentos de Procriação Medicamente Assistida (PMA) (Passet-Wittig & Greil, 2021), os quais têm contribuído significativamente para ultrapassar este obstáculo, estimando-se que o número de crianças nascidas através de PMA ultrapasse os 10 milhões a nível mundial (Pinborg et al., 2023). Em Portugal, os últimos dados divulgados pelo Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA), referentes ao ano 2021, indicam que, fruto da utilização das técnicas de PMA, nasceram 3424 crianças, representando 4,1% do número total de nascimentos no país nesse ano (CNPMA, 2024).

Apesar de serem vários os fatores de infertilidade, em diversos países ao redor do mundo, especialmente nos mais desenvolvidos, observa-se uma tendência crescente para o adiamento da idade da mulher aquando da primeira gestação (Beaujouan & Sobotka, 2021). Esta tendência é influenciada por diversos fatores sociais e sociológicos e resulta na redução da taxa de conceção espontânea e no concomitante aumento da procura de técnicas de PMA por parte de mulheres acima dos 39 anos (Pierce & Mocanu, 2018).

1.2 Enquadramento legal da PMA em Portugal

As técnicas de PMA encontram-se regulamentadas a nível nacional pela Lei n.º 32/2006, de 26 de Julho (Assembleia da República, 2006), que determina a criação do CNPMA, com poder deliberativo e de fiscalização do funcionamento dos Centros de PMA.

Entre outros aspetos, a Lei da PMA define inequivocamente os beneficiários elegíveis, as técnicas autorizadas e os limites legais para a utilização desses procedimentos. Em particular, esta lei estabelece um limite de idade de 50 anos para as beneficiárias do sexo feminino.

Por outro lado, o CNPMA estabelece diretrizes precisas para a aplicação de Testes Genéticos Pré-implantação (PGT), permitindo a realização de Testes Genéticos Pré-Implantação para Aneuploidias (PGT-A) em situações específicas, incluindo mulheres de

idade igual ou superior a 39 anos, a pacientes com falhas repetidas de implantação embrionária após três ou mais transferências embrionárias e em casos de dois ou mais abortos clínicos de causa desconhecida. Também é permitido realizar-se o PGT-A quando se recorre previamente a testes genéticos pré-implantação para a deteção de doenças monogénicas (PGT-M) ou rearranjos estruturais dos cromossomas (PGT-SR) (CNPMA, 2021).

1.3 Seleção Embrionária e Sucesso das técnicas de PMA

O sucesso das técnicas de PMA, especificamente das técnicas de Fertilização *in vitro* (FIV e ICSI), inclui várias etapas e está dependente de vários fatores, como a qualidade dos gametas e dos embriões, o número de embriões resultantes, a causa de infertilidade e a idade da mulher (Amini et al., 2021). No entanto, o procedimento crítico para garantir o menor tempo possível até se atingir a gravidez é a seleção do embrião a transferir (Zaninovic & Rosenwaks, 2020). Apesar da transferência de dois embriões (DET) aumentar as probabilidades de gravidez, esta prática é desaconselhada devido aos riscos associados à gravidez múltipla, nomeadamente o parto prematuro, o baixo peso do bebé ao nascimento e outros desfechos maternos e perinatais adversos. Deste modo, recomenda-se a transferência de apenas um embrião (SET), o que exige uma seleção criteriosa do embrião com maior potencial de gravidez entre uma coorte de embriões (Transfer et al., 2024).

Historicamente, o método de seleção mais utilizado é a avaliação morfológica dos embriões, realizada em momentos específicos do desenvolvimento embrionário (Neuber et al., 2006). Este método está fundamentado na correlação extensivamente documentada que existe entre a morfologia do embrião e a sua viabilidade (Meseguer et al., 2012). A avaliação morfológica do embrião durante a fase de clivagem baseia-se no número de células, na sua simetria e na presença de fragmentação celular num determinado momento temporal. Já durante a fase de blastocisto, é avaliada a sua expansão, bem com o número e a coesão das células que compõe a massa celular interna (ICM) e da trofotoderme (TE) (Greco et al., 2020).

Os principais sistemas de classificação embrionária utilizados em Portugal incluem o sistema de Gardner, o da *Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción* (ASEBIR) e o Consenso de Istambul, possuindo métodos de avaliação distintos. O sistema Gardner, amplamente adotado, utiliza uma classificação numérica que indica o grau de expansão do blastocisto e letras para a avaliação da qualidade da ICM e da TE (Gardner et al., 2000). O sistema ASEBIR utiliza letras para classificar os aspetos morfológicos dos

embriões ao longo dos diferentes estádios do desenvolvimento embrionário (Cuevas Saiz et al., 2018). Para uniformizar os sistemas de classificação de embriões utilizados entre os diferentes países, em 2011, foi criado o Consenso de Istambul. Este sistema, resultado de um esforço internacional para padronizar a avaliação dos embriões, combina classificações numéricas e alfabéticas, facilitando a comparação entre os centros de reprodução assistida (Balaban et al., 2011).

Recentemente, a introdução de incubadoras com tecnologia *time-lapse* passou a permitir a observação flexível de todo o desenvolvimento embrionário. Estas incubadoras integram câmaras de alta resolução que capturam imagens dos embriões em intervalos regulares, geralmente a cada 5 a 15 minutos, sem necessidade de abertura da incubadora. Deste modo, a utilização desta tecnologia coloca à disposição dos embriologistas um elevado número de momentos de observação da morfologia do embrião e permite analisar também a cinética do desenvolvimento embrionário, em condições de cultura estáveis e sem perturbações (Mandawala et al., 2016). Contudo, ambos os métodos de seleção, estática ou por *time-lapse*, possuem a desvantagem de estarem sujeitos à variabilidade intra e inter-observador (Sundvall et al., 2013).

Por outro lado, a qualidade embrionária, mesmo que avaliada com recurso a dados morfocinéticos, não é um reflexo direto da sua ploidia, o que pode explicar, em parte, a razão pela qual uma percentagem significativa dos embriões transferidos, ainda que de boa qualidade, não resultam em gravidez clínica ou terminam em aborto (Kadioglu et al., 2023; Oron et al., 2014).

O teste genético pré-implantação para aneuploidias (PGT-A) possibilita uma avaliação complementar dos embriões (Dimitriadis et al., 2022). Esta técnica permite a avaliação do número de cromossomas do embrião, garantindo que o embrião transferido é euploide. No entanto, este é um método dispendioso, invasivo e controverso quanto à sua eficácia e indicações para aplicação (Zhan et al., 2020) estando legalmente limitado em alguns países, como é o caso de Portugal.

1.4 Causas e consequências das aneuploidias embrionárias

A aneuploidia, que consiste na presença de um número anormal de cromossomas numa célula, apresenta uma elevada prevalência em oócitos e embriões humanos, estimando-se que, dependendo da idade da mulher e de outras circunstâncias do casal,

apenas metade dos embriões possam ser euploides (Fragouli & Wells, 2011). Os erros de segregação cromossômica que levam à ocorrência de aneuploidias podem ocorrer numa fase mais inicial, durante a proliferação mitótica das células germinais primordiais, durante as divisões meióticas do oócito ou durante as divisões mitóticas iniciais do embrião (Mikwar et al., 2020).

Para além da idade materna como fator influenciador das aneuploidias oocitárias, tem sido estudado o efeito da estimulação ovárica controlada com recurso a hormonas exógenas no aumento da taxa de aneuploidias, já que este procedimento elimina a seleção natural dos folículos, permitindo a maturação de oócitos que de outra forma nunca seriam selecionados para ser ovulados (Sciorio et al., 2023).

Existem múltiplos fatores moleculares que explicam a elevada taxa de aneuploidias em mulheres mais velhas, nomeadamente falhas na recombinação durante a meiose, a deterioração da coesão entre os cromossomas (Herbert et al., 2015), a desregulação dos mecanismos de *checkpoint* da placa metafásica, anomalias nas modificações pós-traducionais das histonas e da tubulina e disfunção das mitocôndrias (Mikwar et al., 2020), fatores estes que estão associados ao envelhecimento celular.

1.5 Efeito da idade da mulher na incidência de aneuploidias

Apesar de ser um tratamento eficaz, a FIV revela um baixo sucesso em mulheres com idades mais avançadas, especificamente após os 39 anos (Lee et al., 2015). Este fenómeno pode ser explicado pelo aumento da incidência de aneuploidias nos oócitos com a idade da mulher, o qual resulta numa redução drástica na integridade genética e viabilidade dos embriões (Perugini et al., 2022). Sabe-se que a aneuploidia dos embriões é uma das principais causas das falhas de implantação, abortos e malformações congénitas nos recém-nascidos (Schaeffer et al., 2018).

Tendo em conta que nas últimas décadas se tem vindo a observar, sobretudo entre os países desenvolvidos, o adiamento da parentalidade (Schmidt et al., 2012), torna-se crítico compreender os mecanismos biológicos por detrás do aumento das aneuploidias com a idade da mulher, bem como detetar a sua ocorrência antes da transferência embrionária.

1.6 Testes de Diagnóstico Genético Pré-Implantação: PGT

Os testes genéticos pré-implantação começaram a ser utilizados em 1990 por Handyside et al., com o objetivo de selecionar embriões do sexo feminino para evitar a transmissão de doenças recessivas associadas ao cromossoma X (Schaeffer et al., 2018). As técnicas utilizadas para amplificação e sequenciação do DNA foram evoluindo, desde a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permitia apenas a determinação do sexo e a detecção de doenças monogénicas, passando pela hibridação *in situ* fluorescente (FISH), que analisava um número limitado de cromossomas, culminando nas tecnologias de sequenciação do genoma completo. Estas últimas também progrediram desde a Hibridação Genómica Comparativa em array (aCGH) até à Sequenciação de Nova Geração (NGS), utilizada globalmente nos dias de hoje (Greco et al., 2020; Penzias et al., 2018).

Não só a técnica de amplificação utilizada, mas também a proveniência da amostra tem vindo a sofrer alterações ao longo do tempo. A biópsia aos corpos polares, apesar de ser facilmente realizada sem acarretar riscos para o desenvolvimento do embrião, é apenas representativa da informação genética materna. Por outro lado, a biópsia ao terceiro dia de desenvolvimento embrionário (D3) implica a remoção de uma a duas células – blastómeros, numa fase em que o embrião apresenta entre seis e oito células, o que pode simultaneamente resultar num diagnóstico incorreto, não representativo do embrião, e afetar a viabilidade embrionária. Assim, a técnica amplamente utilizada atualmente é a biópsia da TE de blastocistos entre o quinto e o sexto dias de desenvolvimento (D5 ou D6), que permite a recolha de uma amostra mais representativa, de cinco a oito células precursoras da placenta, não estando estas envolvidas na formação do feto. Para além disso, a realização da biópsia na fase de blastocisto permite uma análise mais precisa, uma vez que o embrião já tem o seu genoma ativado nesta fase (Greco et al., 2020).

No entanto, uma das limitações da biópsia de TE é a não representatividade direta das células da ICM, estimando-se que a probabilidade de falsos diagnósticos possa atingir 1% (Bacal et al., 2022).

Os PGT podem ser divididos em três tipos: O PGT-M, que permite a deteção de doenças monogénicas, o PGT-SR, que visa analisar anomalias cromossómicas estruturais e o PGT-A, que identifica a presença de aneuploidias (Carvalho et al., 2020).

A técnica do PGT-A, ao permitir a identificação de embriões euploides, torna-se uma ferramenta útil no âmbito da PMA, tendo em conta que existe uma proporção significativa de embriões aneuploides que apresentam uma boa morfologia e portanto, podem ser

considerados elegíveis para transferência (Greco et al., 2020). No entanto, a aplicação do PGT-A apenas demonstra um aumento do potencial de implantação e das taxas de gravidez em pacientes de idade mais avançada, não se verificando a mesma utilidade em pacientes entre os 25 e os 40 anos (Munné et al., 2019). Juntamente com o aumento da idade, a redução dos níveis da Hormona anti Mülleriana (AMH) estão associados a um maior risco de aneuploidia embrionária. Assim sendo, alguns autores defendem que o PGT-A deve ser utilizado principalmente em mulheres de idade avançada (Greco et al., 2020), o que tem vindo a condicionar o enquadramento legal entre vários países.

Outras situações nas quais o PGT-A apresenta uma aplicação clínica comprovada são os abortos repetidos de causa desconhecida e as falhas de implantação recorrentes, que poderão ser explicados pelas aneuploidias dos embriões (Greco et al., 2020) e que constituem a base científica na qual assenta a Legislação Portuguesa.

Ainda que a utilização do PGT-A aumente as taxas de implantação e de gravidez, reduza as taxas de aborto e permita evitar os riscos de uma gravidez múltipla ao reduzir o número de embriões transferidos por tentativa, existem algumas incertezas quanto à sua utilização devido às desvantagens que acarreta (Popovic et al., 2020).

