



Universidade Federal do Pará

Instituto de Ciências da Saúde

Faculdade de Medicina

Brenda Mendes de Oliveira

Flora Carolina Leal Nascimento

**BLASTOCISTOS EUPLOIDES: AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITIVOS DE  
FORMAÇÃO ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-  
IMPLANTACIONAL (PGS)**

Belém

2019

Brenda Mendes de Oliveira

Flora Carolina Leal Nascimento

**BLASTOCISTOS EUPLOIDES: AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITIVOS DE  
FORMAÇÃO ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-  
IMPLANTACIONAL (PGS)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
para obtenção do grau em Medicina pela  
Universidade Federal do Pará.

**Orientador:** Prof. João Paolo Bilibio.

Belém  
2019

Brenda Mendes de Oliveira

Flora Carolina Leal Nascimento

**BLASTOCISTOS EUPLOIDES: AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITIVOS DE  
FORMAÇÃO ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-  
IMPLANTACIONAL (PGS)**

**Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do grau em Medicina pela  
Universidade Federal do Pará.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. João Paolo Bilibio/UFPA

---

Profa. Sônia de Fátima da Silva Moreira /UFPA

---

Profa. Cinthya Mara Brito Lins Pereira/UFPA

**Aprovado em:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Conceito:** \_\_\_\_\_

Aos meus professores, que me incentivaram a buscar pelo conhecimento em toda a minha vida. À minha família, que me apoia e está presente em todo meu percurso enquanto pessoa e estudante. E ao meu amor, que esteve ao meu lado em todos os momentos e me ajudou a enfrentar e superar as dificuldades.

***Brenda Mendes de Oliveira.***

Dedico este Trabalho de Conclusão de Curso a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na realização deste sonho, em especial minha família, que sempre me incentivou, motivou e sempre será minha fonte de inspiração.

***Flora Carolina Leal Nascimento.***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecemos imensamente ao nosso ilustre orientador Professor Dr. João Paulo Bilibio, que possibilitou a realização desse trabalho e que teve toda a paciência para nos ensinar. Nós admiramos muito o seu trabalho e agradecemos por seu carinho nesses anos.

Agradecemos à Clínica Pronatus por disponibilizar os dados e o espaço para realização do nosso estudo e aos funcionários que nos receberam com muito carinho durante esse percurso.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta que esse estudo fosse realizado, muito obrigada.

*O nascimento do pensamento é igual ao nascimento de uma criança: tudo começa com um ato de amor. Uma semente há de ser depositada no ventre vazio. E a semente do pensamento é o sonho. Por isso os educadores, antes de serem especialistas em ferramentas do saber, deveriam ser especialistas em amor: intérpretes de sonhos.*

**BUDA**

## **Resumo**

**Introdução:** A aneuploidia é o tipo mais comum de defeito cromossômico e a principal causa de falha na implantação do embrião, aborto espontâneo e anormalidades congênitas em seres humanos. Na fertilização in vitro, o diagnóstico genético pré-implantacional (PGS) permite a seleção de um embrião geneticamente normal para transferência. Porém, cerca de 48% dos embriões que passam por PGS são aneuploides, ou seja, além dos altos custos dessa tecnologia, muitos embriões são biopsiados desnecessariamente. Uma avaliação combinada de parâmetros do desenvolvimento e morfologia embrionária poderia melhorar o procedimento de seleção, sem a necessidade de submeter muitos embriões à técnica de PGS.

**Objetivo:** identificar fatores preditivos para a formação de um embrião euplóide avaliados por PGS.

**Método:** estudo transversal onde foram incluídos 431 embriões de casais com indicação de FIV que foram submetidos a PGS, entre 2013 e 2018. Os embriões foram divididos em euploides e aneuploides. Foram analisados dados acerca do perfil clínico das pacientes; qualidade do óvulo e do sêmen; morfologia e genética do embrião.

**Resultados:** Foram incluídos 426 embriões, sendo divididos em euploides (201) e aneuploides (225). O tipo de trofoectoderme foi significativo na euploidia. Dentre os embriões euploides, 26,9% foram do tipo A, 58,2% do tipo B e 14,9% do tipo C ( $p=0,001$ ). A idade materna também influenciou na formação de um embrião euplóide. 88,6% das pacientes estavam abaixo dos 40 anos e 11,4% estavam acima dos 40 anos ( $p=0,001$ ). A endometriose apresentou valor significativo na euploidia. 91,4% eram de mulheres sem endometriose e 8,6% foram de mulheres com endometriose ( $p = 0,049$ ). A média de idade das mulheres com embriões euploides foi 33,99 anos (DP 3,98), já entre mulheres com embriões aneuploides a média foi 36,48 (DP 4,52) ( $p=0,001$ ). **Conclusão:** A análise demonstrou que a morfologia TIPO A do trofoectoderma de embriões em fase de blastocisto, a ausência de endometriose e a idade da mulher sendo menor que 40 anos, são fatores preditivos para que o embrião seja euploide.

**Palavras-chave:** fator preditivo, aneuploidia, PGS, trofoectoderme.

## **Abstract**

**Introduction:** Aneuploidy is the most common type of chromosomal defect and the leading cause of failure in embryo implantation, miscarriage, and congenital abnormalities in humans. In vitro fertilization, pre-implantation genetic diagnosis (PGS) allows the selection of a genetically normal embryo for transfer. However, about 48% of the embryos that pass through PGS are aneuploid, that is, in addition to the high costs of this technology, many embryos are unnecessarily biopsied. A combined evaluation of developmental parameters and embryonic morphology could improve the selection procedure without the need to submit many embryos to the PGS technique.

**Objective:** to identify predictive factors for the formation of a euploid embryo evaluated by PGS.

**Method:** A cross-sectional study involving 431 embryos of couples with indication of IVF that were submitted to PGS between 2013 and 2018. The embryos were divided into euploids and aneuploid. Data on the clinical profile of the patients were analyzed; quality of egg and semen; morphology and genetics of the embryo.

**Results:** 426 embryos were divided into euploids (201) and aneuploid (225). The type of trophoectoderm was significant in euploidy. Among the euploid embryos, 26.9% were type A, 58.2% type B and 14.9% type C ( $p = 0.001$ ). Maternal age also influenced the formation of a euploid embryo. 88.6% of the patients were under 40 years old and 11.4% were over 40 years old ( $p = 0.001$ ). Endometriosis presented significant euploidy value. 91.4% were women without endometriosis and 8.6% were women with endometriosis ( $p = 0.049$ ). The mean age of women with euploid embryos was 33.99 years (SD 3.98), while among women with aneuploid embryos the mean was 36.48 (SD 4.52) ( $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** The analysis showed that the morphology TYPE A of the trophoectoderm of embryos in the blastocyst phase, the absence of endometriosis and the age of the woman being less than 40 years, are predictive factors for the embryo to be euploid.

**Key words:** predictive factor, aneuploidy, PGS, trophoectoderm.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Aspectos gerais da FIV	11
2.2. Fatores que influenciam no resultado da FIV	12
2.2.1. Disfunção ovulatória	12
2.2.2. Diminuição da reserva ovariana	13
2.2.3. Endometriose	14
2.2.4. Fatores uterinos	15
2.2.5. Fatores masculinos	16
2.3. Classificação embrionária	17
2.3.1. Dia 1 após FIV	17
2.3.2. Dia 2 após FIV	17
2.3.3. Dia 3 e 4 após FIV	17
2.3.4. Formação do Blastocisto	18
2.4. Avaliação embrionária do blastocisto	19
2.5. Diagnóstico Genético Pré-implantacional (PGS)	20
2.6. Transferência de embriões	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Tipo de estudo	22
3.2. População	22
3.3. Critérios de inclusão	22
3.4. Procedimentos	22
3.5. Avaliação e classificação embrionária	24
3.6. Avaliação da fertilização	24
3.7. Análise estatística	27
4. RESULTADOS	27
5. DISCUSSÃO	32
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO	41
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	56

## 1. INTRODUÇÃO

A tecnologia de reprodução assistida (TRA) inclui todos os procedimentos para a fertilização in vitro de gametas humanos e preparo de embriões com o objetivo de estabelecer uma gravidez (CDC, 2016). Até um em cada seis casais terá problemas com a fertilidade, definida como falha na realização de uma gravidez clínica após a relação sexual regular durante 12 meses. Desse modo, cada vez mais os casais estão buscando a TRA para ajudar a conceber um bebê vivo e saudável (FARQUHAR et al, 2015). A TRA inclui a fertilização in vitro (FIV) convencional, a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e todos os processos relacionados, tais como os métodos de estimulação ovariana, monitoramento de ovários, seleção de gametas e as técnicas de fertilização, seleção, cultura e armazenamento de embriões (MAHMOUD et al, 2013).

A infertilidade é definida como uma doença do sistema reprodutivo em que há ausência de uma gravidez clínica após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares não protegidas (ZEGERS-HOCHSCHILD et al, 2009). É considerada por especialistas no campo como um problema que afeta 15-20% dos casais, ressaltando que a causa masculina está presente em cerca de 30-50% dos casos (TURCHI, 2015). A infertilidade também pode ser referida como a incapacidade da gravidez de gerar bebê vivo e pode ser por causa feminina, masculina ou por ambos, sendo primária ou secundária. Na infertilidade primária, os casais nunca foram capazes de conceber; enquanto na infertilidade secundária há dificuldade em conceber depois de uma gravidez (gravidez a termo ou gravidez com aborto). Não é considerada infertilidade secundária nos casos de mudança de parceiros no período de um ano. A infertilidade cervical é a incapacidade dos espermatozoides para chegar ao útero devido ao dano ao colo do útero ou fatores cervicais como estenose cervical, anticorpos antiesperma, muco cervical inadequado, hostil ou não receptivo, e infecções cervicais de doenças sexualmente transmissíveis (Chlamydia, gonorréia, tricomonas, micoplasma hominis e ureaplasma urealyticum) (ENIOLA; ADETOLA; ABAYOMI, 2017).