A biópsia embrionária para realização do PGT-A envolve a recolha de, em média, seis células da TE. No entanto, um estudo conduzido por Gleicher et al., 2017, demonstrou matematicamente que seriam necessárias pelo menos 27 células da TE para alcançar uma previsibilidade diagnóstica mínima. Por outro lado, sabe-se que a biópsia de um elevado número de células da TE pode ter um impacto negativo nas taxas de implantação (Guzman et al., 2019). Para além disso, ao remover células que irão dar origem à placenta, a biópsia apresenta potenciais riscos para a gravidez, relacionados com a formação anormal da placenta, tais como a pré-eclampsia, a placenta prévia e ainda desfechos neonatais adversos (Zhang et al., 2019). Já um estudo realizado em ratinho por Yao et al., 2016, sugere que a manipulação de blastómeros durante a biópsia pode resultar em danos nos embriões e aumentar o risco de inflamação e stress oxidativo no tecido placentário.

Ao permitir a avaliação do número de cópias dos cromossomas, o PGT-A possibilita a identificação de embriões que apresentam um resultado intermédio. Esses embriões, classificados como mosaico, são constituídos por duas ou mais populações celulares com diferentes genótipos, ou seja, são compostos por células euploides e aneuploides. Este fenómeno do mosaicismo ocorre devido a erros mitóticos pós-zigóticos, como a não-disjunção ou atrasos na anáfase. Estudos clínicos demonstram que a transferência de embriões

mosaicos está associada a menores taxas de implantação e de gravidez e maiores taxas de aborto espontâneo em comparação com embriões euploides (Muñoz et al., 2024).

Assim, outra preocupação relevante associada ao PGT-A é o risco potencial de se descartarem embriões competentes devido à detecção incorreta de mosaicismos ou a problemas de diagnóstico, tais como a contaminação do DNA (Clark et al., 2023), a amplificação inadequada do material genético, ou erros na interpretação dos resultados (Casper, 2023). Ainda que na maior parte das vezes o material genético presente no limitado número de células da TE biopsadas seja representativo da ICM, o mesmo pode não acontecer em embriões mosaico (Chen et al., 2022).

Tal como concluído por Pagliardini et al., 2020, o uso indiscriminado do PGT-A poderá implicar uma perda de embriões potencialmente competentes devido a diagnósticos errados e/ou a danos no embrião causados pela biópsia. Para além disso, a realização da biópsia embrionária requer equipamento especializado e perícia por parte do operador, o que torna esta técnica difícil de padronizar (Chen et al., 2022), estando documentada a variabilidade entre operadores, centros de PMA e laboratórios de diagnóstico (Kokkali et al., 2020).

1.7 Técnicas não invasivas para prever a ploidia dos embriões

Uma vez que as técnicas de biópsia embrionária são processos invasivos que podem colocar em risco o desenvolvimento do embrião e a sua integridade, têm sido investigados métodos que permitam prever a ploidia dos embriões de modo não invasivo (Zaninovic & Rosenwaks, 2020). As principais tecnologias não invasivas que se encontram em desenvolvimento incluem a análise do DNA recolhido do fluido do blastocélio ou do meio de cultura embrionário. O PGT-A não invasivo (niPGT-A) oferece uma alternativa promissora ao PGT-A convencional, permitindo uma análise genética do embrião mais segura, simples, económica, e com menos implicações éticas e legais (Lledo et al., 2023).

Contudo, a origem precisa do DNA livre (cfDNA) e os mecanismos envolvidos na sua libertação permanecem desconhecidos (Navarro-Sánchez et al., 2022) e a concordância entre o PGT-A e o niPGT-A varia entre os vários estudos realizados (Lledo et al., 2023). Deste modo, são necessários mais estudos até que esta técnica possa ser considerada na categoria de teste diagnóstico, embora atualmente já estejam disponíveis no mercado testes que permitem a priorização de embriões para transferência, com base na probabilidade de euploidia após análise do cfDNA presente no meio de cultura (Rubio et al., 2020).

No contexto dos laboratórios de embriologia, a introdução do niPGT-A acarreta algumas mudanças na rotina, exigindo culturas embrionárias individualizadas e prolongadas num volume reduzido, devido à diminuta quantidade de cfDNA presente no meio de cultura e à importância de se evitar a contaminação por parte do DNA materno e do operador (Navarro-Sánchez et al., 2022).

Em Portugal, o CNPMA deliberou não autorizar a aplicação clínica do niPGT-A (CNPMA, 2023), revelando as implicações éticas e incertezas associadas a esta tecnologia.

Paralelamente, têm sido desenvolvidos outros tipos de métodos não invasivos que procuram prever a ploidia dos embriões com base em Inteligência Artificial (IA) (Jiang & Bormann, 2023).

Para ambas as alternativas, tal como em qualquer tecnologia emergente, são necessários estudos de validação e de concordância antes de estas técnicas serem introduzidas na prática clínica, garantindo a sua eficácia e segurança (Navarro-Sánchez et al., 2022).

1.8 IA na Embriologia Clínica e Medicina da Reprodução

A IA contempla diversas abordagens matemáticas que permitem realizar previsões com base no reconhecimento de padrões. Nos últimos tempos, vários algoritmos de IA têm permitido a análise de imagens em várias áreas da medicina, incluindo a medicina da reprodução. Estas tecnologias têm sido desenvolvidas sobretudo com o objetivo de melhorar a seleção do blastocisto com maior potencial de gravidez, mas também oferecem outras aplicabilidades, nomeadamente na seleção de espermatozoides e oócitos, na seleção embrionária em estádios mais precoces de desenvolvimento e no desenvolvimento de protocolos de estimulação ovárica adaptados a cada paciente e enquadramento clínico (Dimitriadis et al., 2022).

Apesar de ainda não ocupar uma posição claramente definida nesta área, a utilização da IA na medicina reprodutiva revela-se promissora para resolver desafios persistentes e auxiliar na tomada de decisões clínicas, com o objetivo primordial de assegurar o nascimento de bebés saudáveis (Dimitriadis et al., 2022).

1.9 *Life Whisperer* e outros *softwares* de Inteligência Artificial

Um dos *softwares* de IA desenvolvidos com o propósito de avaliar os embriões a partir de uma imagem de um blastocisto é o *Life Whisperer* (LW). Este *software* procura dar assistência aos embriologistas na seleção embrionária, através da atribuição de pontuações aos embriões, que são tanto mais precisas quanto mais perto estão do limite inferior – 0 – ou do limite superior – 10. As classificações atribuídas aos embriões são relativas à sua probabilidade de se atingir uma gravidez, ou seja, a sua viabilidade, e quanto à probabilidade de o embrião ser euploide, ou seja, a sua genética (S. M. Diakiw et al., 2022). Estas duas pontuações, o *Life Whisperer Viability* e o *Life Whisperer Genetics*, podem ser utilizadas em conjunto, proporcionando uma avaliação mais completa do potencial do embrião, ou de forma independente, dependendo das especificidades de cada tratamento de FIV.

O *Life Whisperer* utiliza técnicas de *machine learning*, mais especificamente *deep learning*, para avaliar os embriões. O *machine learning* é um campo da inteligência artificial que permite aos sistemas aprender e evoluir a partir de dados, sem necessitarem de ser explicitamente programados (Jordan & Mitchell, 2015). Já o *deep learning*, um subcampo do *machine learning*, utiliza redes neurais artificiais profundas para detetar padrões complexos nos dados (LeCun et al., 2015). No caso do *Life Whisperer*, as imagens de blastocistos são analisadas através de redes neurais convolucionais, que extraem características subtis para prever a viabilidade e a genética dos embriões, incluindo padrões complexos que são indetetáveis pelo olho humano (Esteve et al., 2017).

Um dos primeiros modelos de IA que surgiu com o objetivo de prever a probabilidade de euploidia de embriões foi o ERICA – *Embryo Ranking Intelligent Classification Algorithm* – em 2020 (Dimitriadis et al., 2022). Este sistema, tal como o LW, tem como fonte de informação apenas uma imagem estática de um blastocisto (Chavez-Badiola et al., 2020).

Outro *software* de IA desenvolvido neste âmbito foi o STORK-A, que demonstrou ser capaz de prever a ploidia de embriões com base em imagens estáticas capturadas às 110h de desenvolvimento embrionário (Barnes et al., 2023).

Mais recentemente surgiram sistemas de IA que analisam a cinética do desenvolvimento embrionário, como é o caso do AIVF. Estes *softwares* requerem a utilização de incubadoras com tecnologia *time lapse* para monitorizar todo o desenvolvimento embrionário, limitando a sua aplicação a centros que utilizam esse tipo de incubadoras. Portanto, os sistemas de IA que utilizam imagens estáticas, como o LW, oferecem uma solução mais acessível e flexível, permitindo a sua utilização em centros que não possuem

incubadoras com tecnologia *time lapse* ou que não as utilizam em todas as culturas embrionárias.

A norma utilizada para citações e referências bibliográficas foi a 7ª edição da *American Psychological Association* (APA).

2 Objetivo do estudo

Este estudo tem como objetivo principal avaliar a efetividade do *software* de IA *Life Whisperer* na identificação de embriões euploides quando aplicado a uma população de pacientes com indicação para PGT-A e com características específicas, limitadas pela Lei Portuguesa: idade igual ou superior a 39 anos, histórico de abortos ou falhas de implantação repetidas ou indicação para PGT-M ou PGT-SR. Para tal, será avaliada a concordância entre as classificações de probabilidade de euploidia dos embriões geradas pelo *software* LW e os resultados do PGT-A obtidos após biópsia embrionária em D5 ou D6.

Esta é uma abordagem inovadora em face do enquadramento legal português para a utilização do PGT-A e proibição do niPGT-A. A confirmar-se a sua validade neste contexto, a utilização deste algoritmo de IA poderá apresentar-se como uma estratégia complementar para a classificação e seleção de embriões para transferência, em casos em que não se pretenda ou não seja permitido realizar PGT-A. Isto poderá ser especialmente importante para a priorização de embriões que apresentam um grau de qualidade elevado ou com a mesma classificação morfológica ou morfocinética.

No entanto, uma vez que os algoritmos de IA são elaborados com base em populações de pacientes heterogéneas, com o intuito de aumentar a representatividade dos dados e a aplicabilidade dos resultados, torna-se imprescindível proceder à sua validação prévia quando se pretende aplicar a tecnologia a populações com características condicionadas, como acontece com este estudo. Seria expectável que esta abordagem permitisse a otimização do processo de seleção de embriões, fornecendo informações adicionais para pacientes que não pretendam ou que não se enquadrem nos critérios legais portugueses para realização do PGT-A, potenciando, desta forma, a identificação de embriões com a maior probabilidade de implantar e de resultar num parto.

Em suma, com este estudo pretende-se avaliar a efetividade do *software* de IA *Life Whisperer* na identificação de embriões euploides e a sua aplicabilidade na prática clínica de

um Centro de PMA cuja atuação, no que se refere à utilização de PGT-A, se encontra enquadrada num contexto legal particular e limitado.

3 Materiais e Métodos

3.1 Desenho Experimental

Este estudo retrospectivo foi realizado com base em imagens de embriões que foram previamente analisados por PGT-A, carregando-as na plataforma *Life Whisperer*, a fim de se comparar a probabilidade de euploidia assim obtida com o resultado do PGT-A.

A definição da população utilizada no estudo seguiu os critérios do protocolo de validação do LW *Genetics* (Life Whisperer, 2021). Incluiu 47 pacientes do sexo feminino com idades compreendidas entre os 22 e os 48 anos, que recorreram ao *Instituto Extremeño de Reproducción Asistida* (IERA) em Lisboa, entre julho de 2019 e fevereiro de 2024, para tratamento em contexto de casal ou monoparental de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) com oócitos próprios e PGT-A, com biópsia embrionária ao quinto ou sexto dia de desenvolvimento (Tabela 1). Excluíram-se os embriões cujos resultados do PGT-M ou PGT-SR indicaram a presença do gene mutado ou da translocação cromossómica *à priori*, pois nestes casos não se procede ao PGT-A.

Todos os embriões incluídos no estudo estiveram em cultura na incubadora *timelapse Geri*®, permitindo a obtenção de imagens estáticas dos embriões, que foram descarregadas através do *software Geri*® *Connect & Assess* e posteriormente carregadas no *software* LW. O LW é uma aplicação *web* localizada na nuvem e a sua utilização depende da introdução de credenciais, que permitem aceder a uma área da plataforma privada e única a cada Centro. Na sua interface foi possível introduzir a informação necessária à identificação inequívoca de cada ciclo e carregar as imagens dos embriões correspondentes. Da utilização do LW resultou, para cada embrião, uma classificação numérica entre 0 e 10, com uma probabilidade crescente de euploidia.

Cumprindo os requisitos da plataforma LW, apenas foram recolhidas imagens com uma resolução mínima de 480 x 480 pixels de embriões em estágio de blastocisto, num plano de focagem que permitisse a visualização completa do embrião, mas com a ICM em foco. Foram descarregadas as últimas imagens disponíveis dos embriões antes da sua biópsia e vitrificação, e em casos de colapsos que impediram a visualização da massa celular interna, foi recolhida a última imagem antes de o embrião colapsar. Apesar de ser recomendada a

utilização de imagens de embriões que se encontrem no quinto dia de desenvolvimento, também foram incluídas imagens de embriões que atingiram o estágio de blastocisto ao sexto dia.

Os embriões identificados como mosaicos após PGT-A, sendo apenas seis e representando uma pequena percentagem das populações de embriões, foram excluídos para evitar um possível fator de confusão nas análises, que requerem uma categorização binária dos embriões em euploides e aneuploides.

Assim sendo, os dados recolhidos foram agrupados e analisados de duas formas distintas, estabelecendo duas populações com base na inclusão ou exclusão de embriões em D6. Desta forma, a população “Total de embriões” inclui 170 blastocistos em D5 e D6 de desenvolvimento, enquanto a população de “Embriões D5” inclui exclusivamente os 112 embriões em D5 (Tabela 1).

	Total de embriões	Embriões D5
Número de pacientes	47	34
Data dos tratamentos	07/2019 – 02/2024	07/2019 – 10/2023
Número de ciclos	52	36
Número de ciclos PGT-A	46	31
Número de ciclos PGT-M+A	4	3
Número de ciclos PGT-SR+A	2	2
Média de ciclos por paciente (intervalo)	1,11 (1-2)	1,06 (1-2)
Média de embriões por coorte (intervalo)	3,37 (1-9)	3,19 (1-9)
Média das idades das pacientes (intervalo)	40,67 (22-48)	40,47 (22-48)
Número de imagens de embriões ¹	176	118
Número de embriões aneuploides (%)	126 (72%)	80 (68%)
Número de embriões mosaico (%)	6 (3%)	6 (5%)
Mosaico de alto risco	4	4
Mosaico de médio risco	1	1
Mosaico de baixo risco	1	1
Número de embriões euploides (%)	44 (25%)	32 (27%)
Número de embriões transferidos (%)	32 (18%)	26 (22%)

Tabela 1. Caracterização das populações em estudo: “Total de embriões” e “Embriões D5” (1 – número de imagens de embriões correspondente ao número de embriões biopsados).

De seguida, foram recolhidos os resultados do PGT-A correspondentes a cada embrião, previamente classificados como euploides, aneuploides e mosaicos de baixo, médio e alto risco. Estes resultados, fornecidos pela *Igenomix* e *Bioarray*, foram considerados como

verdade absoluta. A *Igenomix* classifica embriões com base em critérios específicos nos quais um embrião é considerado euploide se apresentar menos de 30% de células aneuploides, sendo designado como aneuploide se possuir mais de 70%. Os embriões com uma proporção de células aneuploides entre 31% e 50% são classificados como mosaicos de baixo risco, já os com 51% a 70% são categorizados como mosaicos de alto risco. Já a *Bioarray* classifica embriões como de “baixo risco” quando o nível de mosaicismo é inferior a 50%, como de “médio risco” quando o nível de mosaicismo é superior a 50% e como de “alto risco” quando as alterações afetam os cromossomas 13, 22 e os cromossomas sexuais.

Ao ser um estudo retrospectivo, sem influência nas decisões clínicas, o consentimento informado específico para a realização desta análise foi dispensado devido à preservação do anonimato dos pacientes e à assinatura prévia de documento do Centro IERA que prevê a possibilidade da utilização de dados clínicos e laboratoriais anonimizados em estudos considerados relevantes.

3.2 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do *software* GraphPad Prism versão 10.2.2 e RStudio versão 4.4.0.

Foram seguidas as indicações para validação do LW *Genetics* (Life Whisperer, 2021) no que respeita à análise da performance do *software*.

Inicialmente, os embriões foram agrupados em quatro categorias de probabilidade de euploidia, predefinidas pelo LW, de acordo com os resultados fornecidos pelo mesmo: “Baixa” para pontuações entre 0 e 2.4, “Média” para pontuações entre 2.5 e 7.4, “Alta” para pontuações entre 7.5 e 8.9, e “Muito alta” para pontuações entre 9 e 10. Com base nesta classificação e nos resultados do PGT-A de cada embrião, foi possível calcular a percentagem de embriões previamente diagnosticados como euploides e aneuploides em cada categoria, cuja significância estatística foi avaliada através do Teste Qui-quadrado para tendência linear. Este teste permitiu verificar se existia uma correlação positiva evidente na distribuição de embriões euploides ao longo das quatro categorias de probabilidade de euploidia, desde a “Baixa” até à “Muito alta”.

Com o objetivo de se avaliar a performance da IA na classificação de embriões, foram criadas matrizes de confusão para ambas as populações em estudo, contendo o número de embriões euploides corretamente classificados como tal – Verdadeiros Positivos (VP) e

erradamente classificados – Falsos Negativos (FN), bem como o número de embriões aneuploides corretamente classificados como tal – Verdadeiros Negativos (VN) e erradamente classificados – Falsos Positivos (FP). Para esta classificação binária, os embriões com pontuações iguais ou acima de 5 foram considerados euploides e os embriões com pontuações abaixo de 5 foram considerados aneuploides (Ver Milyea et al., 2020). Através destes dados foi possível calcular a especificidade, a sensibilidade, o valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e o Coeficiente de correlação de *Matthews* da classificação embrionária. Para além disso, foram criadas uma curva Característica de Operação do Recetor (ROC) e uma curva de Precisão-Sensibilidade, calculando-se as respetivas áreas sob a curva (AUC).

Adicionalmente, para determinar o limiar ótimo de classificação, aplicou-se o método da média geométrica. Desta forma, estabeleceu-se o ponto de corte específico para a população em estudo, o que permitiu uma reavaliação do desempenho do *software* neste contexto e o ajuste das categorias de probabilidade de euploidia.

Relativamente à análise das anomalias cromossómicas, foram determinadas as frequências de aneuploidias para cada um dos 22 autossomas e para o cromossoma X dos embriões na população em estudo. Também foram calculados a média e o desvio padrão da pontuação atribuída pelo *Life Whisperer Genetics* para cada uma das anomalias cromossómicas e para os embriões euploides.

Por fim, realizou-se um estudo piloto sobre a viabilidade dos blastocistos, no qual foram calculados a média e o desvio padrão da pontuação atribuída pelo *Life Whisperer Viability* para cada grau de classificação embrionária - A, B e C - relativamente aos blastocistos não expandidos e expandidos das populações em estudo.

4 Desenvolvimento e Resultados

4.1 Distribuição dos embriões em classes de probabilidade de euploidia

Foram recolhidas imagens de todos os blastocistos em estudo, bem como o diagnóstico genético correspondente. Posteriormente, as imagens dos embriões foram carregadas no *software Life Whisperer*, que atribuiu uma pontuação de 0 a 10 a cada embrião, correspondente à sua probabilidade de ser euploide. Também foram recolhidos os dados relativos à viabilidade dos embriões, pontuada pela IA.

Com base na pontuação atribuída pelo *LW Genetics*, os embriões foram distribuídos em quatro categorias de probabilidade de euploidia: Baixa, Média, Alta e Muito alta. Deste modo, juntamente com a informação relativa à ploidia dos embriões, foi possível determinar a percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada uma das quatro categorias.

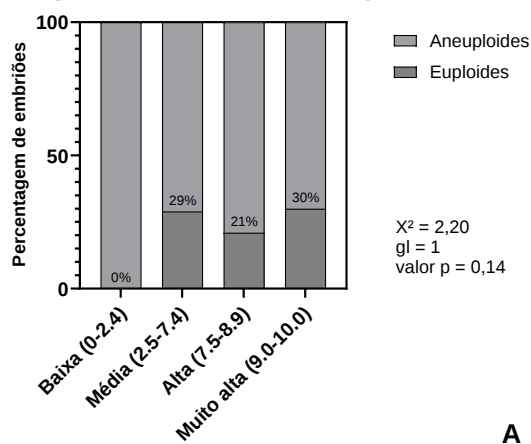
Inicialmente, esta análise foi realizada utilizando todos os dados de embriões disponíveis, totalizando 170, incluindo os que estavam em D5 e D6 de desenvolvimento (Figura 1A). Para avaliar a existência de uma tendência linear significativa na distribuição de embriões euploides e aneuploides entre as categorias de probabilidade de euploidia, realizou-se o teste qui-quadrado para tendência linear. Obteve-se um valor p igual a 0,14, sugerindo que não existem evidências estatisticamente significativas para rejeitar a hipótese nula de que não há uma tendência linear na distribuição dos embriões euploides e aneuploides entre as categorias.

Além disso, observou-se que os embriões de D6 apresentaram uma tendência contrária à esperada na distribuição de embriões euploides em cada categoria. Ainda que, tal como nas outras populações em estudo, se verifique a ausência de embriões euploides na categoria de probabilidade “Baixa”, observa-se uma tendência decrescente da percentagem de embriões euploides a partir da categoria de probabilidade “Média” até às categorias de probabilidade “Alta” e “Muito alta”. O valor p para este grupo foi de 0,16, indicando que não existe uma tendência linear estatisticamente significativa na distribuição de embriões euploides para os embriões de dia 6 (Figura 1C). Deste modo, podemos inferir que os embriões de D6 são os responsáveis pela introdução de variabilidade que afeta a identificação de uma tendência linear na análise da população total.

Perante este resultado, compreendeu-se a necessidade de incluir apenas embriões em D5, conforme recomendado pelo *software* de IA. Utilizando esta população, obteve-se uma maior relevância estatística, com um valor p de 0,01 (Figura 1B). Este resultado sugere a existência de uma tendência linear significativa na distribuição de embriões euploides entre as quatro categorias de probabilidade de euploidia, rejeitando-se a hipótese nula com um risco de 1%.

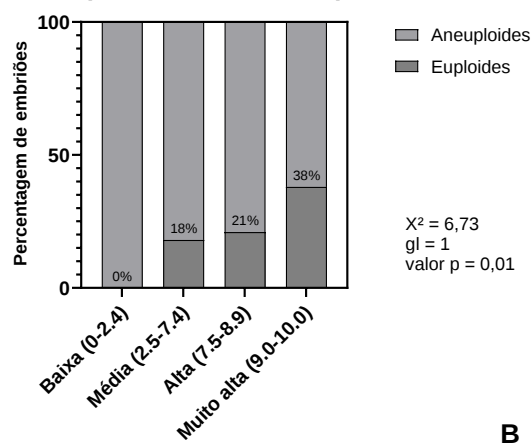
Contudo, estes resultados necessitam de ser avaliados com cautela devido à falta de homogeneidade na distribuição das categorias de probabilidade de euploidia, havendo classes a representar cerca de 10% da totalidade da população e uma classe representativa de mais de 50% da população (Tabela 2).

Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria (Total de embriões; N=170)



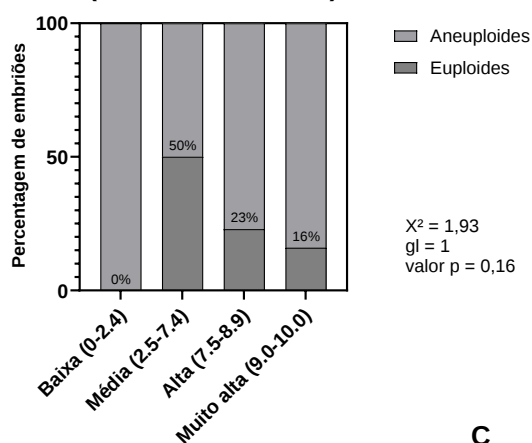
Categoria de probabilidade de euploidia

Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria (Embriões D5; N=112)



Categoria de probabilidade de euploidia

Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria (Embriões D6; N=58)



Categoria de probabilidade de euploidia

Figura 1. Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria de probabilidade de euploidia para cada uma das populações estudadas. A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento; C: população de embriões no 6º dia de desenvolvimento. O método estatístico utilizado foi o teste qui-quadrado para tendência linear (gl, graus de liberdade).

A	Total de Embriões (N = 170)	Euploides	Aneuploides	Total	(%)
	Baixa (0.0-2.4)	0	8	8	5%
	Média (2.5-7.4)	5	12	17	10%
	Alta (7.5-8.9)	10	37	47	28%
	Muito alta (9.0-10.0)	29	69	98	58%

B	Embriões D5 (N = 112)	Euploides	Aneuploides	Total	(%)
	Baixa (0.0-2.4)	0	7	7	6%
	Média (2.5-7.4)	2	9	11	10%
	Alta (7.5-8.9)	7	27	34	30%
	Muito alta (9.0-10.0)	23	37	60	54%

Tabela 2. Distribuição dos embriões euploides e aneuploides nas quatro categorias de probabilidade de euploidia para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.

4.2 Avaliação do desempenho do modelo

Em seguida, foram construídas matrizes de confusão, considerando os embriões classificados com uma pontuação maior ou igual a 5 como euploides e os classificados com uma pontuação inferior a 5 como aneuploides. Utilizando os dados de PGT-A como verdade absoluta, foi possível calcular os verdadeiros positivos, falsos positivos, verdadeiros negativos e falsos negativos (Tabela 3).