Aproximadamente 50% dos casais com infertilidade persistente por mais de dois anos precisarão das TRA, desse modo, essas técnicas tornaram-se um tratamento proposto, visto que contornam muitas barreiras naturais para a concepção (MAHMOUD, et al, 2013). A FIV é uma técnica de reprodução assistida amplamente utilizada, esta consiste em uma sequência de procedimentos que envolvem a fecundação extracorpórea de gametas, pode ser convencional ou por ICSI. (ZEGERS-HOCHSCHILD et al, 2017) (BEGUM, 2008). A FIV

foi introduzida pela primeira vez como tratamento para a infertilidade em 1978 e as taxas de sucesso aumentaram de forma constante nas décadas subsequentes. Muitos fatores contribuíram para a melhoria da fertilização *in vitro*, incluindo o advento de novas técnicas e procedimentos laboratoriais, como o tratamento do esperma e do embrião, a criopreservação, a ICSI e o diagnóstico genético pré-implantação (PGS) (BING; OULLETTE, 2009).

As indicações para as TRA têm se expandido significativamente desde o sucesso da primeira gravidez por fertilização *in vitro* (MAHMOUD, et al, 2013). Nos casos de FIV convencional as indicações incluem: endometriose que não respondeu ao tratamento ou à cirurgia; ausência de tubas uterinas ou bloqueio tubário bilateral; doença que não pode ser tratada com sucesso por cirurgia; infertilidade secundária aos anticorpos espermáticos; infertilidade idiopática que não respondeu a outros tratamentos; contagem de esperma ou motilidade baixa com quantidade suficiente para permitir a fertilização no laboratório e doença genética que resulta em aborto espontâneo ou nascimentos anormais. A ICSI, que é um procedimento em que um único espermatozóide é injetado no citoplasma do oócito, é utilizada quando há falha recorrente de fertilização devido a desordens dos gametas, as indicações são: oligospermia grave onde a contagem de espermatozoides é inferior a 5 milhões/ml; atenospermia grave, teratospermia onde mais de 70% dos espermatozoides são morfolologicamente anormais; azoospermia obstrutiva; vasectomia; obstrução inflamatória do canal deferente; disfunção ejaculatória; paraplegia masculina e anticorpos antiesperma em ambos os parceiros masculino e feminino (MAHMOUD, et al, 2013) (BEGUM, 2008).

O processo da FIV consiste em várias etapas: estimulação da ovulação, recuperação de oócitos (punção), fertilização dos óvulos; cultura de embriões, e posteriormente, a transferência de embriões para a cavidade uterina (WDOWIAK; WDOWIAK; BOJAR, 2016). As taxas de gravidez são em torno de 34% por ciclo e uma gravidez cumulativa com taxa aproximada de 90%. O aborto espontâneo é de 19% a 22%, o que é um pouco maior do que para a população fértil. O risco de malformação congênita nas gestações realizadas após a FIV não é superior ao da população em geral, todavia, como a maioria das mulheres que fazem a FIV estão em idade avançada, pode ocorrer uma anomalia relacionada. A incidência de aborto espontâneo, baixo peso ao nascer e prematuridade são maiores nas gravidezes por FIV do que em gravidezes naturais (BEGUM, 2008).

Apesar dos avanços recentes, apenas a minoria dos embriões que são designados de qualidade suficiente conseguem implantar (SCOTT JR et al., 2013). Dado do Centro para

Registro de Controle e Prevenção de Doenças de 2011 indica que nos Estados Unidos menos de 19% dos embriões transferidos progridem para o nascimento de uma criança (CDC, 2011). A aneuploidia é o tipo mais comum de anormalidade cromossômica e a principal causa de falha na implantação, aborto espontâneo e anormalidades congênitas em seres humanos (VIALARD, 2011). Apesar de o desenvolvimento morfológico temporal ser aparentemente normal, a maioria dos embriões não implanta, e muitos dos que conseguem, posteriormente, falham precocemente na gravidez. Desse modo, aneuploidia é uma consideração primária ao avaliar estratégias de triagem para a competência reprodutiva embrionária, pois está relacionada às falhas de implantação embrionária (SCOTT JR et al., 2013).

O diagnóstico genético pré-implantacional (PGS) é a prática de se obter a biópsia celular de um ócito ou embrião humano em desenvolvimento adquirido através FIV, avaliar a composição genética desta amostra e usar essas informações para determinar quais embriões serão ideais para a transferência uterina subsequente (BREZINA, 2011). O PGS melhorou as taxas de implantação e reduziu taxas de aborto espontâneo, particularmente nos pacientes com risco aumentado de produzir embriões aneuploides (LEE et al., 2013). Em particular, a biópsia de trofoderme e o exame cromossômico abrangente, agora, representam a abordagem mais promissora de PGS para detectar aneuploidias (BARASH et al., 2017).

A biópsia embrionária elevou as taxas de implantação para cerca de 70% a 80%, devido a isso, muitos casais com riscos de gerar embriões aneuploides buscam por essa tecnologia (LEE et al., 2013). Atualmente, especialistas buscam no desenvolvimento embrionário, algum fator que possa prever qual embrião teria melhor chance de ser euploide, tentando evitar assim a realização da análise genética desnecessária de embriões sem anormalidades cromossômicas, com isso reduzindo custos, mas mantendo as mesmas taxas elevadas de gravidez.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Aspectos gerais da FIV**

As técnicas de reprodução assistida iniciaram uma nova era na medicina reprodutiva, quando, há mais de 30 anos, resultou na primeira criança concebida *in vitro* na Inglaterra. Desde então, o desenvolvimento tecnológico promoveu maiores taxas de sucesso. Estima-se que aproximadamente 5 milhões de bebês tenham nascido no mundo até hoje por TRA (DE CARVALHO et al., 2013).

Para muitos casais, a única chance de possuir prole será o procedimento de FIV. Os procedimentos de FIV são o método mais eficaz de tratamento da infertilidade, e sua chance de sucesso depende de muitos fatores (WDOWIAK; WDOWIAK; BOJAR, 2016). A FIV consiste em várias etapas: estimulação da ovulação, recuperação de oócitos por punção, fertilização dos óocitos, cultura de embriões e posteriormente, a transferência de embriões para a cavidade uterina.

Para obter óvulos de boa qualidade durante FIV, a estimulação da ovulação é realizada usando gonadotropinas em combinação com a co-administração de um antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou agonista de GnRH (KLEMETTI et al., 2005). As gonadotropinas são dadas sob a forma injeções diariamente para estimular os ovários a produzir múltiplos ovócitos. Após 36 horas de injeção de hCG, os ovócitos maduros são coletados. Isso é feito geralmente com a paciente em sedação profunda ou anestesia geral, e leva entre 10-30 minutos dependendo do número de folículos que cresceram em resposta às drogas (WDOWIAK; WDOWIAK; BOJAR, 2016). A punção folicular é ecoguiada com sonda vaginal. Após a obtenção dos ovócitos e a preparação dos espermatozóides, esses são fertilizados pela FIV clássica método ou injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) de acordo com a qualidade da ejaculação. Os embriões são cultivados durante 3 a 5 dias; e depois são transferidos para o fundo para o útero (HELLANI et al., 2008).

## **2.2. Fatores que influenciam no resultado da FIV**

### **2.2.1. Disfunção ovulatória**

Um dos principais fatores de infertilidade associados ao elemento feminino do casal relaciona-se com as disfunções ovulatórias. Estas são, normalmente, resultado de déficit hormonal, nomeadamente de gonadotrofinas, que afetam o correto ciclo menstrual, representadas por ciclos menstruais irregulares e anovulação. Assim, os tratamentos dos problemas de disfunção ovulatória são, geralmente, determinados por administração de suplementos hormonais, que reestabelecem os níveis de hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). As disfunções ovulatórias incluem também, falência ovárica prematura, amenorreia hipotalâmica, hiperprolactinemia e anomalias da fase lútea (COSTA, 2016).

A síndrome dos ovários policísticos (SOP) representa a principal endocrinopatia ginecológica na idade reprodutiva, sendo considerada a causa mais comum de infertilidade por anovulação. Os tratamentos propostos para a SOP incluem mudanças no estilo de vida,

uso de drogas insulino-sensibilizantes e indutores da ovulação, uso de gonadotrofinas, tratamento cirúrgico com laparoscopia e métodos de reprodução de alta complexidade. (SANTANA, 2008)

A fertilização *in vitro* (FIV) demonstrou ser tratamento eficaz para mulheres com SOP refratárias ao tratamento com indutores da ovulação (DOR, 1990; HOMBURG, 1993). Porém, em estudo realizado por Reis (2004) verificou-se que o sucesso da FIV está comprometido em mulheres com SOP por apresentarem recrutamento de maior número de folículos com diâmetros reduzidos, taxa reduzida de fertilização e elevada taxa de síndrome de hiperestimulação ovariana (SHO).

Em estudo realizado por Resende et al. (2010), foi analisada a concentração dos hormônios esteroides no fluido folicular (FF) de folículos de mulheres com síndrome dos ovários policísticos (SOP) submetidas à hiperestimulação ovariana controlada (HOC) e FIV foi verificado que mulheres com SOP apresentam altas concentrações de testosterona no FF, independentemente do estágio de desenvolvimento folicular, e níveis de progesterona diminuídos, sugerindo que fatores parácrinos podem inibir sua secreção pelas células foliculares. As taxas de gravidez mostraram que o tratamento de HOC e FIV é uma boa opção para mulheres com infertilidade secundária à SOP.

Marquard (2011) determinou que as mulheres com SOP e obesidade têm oócitos menores e que quando subdivididas pelo índice de massa corporal, tanto a SOP como a obesidade influenciam, de forma independente, o tamanho do oócito. Até agora, pouco se sabe sobre a informação genética de oócitos e embriões de pacientes com SOP, e o número limitado de estudos tem se concentrado na aneuploidia antes da concepção. Entretanto, estudo demonstrou que não há relação da aneuploidia com a SOP (WANG, 2016).