A	Total de Embriões (N = 170)	Euploide	Aneuploide		Sensibilidade	95,5%
	Classificado como euploide	VP = 42	FP = 112	154	Especificidade	11,1%
					VPP	27,3%
	Classificado como aneuploide	FN = 2	VN = 14	16	VPN	87,5%
					<i>C. Matthews</i>	0,10
		44	126			

B

Embriões D5 (N = 112)	Euploide	Aneuploide		Sensibilidade	96,9%
Classificado como euploide	VP = 31	FP = 68	99	Especificidade	15,0%
Classificado como aneuploide	FN = 1	VN = 12	13	VPP	31,3%
				VPN	92,3%
				C. Matthews	0,17
	32	80			

Tabela 3. Matrizes de confusão e métricas de desempenho do *Life Whisperer Genetics* na classificação de embriões euploides e aneuploides, para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento, utilizando o 5 como ponto de corte. VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; C. Matthews: Coeficiente de correlação de Matthews.

Na análise da totalidade dos embriões, as métricas de desempenho indicam que o *Life Whisperer Genetics* possui uma elevada sensibilidade de 95,5%, o que significa que é eficaz a identificar corretamente os embriões euploides. No entanto, o modelo demonstra uma especificidade baixa, de apenas 11,1%, o que significa que apenas uma pequena fração de embriões aneuploides é corretamente identificada. Relativamente ao valor preditivo positivo (VPP), este demonstra que um embrião só é realmente euploide em apenas 27,3% das vezes em que é considerado como tal, sugerindo uma probabilidade considerável de falsos positivos. Por outro lado, o valor preditivo negativo (VPN) é de 87,5%, sugerindo que os embriões preditos como aneuploides são, na maioria das vezes, realmente aneuploides. O valor de 0,10 do coeficiente de correlação de Matthews sugere que este modelo tem uma performance ligeiramente melhor do que uma classificação aleatória, mas ainda é bastante modesta.

Quando se consideram apenas os embriões no 5º dia de desenvolvimento, o *Life Whisperer* demonstra uma especificidade ligeiramente aumentada, de 15,0%, o que sugere uma melhor capacidade de identificar embriões aneuploides. Da mesma forma, a sensibilidade permanece alta, com 96,9%, mantendo-se a eficácia na identificação de embriões euploides. O valor preditivo positivo (VPP) é ligeiramente mais elevado, com 31,3%, indicando um risco reduzido, mas ainda significativo, de falsos positivos. Já o valor preditivo negativo (VPN) é de 92,3%, aumentando a probabilidade de um embrião ser realmente aneuploide quando é classificado como tal. O aumento no coeficiente de correlação de

Matthews para 0,17 reflete um melhor desempenho do *Life Whisperer* nos embriões em quinto dia de desenvolvimento, mas, ainda assim, permanece longe de uma classificação útil.

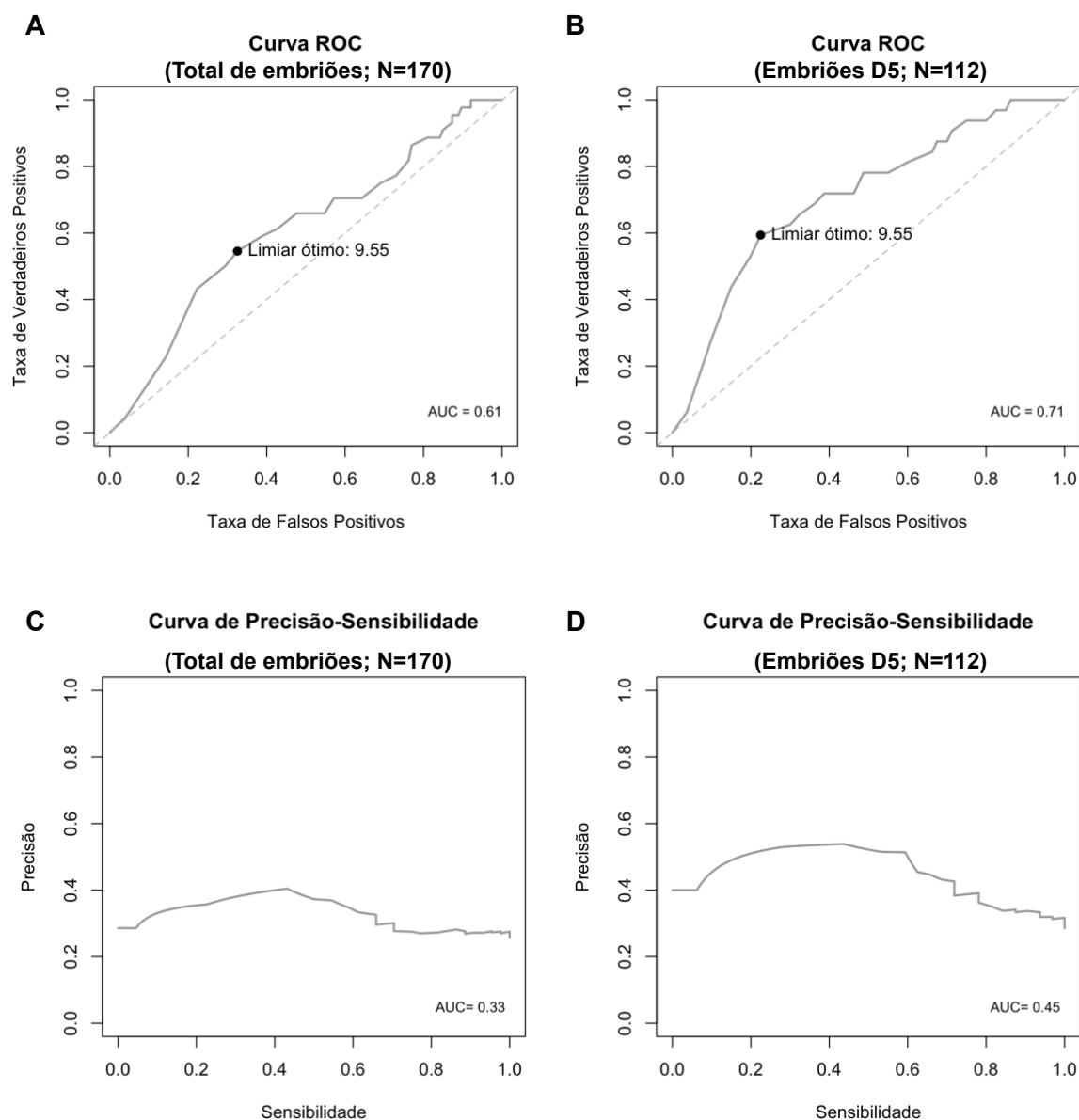


Figura 2. Curvas ROC e de Precisão-Sensibilidade para as populações em estudo: A, C: população total de embriões; B, D: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.

Foi elaborada uma curva ROC para avaliar a capacidade do *Life Whisperer* em distinguir entre embriões euploides e aneuploides (Figura 2). A Área Sob a Curva (AUC) de 0,61 para a população geral (Figura 2A) sugere que o *Life Whisperer* supera um modelo

aleatório, mostrando uma capacidade razoável na classificação. No entanto, há margem para melhorias na precisão. Por outro lado, a AUC mais elevada de 0,71 para embriões no quinto dia de desenvolvimento (Figura 2B) indica que o *Life Whisperer* é mais eficaz nesta fase específica de desenvolvimento, demonstrando um desempenho mais consistente.

Para além da curva ROC, foi construída uma curva de Precisão-Sensibilidade para fornecer informações complementares (Figura 2). Neste caso, os valores de AUC são de 0,33 para a população geral (Figura 2C) e 0,45 para embriões de dia cinco (Figura 2D). A curva de Precisão-Sensibilidade foi construída com o propósito de fornecer informações complementares, revelando-se importante especialmente em cenários com conjuntos de dados desequilibrados. Neste caso, o valor de AUC do *Life Whisperer* é de 0,33 para toda a população de embriões, indicando que o modelo possui dificuldades significativas em equilibrar a precisão e a sensibilidade de forma eficaz, sugerindo que, ao tentar maximizar a precisão para reduzir os falsos positivos, pode comprometer os verdadeiros positivos, resultando numa baixa sensibilidade. Já o valor de AUC relativo à população de embriões em quinto dia de desenvolvimento, de 0,45, revela um desempenho ligeiramente superior, indicando que a IA consegue obter um equilíbrio mais favorável entre a precisão e a sensibilidade neste subgrupo de embriões.

4.3 Determinação do ponto de corte para distinguir entre embriões euploides e aneuploides

Tendo em conta que a performance do *software* não se revelou a ideal ao utilizar o limiar de 5 para distinguir entre embriões euploides e aneuploides, apresentando uma especificidade baixa, apesar de uma sensibilidade alta, foi necessário calcular o valor de corte mais adequado. Para tal, aplicou-se o método da média geométrica aos resultados previamente obtidos da curva ROC. Assim, determinou-se que o limiar ótimo para a classificação, com a média geométrica mais elevada de 0,606, é o 9,55.

Atendendo ao novo ponto de corte, os limites das categorias “Alta” e “Muito alta”, que anteriormente incluíam pontuações de 7,5 a 8,9 e 9,0 a 10, respetivamente, foram reajustados. Assim, a categoria “Alta” passou a englobar pontuações de 7,5 a 9,5, enquanto a “Muito alta” passou a incluir apenas embriões com pontuações de 9,6 a 10,0. Esta alteração assegura que os embriões com pontuações entre 9,0 e 9,5, que anteriormente estavam incluídos na categoria “Muito alta”, sejam redistribuídos para a categoria “Alta”, reservando a

classificação "Muito alta" exclusivamente para aqueles que superaram a pontuação de 9,55 (Tabela 4).

Além de se verificar, à partida, uma tendência para a atribuição de pontuações mais altas por parte do modelo, refletindo-se em percentagens superiores a 50% na categoria "Muito alta" e de cerca de 30% na categoria "Alta" (Tabela 2), o valor de corte ótimo de 9,55 vem reforçar a ocorrência deste fenómeno. Para além disso, os embriões classificados com uma pontuação superior a 9,55 constituem uma grande percentagem da totalidade da população de embriões, representando 38% dos embriões da população "Total de Embriões" e 33% da população "Embriões D5" (Tabela 4).

A	Total de Embriões (N = 170)	Euploides	Aneuploides	Total	(%)
	Baixa (0.0-2.4)	0	8	8	5%
	Média (2.5-7.4)	5	12	17	10%
	Alta (7.5-9.5)	15	65	80	47%
	Muito alta (9.6-10.0)	24	41	65	38%

B	Embriões D5 (N = 112)	Euploides	Aneuploides	Total	(%)
	Baixa (0.0-2.4)	0	7	7	6%
	Média (2.5-7.4)	2	9	11	10%
	Alta (7.5-9.5)	11	46	57	51%
	Muito alta (9.6-10.0)	19	18	37	33%

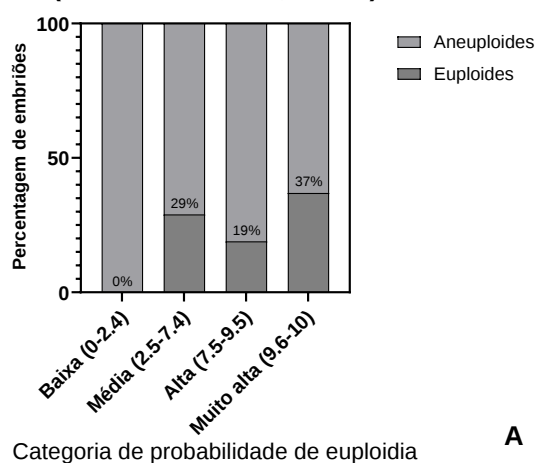
Tabela 4. Distribuição dos embriões euploides e aneuploides pelas categorias de probabilidade de euploidia, reestabelecendo os limites das categorias "Alta" e "Muito alta" tendo em consideração o ponto de corte = 9,55, para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.

Tendo em consideração este novo ponto de corte, determinou-se a percentagem de embriões euploides e aneuploides nas categorias de probabilidade de euploidia reajustadas.

Observou-se que, quanto à população total, dos 98 embriões inicialmente classificados na categoria "Muito alta" (Tabela 2A), 65 apresentavam uma pontuação superior a 9,55 (Tabela 4A). Entre esses 65 embriões, 37% eram de facto euploides e 63% eram aneuploides (Figura 3A). Já na população de embriões em D5, dos 60 embriões inicialmente incluídos na mesma categoria (Tabela 2B), 37 obtiveram pontuação superior a 9,55 (Tabela 4B), sendo que, desses, 51% eram realmente euploides e 49% aneuploides (Figura 3B).

Verificou-se que a proporção de embriões euploides na categoria "Alta" diminui em ambas as populações, passando de 21% para 19%. No entanto, na categoria "Muito alta", observa-se um aumento na percentagem de embriões euploides: de 30% para 37% na população total e de 38% para 51% na população de embriões em D5 (Figura 1; Figura 3). Isto representa um aumento na confiança de que, quando um embrião é classificado nesta categoria, seja realmente euploide.

Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria (Total de embriões; N=170)



Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria (Embriões D5; N=112)

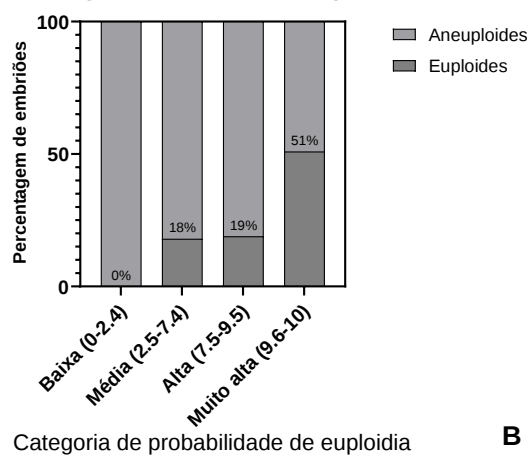


Figura 3. Percentagem de embriões euploides e aneuploides em cada categoria de probabilidade de euploidia, reestabelecendo os limites das categorias "Alta" e "Muito alta" tendo em consideração o ponto de corte = 9,55, para cada uma das populações estudadas. A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.

Tendo isto em conta, a performance da IA foi avaliada novamente, utilizando agora o valor de corte de 9,55 na construção das matrizes de confusão.

Ao comparar os resultados obtidos utilizando o ponto de corte ideal, de 9,55, e o ponto de corte utilizado inicialmente, de 5, verifica-se uma diminuição considerável da sensibilidade. No que diz respeito à população geral de embriões, a sensibilidade cai de 95,5% para 54,5%. Da mesma forma, entre os embriões de dia 5, a sensibilidade reduz de 96,9% para 59,4%, refletindo uma menor capacidade de detetar embriões euploides. No entanto, esta redução na sensibilidade é acompanhada por melhorias significativas na especificidade. Para a população geral de embriões, a especificidade aumenta de 11,1% para 67,5%, enquanto nos embriões D5, passa de 15,0% para 77,5%. Esta melhoria na especificidade

reflete uma redução considerável no número de embriões aneuploides erroneamente classificados como euploides (Tabela 3; Tabela 6).

Além disso, o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) também exibem melhorias com o ponto de corte de 9,55, especialmente evidentes nos embriões D5. O VPP aumenta de 31,3% para 51,4%, indicando uma maior probabilidade de que os embriões classificados como euploides sejam de facto euploides. O VPN permanece alto em ambas as populações, o que sugere que embriões classificados como aneuploides têm uma alta probabilidade de serem de facto aneuploides, apesar da mudança no ponto de corte. Relativamente ao Coeficiente de correlação de *Matthews*, verifica-se um aumento em ambas as populações, o que significa que há uma melhoria no poder preditivo do sistema (Tabela 3; Tabela 6).

Conclui-se que, embora a sensibilidade seja sacrificada com o aumento do ponto de corte para 9,55, há uma melhoria substancial na especificidade, nos valores preditivos positivo e negativo e no Coeficiente de *Matthews*. Por outro lado, há um aumento significativo da percentagem de embriões euploides entre aqueles com pontuação acima de 9,55 – 51% (Figura 3B) – comparativamente à percentagem observada na categoria “Muito alta” – 38% (Figura 1B).

A

Total de Embriões (N = 170)	Euploide	Aneuploide		Sensibilidade	54,5%
Classificado como euploide	VP = 24	FP = 41	65	Especificidade	67,5%
Classificado como aneuploide	FN = 20	VN = 85	105	VPP	36,9%
				VPN	81,0%
				C. <i>Matthews</i>	0,20
	44	126			

B

Embriões D5 (N = 112)	Euploide	Aneuploide		Sensibilidade	59,4%
Classificado como euploide	VP = 19	FP = 18	37	Especificidade	77,5%
Classificado como aneuploide	FN = 13	VN = 62	75	VPP	51,4%
				VPN	82,7%
				C. Matthews	0,35
	32	80			

Tabela 5. Matrizes de confusão e métricas de desempenho do *Life Whisperer Genetics* na classificação de embriões euploides e aneuploides, para as populações em estudo: A: população total de embriões; B: população de embriões no 5º dia de desenvolvimento, utilizando o 9,55 como ponto de corte. VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; C. *Matthews*: Coeficiente de correlação de *Matthews*.

4.4 Análise de anomalias cromossômicas

Paralelamente às avaliações previamente descritas, procedeu-se ao estudo da frequência das anomalias cromossômicas na população em estudo (Tabela 7).

Em primeiro lugar, realizou-se uma pequena análise da frequência de todas as anomalias cromossômicas, e os dados foram condensados na Tabela 7, que detalha a incidência de diferentes tipos de aneuploidias, incluindo monossomias, trissomias, duplicações e deleções, para cada um dos 22 autossomas e para o cromossoma X.

Os resultados revelam que os cromossomas 15, 16, 21 e 22 apresentam a frequência de anomalias mais elevada, corroborando os dados da literatura existente, que identificam estes cromossomas como os mais suscetíveis a falhas de segregação (Herbert et al., 2015). Em particular, o cromossoma 22 destaca-se com o maior número total de aneuploidias, surgindo em 30 casos, seguido pelos cromossomas 16, com 23 casos, o cromossoma 15, com 21 casos e o cromossoma 21, com 19 casos.

Cromossoma	Monossomia	Monossomia parcial	Trissomia	Trissomia parcial	Duplicação	Deleção	Total
1	1	0	2	0	0	0	3
2	2	2	4	1	1	1	11
3	2	0	1	0	0	0	3
4	4	0	1	1	0	0	6
5	1	0	2	2	0	0	5
6	3	0	4	1	0	1	9
7	3	0	3	1	1	0	8
8	3	0	6	0	0	0	9
9	3	1	7	0	1	0	12
10	5	0	4	0	0	0	9
11	8	0	5	0	0	0	13
12	1	0	3	0	2	0	6
13	6	0	3	1	0	0	10
14	2	1	2	0	0	0	5
15	11	0	10	0	0	0	21
16	13	0	9	1	0	0	23
17	1	1	2	0	0	0	4
18	6	0	3	0	0	0	9
19	8	0	5	0	0	0	13
20	6	0	8	0	0	0	14
21	13	0	6	0	0	0	19
22	15	1	14	0	0	0	30
X	3	0	0	1	1	0	5
	120	6	104	9	6	2	247

Tabela 6. Frequência de aneuploidias para cada um dos 22 autossomas e para o cromossoma X dos embriões da população em estudo.

De seguida, a média das pontuações atribuídas pelo *Life Whisperer Genetics* foi calculada para cada uma das categorias de embriões: euploides, com monossomias simples, com trissomias simples, com monossomias múltiplas, com trissomias múltiplas e aneuploidias mistas (Figura 4). Como seria de esperar, os embriões euploides apresentaram pontuações mais elevadas para a probabilidade de euploidia e simultaneamente desvios padrões relativamente baixos, indicando uma menor variabilidade nas pontuações e, portanto, uma maior consistência nos resultados. Contudo, observou-se uma anomalia na análise total dos embriões, na qual as trissomias simples apresentaram uma pontuação de 9,15, ligeiramente superior à dos embriões euploides.

As aneuploidias simples, incluindo monossomias e trissomias, apresentaram pontuações de probabilidade de euploidia mais elevadas do que as aneuploidias múltiplas. Este padrão sugere que uma única anomalia cromossômica é menos prejudicial para a normalidade genética do que anomalias múltiplas. Para além disso, dentro da categoria de aneuploidias simples, as trissomias atingiram pontuações mais altas do que as monossomias, o que indica que as trissomias podem ser menos disruptivas para a integridade genética do que as monossomias.

Os elevados desvios padrões observados em todas as categorias, especialmente nas monossomias múltiplas e nas aneuploidias mistas, destacam uma variabilidade significativa na probabilidade de esses embriões serem euploides, indicando uma maior incerteza na determinação dessas probabilidades.

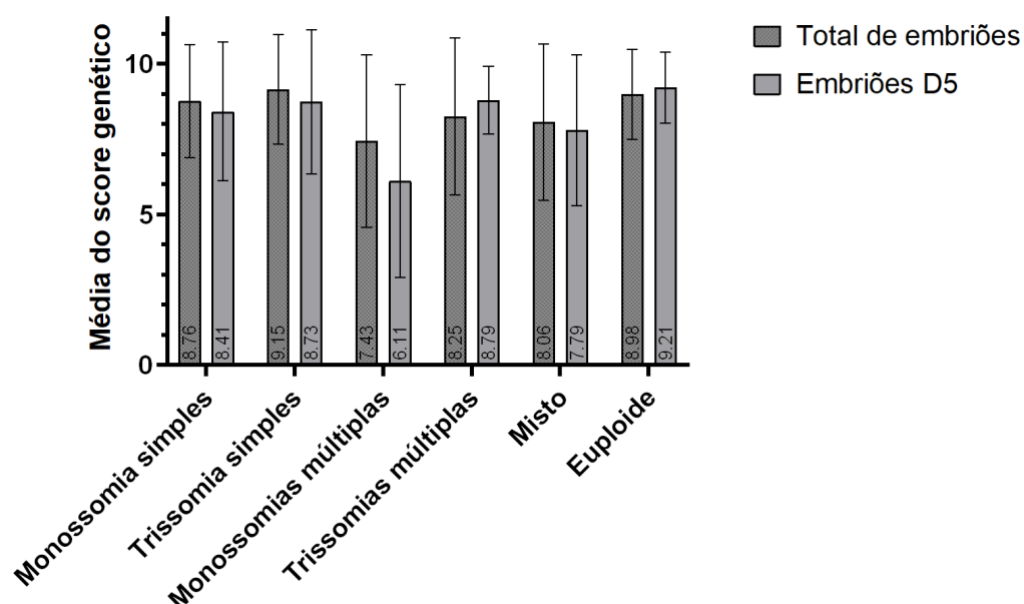


Figura 4. Média da pontuação atribuída pelo *Life Whisperer Genetics* para cada uma das anomalias cromossômicas e para os embriões euploides para as populações em estudo: população total de embriões; população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.

4.5 Estudo Piloto sobre a pontuação da Viabilidade embrionária vs Classificação morfológica

Após o estudo do desempenho da *Life Whisperer Genetics*, realizou-se um pequeno estudo piloto sobre a viabilidade, utilizando a mesma população de embriões, comparando a pontuação atribuída pelo *software* com a classificação embrionária considerada pelo laboratório, na qual se aplicou o sistema de classificação da ASEBIR.

O sistema de classificação da ASEBIR categoriza os embriões em graus, sendo o A o de maior qualidade, seguido pelo B e C. Para este estudo, os embriões foram ainda divididos em dois grupos: blastocistos expandidos e não expandidos, visto que a expansão e a morfologia são fortes indicadores da viabilidade embrionária (Thompson et al., 2013; Zhao et al., 2019).

A análise dos resultados revela uma forte correlação entre as pontuações de viabilidade e as classificações atribuídas pelas embriologistas do laboratório IERA Lisboa (Figura 5). Os embriões de melhor qualidade, de grau A, apresentaram consistentemente pontuações de viabilidade superiores aos de grau B, que por sua vez foram superiores às dos de grau C. Esta tendência foi evidente tanto em blastocistos expandidos como não expandidos.

Os blastocistos expandidos apresentaram pontuações mais elevadas do que os não expandidos em todos os graus, evidenciando o impacto significativo da expansão na viabilidade embrionária. Por exemplo, os embriões de grau A expandidos tiveram uma pontuação média de viabilidade de 7,8, comparada com 5,4 para os embriões de grau A não expandidos. Da mesma forma, os embriões de Grau B expandidos apresentaram uma média de 6,5, enquanto os não expandidos obtiveram 2,4. Este padrão também se verificou nos embriões de Grau C, com os expandidos a registarem uma média de 5,4 em comparação com 1,5 para os não expandidos. Estes resultados destacam o impacto positivo da expansão do blastocisto na sua viabilidade.

Para além disso, os dados relativos aos blastocistos expandidos exibiram uma menor variabilidade, traduzindo-se em desvios padrão mais baixos. Por exemplo, embriões de grau A expandidos apresentaram um desvio padrão de 1,35, significativamente inferior ao desvio padrão de 3,11 observado nos não expandidos. Esta consistência sugere que os embriões expandidos são mais uniformemente de alta qualidade morfológica.

A análise dos embriões exclusivamente em D5 reforçou estes resultados, mostrando que os blastocistos expandidos ao quinto dia obtiveram níveis de viabilidade mais elevados e menor variabilidade em comparação com os não expandidos, destacando a importância da expansão na determinação da viabilidade embrionária.