### **2.2.2. Diminuição da reserva ovariana**

A reserva ovariana é a quantidade de folículos ovarianos disponíveis para recrutamento. Representa o potencial funcional do ovário por meio da quantidade e da qualidade dos oócitos. Entre os testes para avaliação da reserva ovariana, empregam-se os marcadores bioquímicos, os métodos de imagem e os testes dinâmicos. Os marcadores bioquímicos empregados são: hormônio FSH basal, estradiol, inibina A e B, e fator de inibição mülleriana. Os marcadores de imagem são: contagem dos folículos antrais, volume ovariano total e análise do fluxo das artérias uterinas. Os testes dinâmicos, por sua vez, são: teste após

estímulo com clomifeno e a resposta de estradiol e inibina após estímulo com FSH ou agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (SILVA, et al, 2014).

À medida que a mulher vai envelhecendo, o processo de atresia folicular é acelerado, levando a um decréscimo acentuado tanto do número, como da qualidade dos ovócitos. A baixa qualidade ovocitária reflete-se num aumento do risco de anomalias cromossômicas embrionárias com o avançar da idade materna, resultando num risco aumentado de morte fetal, aborto espontâneo e gravidez ectópica (COSTA, et al, 2016)

Embora a qualidade embrionária, do ponto de vista morfológico, não seja diferente entre mulheres de diferentes faixas etárias, o número de oócitos coletados, o número de embriões transferidos e as taxas de gravidez confirmam que a idade da mulher é um importante fator preditivo das taxas de sucesso das técnicas de reprodução assistida e deve ser levada em consideração no momento da proposta desse tipo de tratamento para mulheres com mais de 40 anos (GOMES et al, 2009). Em estudo realizado por Hourvitz et al (2009), foi evidenciado um declínio acentuado nas taxas clínicas de gravidez e parto, acompanhado por um aumento nas taxas de aborto espontâneo em pacientes com mais de 42 anos de idade.

Pacientes com aborto recorrente e com diminuição da reserva ovariana têm uma porcentagem maior de blastocistos aneuplóides quando comparadas com pacientes com abortos recorrentes, mas com teste de reserva ovariana normal. A diferença é mais significativa em pacientes com idade <38 anos (SHAHINE, et al, 2016).

### **2.2.3. Endometriose**

A endometriose é uma doença crônica, inflamatória, estrogênio-dependente que ocorre durante o período reprodutivo da vida da mulher, caracterizando-se pela presença de tecido endometrial, glândula e/ou estroma, fora da cavidade uterina, sugere-se que o refluxo menstrual atua como facilitador do transporte dos implantes endometriais para a cavidade peritoneal (FEBRASGO, 2014).

O tratamento para infertilidade associada à endometriose ainda permanece obscura. As evidências científicas disponíveis indicam que a supressão da função ovariana apenas com o tratamento hormonal, não melhora as taxas de gravidez. O tratamento cirúrgico é, entretanto, provavelmente eficaz em todos os estágios da doença. Nos casos de endometriose mínima e leve, corrigida cirurgicamente e com anatomia pélvica normal, a inseminação intrauterina, acompanhada de hiperestímulo ovariano controlado, é recomendada. Em casos de

endometriose avançada, especialmente se estiver associada a alterações tubárias, fatores masculinos ou falha de tratamento prévio, após laparoscopia a melhor opção é a fertilização in vitro (FIV) (CROSERÁ et al, 2010; MASSER e TAYLOR, 2012).

Em estudo analisou se a presença de endometriose per se está associada a taxas de gravidez inferiores em mulheres submetidas à fertilização in vitro (FIV), concluiu que nem a presença nem a extensão da endometriose têm efeito prejudicial nas taxas de gravidez por fertilização in vitro e que embora as pacientes com endometriose moderada a grave tenham reserva ovariana significativamente menor, isso não reflete as menores taxas de gravidez (POLAT et al, 2014). Em outra pesquisa, verificou-se que, como um todo, a endometriose, por si só, não está associada a pior resultado da FIV. Uma exceção pode ser o caso de mulheres com reserva ovariana significativamente diminuída, necessitando de estimulação agressiva, resultando em um número comprometido de oócitos e embriões (POLAT et al, 2015).

Juneau et al (2017), , buscou determinar se a endometriose resulta em um risco aumentado de aneuploidia embrionária. Pacientes que se submeteram à FIV, utilizando a triagem genética pré-implantacional (PGS) com endometriose identificada por diagnóstico cirúrgico ou por achados ultrassonográficos foram analisadas. Essa análise descobriu que mulheres com endometriose submetidas à fertilização in vitro não possuem risco aumentado de aneuploidia. Pacientes com endometriose submetidos à fertilização in vitro têm taxas de aneuploidia equivalentes à pacientes da mesma idade que não têm endometriose, sendo provável que a redução do sucesso na reprodução assistida observada em pacientes com endometriose envolva múltiplos mecanismos patológicos. Em estudo realizado com oócitos de bovinos, pela semelhança em tamanho e morfologia com oócitos humanos, foi suposto que o estresse oxidativo no microambiente folicular pode prejudicar a maturação nuclear e promover a gênese de anomalias oocitárias meióticas em mulheres inférteis com endometriose (DA BROU, 2013).

#### **2.2.4. Fatores uterinos**

Entre os fatores uterinos, destacam-se as malformações desse órgão, como a forma uterina anormal e o septo intra-uterino; pólipos, leiomioma e síndrome de Asherman. Míomas grandes podem causar infertilidade ao prejudicar o revestimento uterino, bloqueando as tubas uterinas, distorcendo a forma da cavidade uterina ou alterando a posição do colo do útero (ENIOLA,2017).



A implantação bem sucedida requer um endométrio receptivo, um embrião funcional e conversa cruzada sincronizada entre o endométrio e embrião. Cada vez mais anormalidades estruturais do útero foram reconhecidas como fatores significativos limitantes para o sucesso de fertilização in vitro (PALTER, 2011).

### **2.2.5. Fatores masculinos**

Os fatores masculinos influenciam nos resultados da fertilização in vitro, desse modo, as amostras seminais são analisadas levando em consideração parâmetros macroscópicos e microscópicos. Ao exame macroscópico são avaliados a liquefação, o volume, o Ph, a cor e o cheiro. Já ao exame microscópico avalia-se a motilidade, a vitalidade, a concentração, a hiposmolaridade e a morfologia (ALVES, 2013).

Uma viscosidade elevada associada a uma motilidade reduzida pode ter consequências relevantes na capacidade de fertilização, devido à baixa probabilidade dos espermatozoides conseguirem escapar a um ejaculado tão viscoso (JEYENDRAN, 2003).

A quantidade de espermatozoides com motilidade progressiva influencia a taxa de gravidez (ALVES, 2013), pois aumenta a probabilidade de alcançar o ovócito. Os espermatozoides imóveis são incapazes de migrar pelo muco cervical e mesmo que se encontrem no local de fecundação não conseguem atravessar o cumulus nem a corona radiata, sendo, conseqüentemente, incapazes de penetrar a zona pelúcida (JEYENDRAN, 2003). Deste modo, a motilidade permite prever a capacidade dos espermatozoides para atingir o ovócito.

Para que um espermatozoide seja classificado como normal, nenhum defeito evidente pode ser visível na cabeça, no colo/peça intermédia ou na cauda. Existem, no entanto, diversos tipos de anomalias, que podem ocorrer em cada uma das partes do espermatozoide, sozinhas ou combinadas, devido a erros na espermatogênese ou a patologias nos epidídimos (JEYENDRAN, 2003).

Estudo demonstrou que fatores masculinos severos podem prejudicar a competência embrionária precoce em relação à taxa de fertilização e potencial de desenvolvimento. No entanto, a taxa de euploidia e potencial de implantação dos blastocistos obtidos são independentes da qualidade espermática. Ou seja, os parâmetros utilizados para analisar a qualidade do espermatozoide não influenciam na euploidia embrionária (MAZZILLI, 2017).

### **2.3. Classificação embrionária**

Morfologicamente o embrião pode ser classificado em A: qualidade superior, B: boa qualidade (não para transferência de um único embrião eletivo), C: qualidade embrionária prejudicada, D: não recomenda a transferência (inclui todos os embriões multinucleados).

#### **2.3.1. Dia 1 após FIV**

No primeiro dia após fertilização in vitro, há formação dos pró-núcleos (PN) e a primeira clivagem, encontrando-se, nesse momento, 2 blastômeros. Nesse momento pode-se classificar o tipo do PN em: simétrico, não simétrico e anormal. A categoria anormal inclui PN sem corpos precursores nucleolares e aqueles com um único corpo precursor nucleolar (ALPHA; ESHRE, 2011).

#### **2.3.2. Dia 2 após FIV**

No segundo dia de desenvolvimento embrionário, o embrião deve possuir 4 blastômeros de tamanho igual formando um arranjo tridimensional, com ausência de células multinucleadas. No entanto, devido a variações nesse estágio, classifica-se o embrião no segundo dia de acordo com a fragmentação, multinucleação e tamanho das células. Podem assim ser de grau 1 ou bom, com menos de 10% de fragmentação, blastômeros de tamanhos iguais e sem multinucleação; grau 2 ou razoável, com 10-25% de fragmentação, maioria dos blastômeros de tamanhos iguais e sem multinucleação; e grau 3 ou pobre, com mais de 25% de fragmentação, considerada severa, células de tamanhos diferentes e com evidência de multinucleação. (ALPHA; ESHRE, 2011).

#### **2.3.3. Dia 3 e 4 após FIV**

Nessa fase espera-se que o embrião tenha em torno de 8 blastômeros mononucleados, de tamanho igual. O embrião que permanece em cultura precisa ser mudado nesse período para um meio com características diferentes, pois a partir desta fase as necessidades nutricionais são distintas. No quarto dia inicia o processo de compactação celular, caracterizada pelo aparecimento de uma massa celular compactada distribuída por todo o seu tamanho (ALPHA; ESHRE, 2011). Nesse momento classifica-se o embrião em grau 1 ou bom, havendo evidência de compactação que envolve todo o seu volume; grau 2 ou razoável, a compactação está na maior parte do volume do embrião; e grau 3 ou pobre, com uma compactação desproporcional. O sistema de pontuação por consenso para os embriões do Dia 4 classificou como 1/BOM: Entrou em uma quarta rodada de clivagem. Evidência de compactação que

envolve virtualmente todo o volume do embrião; 2/RAZOÁVEL: Entrou em uma quarta rodada de clivagem. A compactação envolve a maior parte do volume do embrião; 3/RUIM: Compactação desproporcional envolvendo menos da metade do embrião, com duas ou três células remanescentes como blastômeros discretos (ISTANBUL CONSENSUS, 2011)