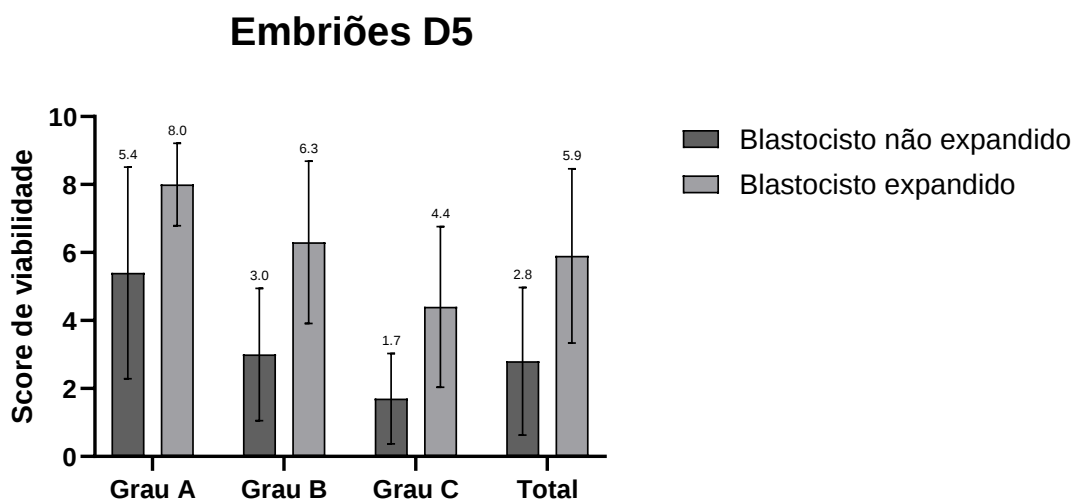
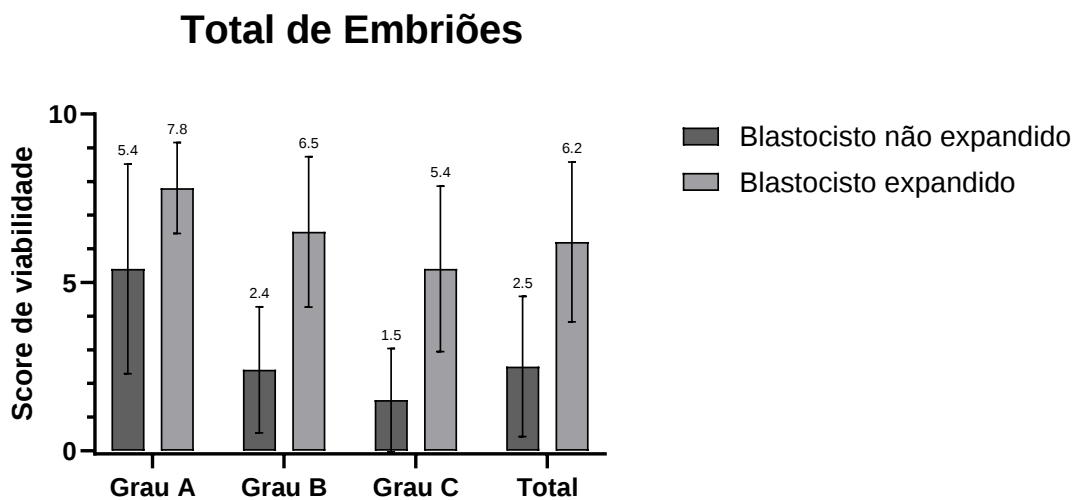


Figura 5. Média da pontuação atribuída pelo *Life Whisperer Viability* para cada grau de classificação embrionária (A, B e C) relativamente aos blastocistos não expandidos e expandidos para as populações em estudo: população total de embriões; população de embriões no 5º dia de desenvolvimento.

4.6 Discussão dos resultados

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do *software Life Whisperer Genetics* na previsão da euploidia de embriões humanos, no contexto de um Centro de PMA português. Para tal, foi seguido o protocolo de validação preconizado pela própria *Life Whisperer*, que designa a divisão dos embriões em quatro categorias de probabilidade de euploidia e a associação do resultado genético de cada embrião após PGT-A, permitindo o cálculo da proporção de embriões euploides e aneuploides em cada categoria. Segundo este protocolo,

os resultados esperados seriam uma correlação positiva evidente entre as categorias de probabilidade de euploidia, com um aumento da proporção de embriões euploides desde a categoria “Baixa” até à categoria “Muito alta”.

Após recolha das pontuações atribuídas pelo *LW Genetics*, observou-se que os embriões euploides foram predominantemente classificados nas categorias de probabilidade de euploidia alta e muito alta, com uma tendência linear significativa evidenciada apenas quando se consideraram os embriões no quinto dia de desenvolvimento. Este resultado sugere que a inclusão de embriões de D6, embora morfológicamente semelhantes aos de D5, pode introduzir uma variabilidade que compromete a robustez dos resultados. A decisão inicial de incluir os embriões em D6, ainda que não seja o recomendado pelo *software*, deveu-se ao facto de os embriões possuírem ritmos de desenvolvimento diferentes e alguns atingirem a fase de blastocisto expandido, passível de ser biopsado, apenas no D6. Por outro lado, por questões de logística do laboratório e eficiência, existe uma preferência de biopsar todos os embriões da mesma coorte no mesmo dia, o que, devido à referida assincronia, leva a que alguns embriões sejam biopsados apenas em D6, apesar de já estarem expandidos em D5. Com esta avaliação verificou-se que o modelo apresenta uma efetividade mais próxima do esperado para embriões em D5.

Contudo, apesar de os resultados obtidos terem evidenciado, de facto, uma tendência positiva significativa no caso dos embriões em D5, a percentagem de embriões euploides em cada uma das categorias foi mais baixa do que o expectável. Isto significa que, no processo inicial de validação, a probabilidade de um embrião, classificado na categoria “Muito alta” ser de facto euploide era de apenas 38%, enquanto o esperado seria uma probabilidade de cerca de 77%. No que respeita às categorias “Média” e “Alta”, observa-se que apenas 18% e 21% dos embriões nelas incluídos, respetivamente, são verdadeiramente euploides. Esta ocorrência foi substancialmente mais baixa que a expectável, que seria de cerca de 48% para a categoria “Média” e 60% para a “Alta”, o que apesar de ir contra os resultados previstos pelo modelo, nos permitiu ter uma maior confiança de que embriões com pontuações inferiores a 9.0 têm uma baixa probabilidade de serem euploides. Por outro lado, os resultados obtidos na categoria “Baixa” revelam que a probabilidade de um embrião com pontuação inferior a 2.4 ser euploide foi nula, apesar de a probabilidade esperada ser de 42%. Este resultado indica que a plataforma nunca atribuiu pontuações inferiores a 2,4 a embriões euploides, revelando, neste contexto, uma eficácia superior ao esperado.

O facto de, em cada categoria, se observar uma percentagem de embriões euploides inferior à previamente descrita no modelo é uma ocorrência que merece ser discutida em pormenor. Este fenómeno pode ser atribuído, por exemplo, ao facto de a população em estudo ser limitada pela legislação, com a grande maioria dos pacientes com idade superior a 39 anos e, consequentemente, com maior probabilidade de aneuploidias. De facto, a proporção de embriões aneuploides neste estudo foi cerca de 70% (Tabela 1), enquanto na população utilizada para o desenvolvimento do LW esta proporção foi entre 30-40% (Ver Milyea et al., 2020). Esta pode ser uma explicação para a percentagem de embriões euploides ser mais baixa do que o esperado em todas as categorias. Uma vez que a população utilizada para criar o algoritmo tinha idades compreendidas entre os 19 e os 53 anos (Ver Milyea et al., 2020), sendo mais heterogénea relativamente à idade das pacientes do que a utilizada para o estudo, podemos colocar a hipótese de que existe esta limitação do *software* e supor que a especificidade da população em estudo pode condicionar os resultados, o que reforça a ideia de que é imprescindível a validação prévia do LW no contexto específico em que será aplicado. Em estudos futuros, seria de interesse realizar esta mesma validação do LW *Genetics* em casos de pacientes elegíveis para PGT-A não pelo critério da idade, mas pela manifestação de falhas repetidas de implantação embrionária após três ou mais transferências embrionárias, dois ou mais abortos clínicos de causa desconhecida, PGT-M ou PGT-SR. Deste modo, seria possível compreender melhor a influência da idade materna na performance do LW.

Considerando os resultados obtidos, inicialmente estes indicaram uma sensibilidade elevada, sobretudo para a população de embriões no quinto dia de desenvolvimento, ou seja, o modelo identificava corretamente a maioria dos embriões euploides. Em contrapartida, a especificidade demonstrava ser baixa, sugerindo um número considerável de falsos positivos, o que apontava para que, ainda assim, uma percentagem significativa de embriões aneuploides era considerada euploide. No entanto, ao ajustar o ponto de corte para a divisão entre embriões provavelmente euploides e aneuploides, de 5 para 9,55, observou-se uma melhoria na especificidade, nos valores preditivos positivos e negativos e no Coeficiente de correlação de *Matthews*, ainda que à custa de uma redução na sensibilidade.

Tal como já referido, verificou-se logo à partida que o modelo demonstrava uma tendência para atribuir classificações mais altas mesmo no caso de embriões aneuploides, facto que é comprovado pelo limiar ótimo de 9,55. Uma das consequências desta inclinação é uma distribuição heterogénea dos embriões nas categorias de probabilidade de euploidia, o que compromete a robustez das análises subsequentes. Uma possível justificação para a

ocorrência de pontuações extremamente elevadas é o tipo de câmara utilizada para a captação de imagens dos embriões, que no presente estudo foi a câmara da incubadora *timelapse Geri®*. A qualidade das imagens utilizadas contrasta com as imagens recolhidas entre 2011 e 2020, provenientes de uma diversidade de microscópios óticos, utilizadas para o desenvolvimento e treino do *software*. Desta forma, a qualidade das imagens utilizadas para este estudo poderá explicar a grande proporção de embriões que foram classificados com pontuações acima de 9 pelo LW.

A identificação de um limiar ótimo distinto do inicialmente descrito no modelo permitiu-nos propor novos critérios de inclusão para as categorias “Alta” e “Muito alta”, passando estas a incluir os embriões classificados com pontuações entre 7,5 – 9,5 e 9,6 – 10,0. Apesar de a percentagem de embriões euploides ter diminuído na categoria “Alta”, esta aumentou na categoria “Muito alta”, o que significa que houve um aumento da confiança de que um embrião classificado nesta categoria seja euploide.

De forma a complementar este estudo, foi analisada a frequência das anomalias cromossómicas, tendo-se observado que esta se encontra em linha com a literatura existente, destacando os cromossomas 15, 16, 21 e 22 como os mais suscetíveis a falhas de segregação. Por fim, observou-se uma correlação positiva entre a qualidade embrionária atribuída pelas embriologistas e as pontuações de viabilidade atribuídas pelo LW *Viability*, reforçando a validade do *software* na previsão da viabilidade embrionária. Para além disso, verificou-se que a pontuação de viabilidade aumenta com o grau de qualidade morfológica dos embriões e com o grau de expansão do blastocisto, destacando a importância destes fatores como indicadores de viabilidade.

Apesar dos resultados promissores, este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas.

Tendo em conta que a idade da paciente está fortemente correlacionada com a ocorrência de aneuploidias (Mikwar et al., 2020), poderíamos pensar que um modelo como o LW, de previsão da ploidia dos embriões, deveria ter em consideração a idade da paciente, para além avaliação morfológica do embrião a partir de uma imagem estática. No entanto, um estudo de Perugini et al., 2022 propôs que os efeitos da idade na qualidade embrionária são inerentes à morfologia do embrião, pelo que não considera necessário adicionar a informação relativa à idade como uma variável adicional. Contudo, os resultados obtidos no presente estudo indicam que, para que a efetividade do modelo se mantenha próxima da esperada, este deve ser previamente validado no contexto em que vai ser aplicado.

Por outro lado, um estudo realizado com o *software Life Whisperer* indicou que a performance ótima para classificação e seleção de embriões euploides foi observada às 120 horas pós-fertilização, embora a capacidade preditiva se mantenha em vários momentos do quinto dia de desenvolvimento (S. Diakiw et al., 2023). Contudo, para a realização deste estudo foram utilizadas imagens de embriões relativas ao último momento antes do congelamento ou a biópsia do embrião, exceto nas situações em que os colapsos embrionários impediram a visualização da massa celular interna, nas quais o momento de captura foi anterior. Apesar de terem sido utilizadas as últimas imagens disponíveis dos embriões por serem consideradas as mais fidedignas, o estudo sugere que se o momento da captura das imagens tivesse sido padronizado, especificamente às 120 horas pós-fertilização, a performance do modelo poderia ter sido melhor. Não podemos excluir a hipótese de que tal padronização exercesse um efeito particularmente importante nos resultados obtidos com os embriões que foram biopsados em D6. Em estudos futuros, seria interessante utilizar imagens de embriões às 120 horas de desenvolvimento, que correspondem a D5, em vez de a última imagem disponível do embrião, de modo a compreender a importância da utilização de embriões de D5 neste *software*.

Adicionalmente, num estudo de Zhu et al., 2024, a duração dos colapsos dos blastocistos até à sua reexpansão foi considerada um bom fator preditor de aneuploidias. Tendo isto em consideração, estes autores sugerem que a duração dos colapsos dos embriões deve ser incluída com uma variável significativa em algoritmos para previsão de gravidez. Ou seja, visto que as capturas de imagens dos embriões foram feitas antes dos colapsos ou após as reexpansões, o algoritmo não teve em conta esta variável, que poderá ser importante considerar quando se prevê a sua ploidia. Esta limitação poderia ser ultrapassada se, em vez de uma única imagem estática, se utilizassem vídeos do desenvolvimento embrionário, permitindo não só ter em conta os colapsos, mas muitas outras informações temporais e espaciais que poderiam melhorar significativamente a performance preditiva do algoritmo (Barnes et al., 2023). Contudo, a utilização de imagens estáticas possibilita que este *software* seja utilizado por um maior número de Centros de PMA, uma vez que a utilização de incubadoras com tecnologia *time lapse* é ainda limitada.

Outro fator que pode introduzir limitações nos resultados são os critérios utilizados para definir um embrião mosaico, que podem variar entre laboratórios de genética. Por essa razão, os seis embriões mosaico da população em estudo foram excluídos da análise. Este facto, juntamente com a constituição de um grupo exclusivamente composto por embriões em D5, condicionou a dimensão da população estudada, que incluiu 118 embriões. Apesar de

estar dentro do proposto pelo estudo de validação, que sugeria uma análise de entre 100 e 200 embriões, podemos supor que, se a amostra estivesse mais perto do limite superior, a análise estatística teria maior robustez.

Por fim, é importante referir que no decurso do estudo, em favor da consistência da apresentação dos resultados, manteve-se a análise dos dois grupos de dados em paralelo, Total de embriões e Embriões em D5, dando-se, no entanto, mais ênfase à discussão dos resultados obtidos para o grupo de dados referente aos Embriões em D5.

Conclusão

Dada a importância de se transferir apenas um embrião, especialmente na fase de blastocisto, de forma a reduzir as taxas de gravidez gemelar devido às suas implicações para a saúde materna e do bebé, mas sem comprometer a taxa de gravidez num ciclo de PMA, torna-se importante seleccionar o embrião com maior probabilidade de dar origem a um bebé saudável. Neste sentido, a embriologia clínica baseia-se na aplicação de diversos sistemas de seleção embrionária, incluindo métodos de avaliação da ploidia. Têm surgido diversos métodos não invasivos como alternativa ao PGT-A, cuja aplicação se mantém controversa devido a possíveis riscos associados à biópsia embrionária ou a limitações relacionadas com o contexto legal de cada país. Atualmente, o foco dos métodos não invasivos tem sido direccionado para a análise de DNA presente no meio de cultura e para modelos de inteligência artificial.

Assim, o LW surgiu como uma solução promissora, especialmente em países como Portugal, em que existe um enquadramento legal específico para a utilização do PGT-A e onde o niPGT-A não está autorizado. Neste contexto, apresentando-se como um método complementar à classificação morfológica ou morfocinética, com potencial para beneficiar os pacientes não elegíveis para PGT-A e potenciar a seleção, na primeira transferência, de um embrião com elevada probabilidade de implantação, reduzindo assim o número de tentativas necessárias para obtenção de gravidez, assim como o tempo para o nascimento de um bebé saudável. No caso de pacientes que não podem recorrer ao PGT-A e que têm um número elevado de embriões, a deteção da probabilidade de um embrião ser euploide é crucial. Este tipo de IA poderia ajudar a identificar qual o embrião com maior probabilidade de ser viável e euploide, reduzindo o tempo até se atingir uma gravidez (TTP) ao mesmo tempo que mantém

baixo o número médio de embriões transferidos em cada transferência, que se pretende que seja próximo de 1.

Este estudo investigou a performance do *software* LW *Genetics* no contexto do Centro de PMA IERA Lisboa, comparando as classificações de probabilidade de euploidia assim obtidas, com os resultados do PGT-A. Os resultados obtidos sugerem que a sua aplicabilidade é influenciada pela idade das pacientes, que por sua vez é influenciada pelo contexto legal em que o Centro se insere, e pelo dia de desenvolvimento embrionário, sendo a sua efetividade maior quando aplicado a embriões em D5 e após o ajuste dos limites de inclusão nas categorias “Alta” e “Muito Alta”. Por fim, a ocorrência de uma menor percentagem de embriões euploides em cada uma das categorias de probabilidade de euploidia quando comparada com o modelo do algoritmo, bem como a identificação de um ponto de corte distinto do descrito para o modelo de IA confirma a importância de validar o *software in loco*, antes da sua utilização. Após este estudo, podemos afirmar que embriões em D5 que obtenham uma classificação LW *Genetics* superior a 9,55 têm uma maior probabilidade de euploidia do que embriões com classificações inferiores. No entanto, este ponto de corte poderá não ser aplicável a pacientes com idade inferior a 39 anos ou embriões em D6.

Numa primeira análise, confirmou-se uma tendência linear significativa na distribuição de embriões euploides pelas quatro categorias crescentes de probabilidade de euploidia, apenas para o caso da população de embriões em D5. Para além disso, os resultados obtidos no decurso da validação do LW evidenciaram a sua efetividade na identificação de embriões euploides, especialmente quando ajustado o ponto de corte das categorias de classificação. A sensibilidade inicialmente elevada do LW para embriões no quinto dia de desenvolvimento demonstrou ser significativa, embora tenha sido acompanhada por uma especificidade reduzida, indicando uma proporção considerável de falsos positivos. No entanto, os ajustes nos critérios de classificação melhoraram a especificidade, os valores preditivos positivos e negativos e o Coeficiente de *Matthews*, tornando o LW uma ferramenta mais robusta na seleção de embriões euploides para transferência. A determinação de um novo ponto de corte adequado aos dados da população em estudo, para além de aumentar o poder preditivo do sistema, permitiu o ajuste das categorias de probabilidade de euploidia, reservando a categoria “Muito alta” para apenas embriões com uma pontuação acima de 9,55, aumento a probabilidade de identificar de facto embriões euploides nesta categoria.

Adicionalmente, a correlação observada entre as classificações de viabilidade do LW e a qualidade embrionária considerada por embriologistas reforça a validade do *software* como um preditor confiável da viabilidade embrionária.

Apesar de apresentar resultados promissores, estes demonstram que o *software* ainda não está completamente adaptado para a aplicação direta em laboratório, sem que antes se realize um estudo de validação *in loco*. Isto revelou ser especialmente importante ao considerar o contexto legal português, no qual apenas mulheres com idade superior a 39 anos ou com outros fatores específicos podem realizar o PGT-A. Este fator foi responsável por limitar a população elegível para a validação do LW como ferramenta complementar na seleção de embriões euploides para transferência, bem como os resultados obtidos.

Tendo em conta os dados publicados por Ver Milyea et al., 2020, que apoiam o uso do *LW Genetics* para avaliar a ploidia dos embriões, seria expectável que se alargássemos o estudo também à população de pacientes que não são elegíveis para PGT-A, no contexto nacional, poderíamos não só aumentar a probabilidade de selecionar embriões euploides para transferência, como também embriões viáveis, dado que a pontuação atribuída pelo *software* aparenta estar em linha com a classificação atribuída pelas embriologistas. No entanto, uma vez que a concordância das pontuações atribuídas pelo *software* com a ploidia determinada pelo PGT-A não é total, para além de existir um risco de classificar erradamente embriões euploides como aneuploides, esta IA não poderá ser utilizada para descartar embriões, mas apenas como um sistema de priorização de embriões para transferência.

Por outro lado, o facto de se terem obtido resultados distintos daqueles descritos no modelo do algoritmo de IA, reforça a importância da realização do estudo prévio de validação nestes tipos de sistema, *in loco*, uma vez que as condições laboratoriais, tais como o ambiente, a temperatura, o pH, os meios de cultura, os tipos de estimulação ovárica e os procedimentos e protocolos utilizados, bem como com as características populacionais inerentes a cada Centro, podem influenciar a pontuação atribuída pelo *software*.

Para superar as limitações identificadas, estudos futuros poderiam incluir a idade da paciente como uma variável na análise, estabelecer um momento padronizado para a captura de imagens de embriões, incorporar a duração do colapso e reexpansão do blastocisto nos modelos preditivos, utilizar vídeos do desenvolvimento embrionário para capturar informações temporais e espaciais mais detalhadas e procurar uma maior padronização na classificação dos embriões mosaicos entre laboratórios de genética. Para além disso, apesar de estudos demonstrarem que a influência da idade materna está refletida na imagem do embrião, seria

interessante averiguar a performance do *software* em faixas etárias distintas e avaliar se o seu poder preditivo é influenciado negativamente por este fator, especialmente em embriões provenientes de mulheres de idade superior a 38 anos, como na população aqui em estudo. Neste sentido, para tentar compreender melhor a influenciada da idade materna na performance do LW, seria interessante realizar esta mesma validação do *LW Genetics* em casos de pacientes elegíveis para PGT-A não pelo critério da idade, mas pela manifestação de falhas repetidas de implantação embrionária após três ou mais transferências embrionárias, dois ou mais abortos clínicos de causa desconhecida, PGT-M ou PGT-SR.

Essas melhorias poderiam potencialmente aumentar a precisão e a aplicabilidade do *Life Whisperer Genetics*, contribuindo para melhores práticas na seleção embrionária em clínicas de fertilidade, sendo particularmente útil no contexto legal português, quando aplicado a pacientes que, embora não sendo elegíveis como beneficiários das técnicas de PGT-A ou não pretendam recorrer a estas, possuem um elevado número de embriões transferíveis.

Bibliografia

- Amini, P., Ramezanali, F., Parchehbaf-Kashani, M., Maroufizadeh, S., Omani-Samani, R., & Ghaheri, A. (2021). Factors associated with in vitro fertilization live birth outcome: A comparison of different classification methods. *International Journal of Fertility and Sterility*, 15(2). <https://doi.org/10.22074/ijfs.2020.134582>
- Bacal, V., Li, A., Chan, C., Rana, U., Matelski, J., Philippopoulos, E., & Shapiro, H. (2022). MISCLASSIFICATION OF PREIMPLANTATION GENETIC TESTING FOR ANEUPLOIDY: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. *Fertility and Sterility*, 118(4). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.08.069>
- Balaban, B., Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., Ebner, T., Gardner, D., Hardarson, T., Lundin, K., Cristina Magli, M., Mortimer, D., Mortimer, S., Munné, S., Royere, D., Scott, L., Smits, J., Thornhill, A., Van Blerkom, J., & Van Den Abbeel, E. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 26(6). <https://doi.org/10.1093/humrep/der037>
- Barnes, J., Brendel, M., Gao, V. R., Rajendran, S., Kim, J., Li, Q., Malmsten, J. E., Sierra, J. T., Zisimopoulos, P., Sigaras, A., Khosravi, P., Meseguer, M., Zhan, Q., Rosenwaks, Z., Elemento, O., Zaninovic, N., & Hajirasouliha, I. (2023). A non-invasive artificial intelligence approach for the prediction of human blastocyst ploidy: a retrospective model development and validation study. *The Lancet. Digital health*, 5(1), e28–e40. [https://doi.org/10.1016/S2589-7500\(22\)00213-8](https://doi.org/10.1016/S2589-7500(22)00213-8)
- Beaujouan, É., & Sobotka, T. (2021). Late Motherhood in Low-Fertility Countries: Reproductive Intentions, Trends and Consequences. *Institut für Demographie - VID*, 1. <https://doi.org/10.1553/0x003cd014>
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Hickman, C. F. L. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive BioMedicine Online*, 26(5), 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.006>
- Carvalho, F., Coonen, E., Goossens, V., Kokkali, G., Rubio, C., Meijer-Hoogeveen, M., Moutou, C., Vermeulen, N., & De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. *Human Reproduction Open*, 2020(3). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa021>

- Casper, R. F. (2023). PGT-A: Houston, we have a problem. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 40(10), 2325–2332. <https://doi.org/10.1007/S10815-023-02913-W>
- Chavez-Badiola, A., Flores-Saiffe-Farías, A., Mendizabal-Ruiz, G., Drakeley, A. J., & Cohen, J. (2020). Embryo Ranking Intelligent Classification Algorithm (ERICA): artificial intelligence clinical assistant predicting embryo ploidy and implantation. *Reproductive biomedicine online*, 41(4), 585–593. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2020.07.003>
- Chen, L., Li, W., Liu, Y., Peng, Z., Cai, L., Zhang, N., Xu, J., Wang, L., Teng, X., Yao, Y., Zou, Y., Ma, M., Liu, J., Lu, S., Sun, H., & Yao, B. (2022). Non-invasive embryo selection strategy for clinical IVF to avoid wastage of potentially competent embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 45(1). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.03.006>
- Clark, G., Babariya, D., Del, A., Cano, C., Fernández Marcos, E., Parnell, L., Kilbee, M., Ceban, V., Infantes, B., Coudereau, C., Spath, K., & Wells, D. (2023). P-727 New methods reveal the true incidence of DNA contamination in PGT-A samples for the first time and avoid errors that could result in serious misdiagnoses. *Human Reproduction*, 38(Supplement_1). <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAD093.337>
- CNPMA. (2021). *Deliberação sobre Testes Genéticos Pré-Implantação*. <https://www.cnpma.org.pt/profissionais/Paginas/testes-geneticos.aspx>
- CNPMA. (2023). *Deliberação n.º 1-III/2023, de 20 de janeiro Sobre Teste Genético Pré-Implantação de Aneuploidias Não Invasivo*.
- CNPMA. (2024). *Relatório da Atividade desenvolvida pelos Centros de PMA em 2021*.
- Cox, C. M., Thoma, M. E., Tchangalova, N., Mburu, G., Bornstein, M. J., Johnson, C. L., & Kiarie, J. (2022). Infertility prevalence and the methods of estimation from 1990 to 2021: A systematic review and meta-analysis. Em *Human Reproduction Open* (Vol. 2022, Número 4). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoac051>
- Cuevas Saiz, I., Carme Pons Gatell, M., Vargas, M. C., Delgado Mendive, A., Rives Enedáguila, N., Moragas Solanes, M., Carrasco Canal, B., Teruel López, J., Busquets Bonet, A., & Hurtado de Mendoza Acosta, M. V. (2018). The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*, 5(1). <https://doi.org/10.1016/j.medre.2017.11.002>