#### **2.3.4. Formação do Blastocisto**

O embrião deverá atingir o estado de blastocisto por volta do quinto ou sexto dia de cultura. Um blastocisto de elevada qualidade deve estar bem expandido, possuir uma trofoectoderme com um grande número de células bem definidas, formando um epitélio coesivo, e uma massa celular interna (MCI) bem distinta, proeminente e com muitas células bem compactadas.. A massa intracelular e um trofoectoderma funcional tem um alto valor prognóstico para implantação e desenvolvimento fetal. A classificação do blastocisto foi realizada de acordo com do estágio de desenvolvimento (1=Prematuro; 2=Blastocisto; 3=Expandido; 4=Hatched/hatching), da massa intracelular (1/BOM = Proeminente, facilmente discernível, com muitas células compactadas e firmemente aderidas; 2/RAZOÁVEL = Facilmente discernível, com muitas células que são agrupadas livremente; 3/POBRE = Difícil de discernir, com poucas células) e do trofoectoderma. (ISTANBUL CONSENSUS, 2011).

A avaliação morfológica dos blastocistos foi realizada de acordo com a classificação de Gardner e Schoolcraft (Gardner and Schoolcraft, 1999) e incluiu três Parâmetros diferentes: grau de expansão, grau do MCI e o tipo de trofoectoderma (GARDNER, 1999).

O grau de expansão foi avaliado como um dos seguintes: (1) blastocisto inicial, sendo blastocele inferior a metade do volume a do embrião; (2) um blastocisto com blastocele, cujo o volume é metade ou maior que a metade do embrião; (3) um blastocisto completo com uma blastocele preenchendo embrião; (4) um blastocisto expandido com volume de blastocele maior que a do blastocisto, com um desbaste zona; (5) um blastocisto em eclosão começando a herniar através da zona; e (6) um blastocisto eclodido, no qual o blastocisto escapou completamente da área. Para blastocistos em grau 3 de expansão, inicia a classificação dos tipos de MCI e de trofoectoderma. O MCI foi avaliado da seguinte forma: (A) massa fortemente compactada, com muitas células; (B) massa fracamente agrupada, com menor número de células; e (C) massa com poucas células. O trofoectoderma foi classificado como: (A) muitas células que formam um epitélio coesivo e denso; (B) poucas células formando um epitélio solto; e (C) muito poucos células grandes (PCASRM et al., 2017). Para cada um dos estágios de desenvolvimento, foi acordado que a massa intracelular e o trofoectoderma devem

ser classificados em relação à escala Gardner A – C, mas que uma nota de 1–3 (ao invés de A – C) deve ser dada - com equivalente a Grau 1 para Gardner A (ISTANBUL CONSENSUS, 2011).

#### **2.4. Avaliação embrionária do blastocisto**

Atualmente, há uma escassez relativa de estudos que tentaram encontrar ligações confiáveis entre morfologia e aneuploidia tanto para embriões em fase de clivagem quanto para blastocistos usando triagem cromossômica (MAJUMDAR et al., 2017).

Quanto ao embrião em fase de clivagem, estudo demonstrou que taxa de desenvolvimento embrionário e parâmetros como grau, tipo de fragmentação e simetria dos blastômeros refletem o status citogenético do embrião e, portanto, são importantes na seleção de embriões com o maior potencial de implantação (PHAN et al, 2014). Outro estudo encontrou que embriões com 6 a 9 células no estágio de clivagem devem ser considerados para transferência e que o número de blastômeros poderia ser usado em conjunto com a cultura estendida para melhorar a seleção de embriões euplóides, especialmente quando embriões supranumerários estão disponíveis (KROENER et al, 2015). Em ambos os estudos, foram encontradas evidências da influência da morfologia em estágio de clivagem na euploidia embrionária,

Em um estudo, a morfologia do blastocisto e a taxa de desenvolvimento foram significativamente associadas à euploidia, enquanto que a morfologia do estágio de clivagem não era. A morfologia geral do embrião no dia 3 é um indicador pobre do status de euploidia. A associação foi considerada forte quando a morfologia do estágio de blastocisto foi correlacionada com a taxa de aneuploidia, sendo que todos os parâmetros morfológicos de um embrião em fase de blastocisto eram preditivos de euploidia. Os blastocistos que estavam se expandindo com alta pontuação de massa celular interna (MCI) e trofoectoderme (TE) tiveram maior chance de serem euploides do que aqueles com notas menores. Individualmente também, o escore do trofoectoderme ou do MCI foi positivamente associado ao status de euploidia do embrião. A taxa de desenvolvimento de um blastocisto também foi altamente indicativa de euploidia. Os embriões que têm uma taxa de desenvolvimento mais lenta e atingem o estágio de blastocisto no dia 6 tiveram uma taxa de aneuploidia significativamente maior do que os embriões de crescimento mais rápido que alcançaram a expansão total no dia 5 (MAJUMDAR et al., 2017).