- Diakiw, S., Hall, J. M. M., VerMilyea, M. D., Lim, A. Y. X., Chan, C. W., Aizpurua, J., Amin, J., Nguyen, T. V., Perugini, D., & Perugini, M. (2023). P-144 An artificial intelligence algorithm demonstrates optimal performance for evaluating embryo genetic status at 120 hours post-fertilization. *Human Reproduction*, 38(Supplement_1). <https://doi.org/10.1093/humrep/dead093.508>
- Diakiw, S. M., Hall, J. M. M., VerMilyea, M., Lim, A. Y. X., Quangkananurug, W., Chanchamroen, S., Bankowski, B., Stones, R., Storr, A., Miller, A., Adaniya, G., van Tol, R. A., Hanson, R., Aizpurua, J., Giardini, L., Johnston, A., Van Nguyen, T., Dakka, M. A., Perugini, D., & Perugini, M. (2022). An artificial intelligence model correlated with morphological and genetic features of blastocyst quality improves ranking of viable embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 45(6). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.07.018>
- Dimitriadis, I., Zaninovic, N., Badiola, A. C., & Bormann, C. L. (2022). Artificial intelligence in the embryology laboratory: a review. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(3), 435–448. <https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2021.11.003>
- Esteva, A., Kuprel, B., Novoa, R. A., Ko, J., Swetter, S. M., Blau, H. M., & Thrun, S. (2017). Dermatologist-level classification of skin cancer with deep neural networks. *Nature*, 542(7639). <https://doi.org/10.1038/nature21056>
- Fragouli, E., & Wells, D. (2011). Aneuploidy in the human blastocyst. *Cytogenetic and Genome Research*, 133(2–4). <https://doi.org/10.1159/000323500>
- Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., & Schoolcraft, W. B. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73(6). [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00518-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00518-5)
- Greco, E., Litwicka, K., Minasi, M. G., Cursio, E., Greco, P. F., & Barillari, P. (2020). Preimplantation genetic testing: Where we are today. Em *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 12, pp. 1–29). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21124381>
- Guzman, L., Nuñez, D., López, R., Inoue, N., Portella, J., Vizcarra, F., Noriega-Portella, L., Noriega-Hoces, L., & Munné, S. (2019). The number of biopsied trophectoderm cells may affect pregnancy outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(1). <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1331-1>

- Herbert, M., Kalleas, D., Cooney, D., Lamb, M., & Lister, L. (2015). Meiosis and Maternal Aging: Insights from Aneuploid Oocytes and Trisomy Births. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A017970>
- Jiang, V. S., & Bormann, C. L. (2023). Noninvasive genetic screening: current advances in artificial intelligence for embryo ploidy prediction. *Fertility and Sterility*, 120(2). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2023.06.025>
- Jordan, M. I., & Mitchell, T. M. (2015). Machine learning: Trends, perspectives, and prospects. *Em Science* (Vol. 349, Número 6245). <https://doi.org/10.1126/science.aaa8415>
- Kadioglu, N., Kahyaoğlu, İ., Kaplanoglu, İ., Dilbaz, S., & Engin Üstün, Y. (2023). Evaluation of Clinical Outcomes after Poor-Quality Embryo Transfer and Prognostic Parameters. *Journal of Clinical Medicine*, 12(19), 6236. <https://doi.org/10.3390/JCM12196236>
- Kokkali, G., Coticchio, G., Bronet, F., Celebi, C., Cimadomo, D., Goossens, V., Liss, J., Nunes, S., Sfontouris, I., Vermeulen, N., Zakharova, E., & De Rycke, M. (2020). ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Human Reproduction Open*, 2020(3). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa020>
- LeCun, Y., Bengio, Y., & Hinton, G. (2015). Deep learning. *Nature*. *Nature*, 521(7553).
- Lee, H. L., McCulloh, D. H., Hodes-Wertz, B., Adler, A., McCaffrey, C., & Grifo, J. A. (2015). In vitro fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(3), 435–444. <https://doi.org/10.1007/S10815-014-0417-7>
- Lei n.º 32/2006, de 26 de julho, Diário da República n.º 143/2006, Série I de 2006-07-26 5245 (2006). <https://diariodarepublica.pt/dr/detalhe/lei/32-2006-539239>
- Life Whisperer. (2021). *Validation Study Outline*.
- Lledo, B., Morales, R., Antonio Ortiz, J., Bernabeu, A., & Bernabeu, R. (2023). Noninvasive preimplantation genetic testing using the embryo spent culture medium: an update. *Em Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* (Vol. 35, Número 4). <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000881>
- Mandawala, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., & Fowler, K. E. (2016). Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis. *Em*

- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., & Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and sterility*, 98(6). <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2012.08.016>
- Mikwar, M., MacFarlane, A. J., & Marchetti, F. (2020). Mechanisms of oocyte aneuploidy associated with advanced maternal age. Em *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* (Vol. 785). <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2020.108320>
- Munné, S., Kaplan, B., Frattarelli, J. L., Child, T., Nakhuda, G., Shamma, F. N., Silverberg, K., Kalista, T., Handyside, A. H., Katz-Jaffe, M., Wells, D., Gordon, T., Stock-Myer, S., Willman, S., Acacio, B., Lavery, S., Carby, A., Boostanfar, R., Forman, R., ... Alfarawati, S. (2019). Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertility and Sterility*, 112(6). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.07.1346>
- Muñoz, E., Bronet, F., Lledo, B., Palacios-Verdú, G., Martinez-Rocca, L., Altmäe, S., & Pla, J. (2024). To transfer or not to transfer: the dilemma of mosaic embryos – a narrative review. Em *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 48, Número 3). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2023.103664>
- Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C., Rubio, C., & Simón, C. (2022). Non-invasive preimplantation genetic testing for aneuploidies: an update. Em *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 44, Número 5). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2022.01.012>
- Neuber, E., Mahutte, N. G., Arici, A., & Sakkas, D. (2006). Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertility and Sterility*, 85(3). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.08.064>
- Oron, G., Son, W. Y., Buckett, W., Tulandi, T., & Holzer, H. (2014). The association between embryo quality and perinatal outcome of singletons born after single embryo transfers: a pilot study. *Human Reproduction*, 29(7), 1444–1451. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEU079>

- Pagliardini, L., Viganò, P., Alteri, A., Corti, L., Somigliana, E., & Papaleo, E. (2020). Shooting STAR: reinterpreting the data from the 'Single Embryo TrAnsfeR of Euploid Embryo' randomized clinical trial. Em *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 40, Número 4). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2020.01.015>
- Passet-Wittig, J., & Greil, A. L. (2021). On estimating the prevalence of use of medically assisted reproduction in developed countries: A critical review of recent literature. Em *Human Reproduction Open* (Vol. 2021, Número 1). <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa065>
- Penzias, A., Bendikson, K., Butts, S., Coutifaris, C., Falcone, T., Fossum, G., Gitlin, S., Gracia, C., Hansen, K., La Barbera, A., Mersereau, J., Odem, R., Paulson, R., Pfeifer, S., Pisarska, M., Rebar, R., Reindollar, R., Rosen, M., Sandlow, J., ... Widra, E. (2018). The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. *Fertility and Sterility*, 109(3). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.002>
- Perugini, M., Diakiw, S. M., Nguyen, T. V., Perugini, D., Galiana, Y., Rubio, N., Aizpurua, J., VerMilyea, M. D., & Hall, J. M. M. (2022). P-234 AI study shows the effect of patient age on embryo quality is inherent in the morphology of an embryo. *Human Reproduction*, 37(Supplement_1). <https://doi.org/10.1093/humrep/deac107.224>
- Pierce, N., & Mocanu, E. (2018). Female age and assisted reproductive technology. *Global Reproductive Health*, 3(2). <https://doi.org/10.1097/grh.0000000000000009>
- Pinborg, A., Wennerholm, U. B., & Bergh, C. (2023). Long-term outcomes for children conceived by assisted reproductive technology. *Fertility and sterility*, 120(3 Pt 1), 449–456. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2023.04.022>
- Popovic, M., Dhaenens, L., Boel, A., Menten, B., & Heindryckx, B. (2020). Chromosomal mosaicism in human blastocysts: The ultimate diagnostic dilemma. *Human Reproduction Update*, 26(3). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmz050>
- Rubio, C., Navarro-Sánchez, L., García-Pascual, C. M., Ocali, O., Cimadomo, D., Venier, W., Barroso, G., Kopcow, L., Bahçeci, M., Kulmann, M. I. R., López, L., De la Fuente, E., Navarro, R., Valbuena, D., Sakkas, D., Rienzi, L., & Simón, C. (2020). Multicenter prospective study of concordance between embryonic cell-free DNA and trophoctoderm biopsies from 1301 human blastocysts. *American journal of obstetrics and gynecology*, 223(5), 751.e1-751.e13. <https://doi.org/10.1016/J.AJOG.2020.04.035>

- Schaeffer, E., Porchia, L., López-Luna, A., Hernández-Melchor, D., & López-Bayghen, E. (2018). Aneuploidy Rates Inversely Correlate with Implantation during *In Vitro* Fertilization Procedures: In Favor of PGT. Em I. Gomy (Ed.), *Modern Medical Genetics and Genomics* (p. Ch. 3). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81884>
- Schmidt, L., Sobotka, T., Bentzen, J. G., & Andersen, A. N. (2012). Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Human Reproduction Update*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr040>
- Sciorio, R., Cariatì, F., Fleming, S., & Alviggi, C. (2023). Exploring the Impact of Controlled Ovarian Stimulation and Non-Invasive Oocyte Assessment in ART Treatments. *Life*, 13(10), 1989. <https://doi.org/10.3390/life13101989>
- Sundvall, L., Ingerslev, H. J., Breth Knudsen, U., & Kirkegaard, K. (2013). Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(12). <https://doi.org/10.1093/humrep/det366>
- Thompson, S. M., Onwubalili, N., Brown, K., Jindal, S. K., & McGovern, P. G. (2013). Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): A national study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(12). <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0100-4>
- Transfer, E. G. G. on the N. of E. to, Alteri, A., Arroyo, G., Baccino, G., Craciunas, L., De Geyter, C., Ebner, T., Koleva, M., Kordic, K., Mcheik, S., Mertes, H., Pavicic Baldani, D., Rodriguez-Wallberg, K. A., Rugescu, I., Santos-Ribeiro, S., Tilleman, K., Woodward, B., Vermeulen, N., & Veleva, Z. (2024). ESHRE guideline: number of embryos to transfer during IVF/ICSI. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAE010>
- Ver Milyea, M., Hall, J. M. M., Diakiw, S. M., Johnston, A., Nguyen, T., Perugini, D., Miller, A., Picou, A., Murphy, A. P., & Perugini, M. (2020). Development of an artificial intelligence-based assessment model for prediction of embryo viability using static images captured by optical light microscopy during IVF. *Human reproduction (Oxford, England)*, 35(4), 770–784. <https://doi.org/10.1093/HUMREP/DEAA013>
- WHO. (2023). *World Health Organization (WHO) - Infertility prevalence estimates 1990-2021*. 1–98. <https://www.who.int/publications/i/item/978920068315>

- Zaninovic, N., & Rosenwaks, Z. (2020). Artificial intelligence in human in vitro fertilization and embryology. *Fertility and sterility*, 114(5), 914–920. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2020.09.157>
- Zhan, Q., Sierra, E. T., Malmsten, J., Ye, Z., Rosenwaks, Z., & Zaninovic, N. (2020). Blastocyst score, a blastocyst quality ranking tool, is a predictor of blastocyst ploidy and implantation potential. *F and S Reports*, 1(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.xfre.2020.05.004>
- Zhang, W. Y., von Versen-Höynck, F., Kappahn, K. I., Fleischmann, R. R., Zhao, Q., & Baker, V. L. (2019). Maternal and neonatal outcomes associated with trophectoderm biopsy. *Fertility and Sterility*, 112(2). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.033>
- Zhao, J., Yan, Y., Huang, X., Sun, L., & Li, Y. (2019). Blastocoele expansion: An important parameter for predicting clinical success pregnancy after frozen-warmed blastocysts transfer. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0454-2>
- Zhu, J., Zou, J., Wu, L., Xiong, S., Gao, Y., Liu, J., Huang, G., & Han, W. (2024). Total duration of spontaneous blastocyst collapse during the expansion stage is an independent predictor of euploidy and live birth rates. *Reproductive BioMedicine Online*, 49(1). <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2024.103863>