Em estudo comparativo realizado entre 2013 e 2016 e publicado em 2017, com 3705 embriões analisados, relatou um vínculo entre as características morfológicas do embrião e a aneuploidia, onde a associação entre a morfologia do blastocisto e a anormalidade cromossômica foi avaliada não apenas com base na morfologia da MCI/TE, mas também pelo grau de expansão do blastocisto e na dinâmica do desenvolvimento embrionário. A análise dos dados mostrou diferença na taxa de gravidez em curso entre os embriões que estavam disponíveis para uma biópsia no dia 5 em comparação ao dia 6 e ainda fornecendo evidências de que os pacientes com ciclos apresentando um blastocisto disponível no início do dia 5 têm um melhor prognóstico para o nascimento vivo no desfecho. Nesse estudo o cultivo prolongado de embriões até o estágio de blastocisto revela uma forte correlação entre a morfologia embrionária e o estado genético do embrião, provando a associação entre as características morfológicas, os resultados clínicos e a genética dos embriões nos ciclos de triagem genética de pré-implantação, onde a idade da paciente continua sendo o principal responsável pelas taxas de euploidia, qualidade do embrião e dinâmica do desenvolvimento embrionário in vitro (BARASH et al, 2017)

### **2.5. Diagnóstico Genético Pré-implantacional (PGS)**

O diagnóstico genético (PGS) é a prática de obter uma biópsia celular de um embrião para avaliar a composição genética, permitindo a seleção de um embrião geneticamente não afetado para transferência (BREZINA et al, 2012).

Mais recentemente, as indicações para PGS se expandiram para incluir rastreio de todos os 24 cromossomos para detectar aneuploidia abrangente em pacientes com um cariótipo normal (PGS-Aneuploidy, PGS-A). Em teoria, essa abordagem deveria melhorar os resultados clínicos de FIV, melhorando as taxas de implantação e reduzindo taxas de aborto espontâneo, particularmente nos pacientes com risco aumentado de produzir embriões aneuploides, como mulheres de maternidade avançada idade, falhas recorrentes de implantação ou aborto recorrente (LEE et al, 2013).

Mais recentemente foi identificada a presença do mosaicismo celular nos embriões, ou seja, a presença de mais de uma linha celular distinta dentro de um embrião, cada um com contagens cromossômicas (consequência da segregação cromossômica e erro durante a mitose, isto é, após a fertilização). Frequentemente embriões em mosaico não contêm células euploides, apenas uma mistura de diferentes linhas celulares aneuploides. No entanto, em alguns casos, um embrião pode ser composto por uma combinação de células normais e

anormais, e são esses embriões que são risco particular de erros de diagnóstico, pois o PGS do trofoectoderme pode encontrar um falso positivo ou um falso negativo. No entanto, a transferência de embriões com uma biópsia de trofoectoderma euplóide, em detrimento daqueles com evidente mosaïcismo, resulta em maiores taxas de implantação e um risco menor de aborto (MUNNE, 2016).

O PGS-A também encoraja a melhor prática clínica da TRA ao apoiar a seleção de um único embrião euploide para transferência, minimizando assim nascimentos múltiplos e os riscos simultâneos para mães e bebês (LEE et al, 2013). A triagem de aneuploidia é amplamente aceita, no entanto, os custos dessa abordagem são muito altos e isso dificulta sua realização pelos casais. (HELLANI et al, 2008).

## **2.6. Transferência de embriões**

A transferência de embriões, ou seja, o momento em que o embrião é colocado no útero materno com ajuda do ultrassom, é de vital importância e considerado crítico para o sucesso da gravidez, visto que é envolvido por variáveis múltiplas que podem afetar o sucesso do método (SCHOOLCRAFT, 2016).

A escolha do embrião e o momento de sua transferência, que pode ser realizada em D2, D3 ou blastocisto, é a primeira etapa do processo (BROWN; DAYA; MATSON, 2016). Quanto à escolha pela utilização de embriões criopreservados ou naturais, existe uma preferência pelos congelados por prováveis desfechos favoráveis na gestação (EVANS et al., 2014). Uma meta-análise sugeriu que a transferência de embriões congelados teve um desempenho significativamente melhor nas taxas de nascidos vivos, de gravidez clínica, de aborto espontâneo e de ocorrência da síndrome de hiperestimulação ovariana moderada a grave do que na transferência de embriões frescos (ZHANG et al, 2018). Além da forma que o embrião é conservado, o seu estágio de desenvolvimento altera o sucesso do procedimento (PCASRM et al, 2013).

O procedimento é minucioso, pois cada detalhe pode alterar o resultado da fertilização. Inicia-se com a colocação do espéculo e em seguida a introdução do cateter. Sabe-se que a retirada de muco do cateter, o tamanho do mesmo e a utilização do ultrassom para avaliação do procedimento são requisitos para o sucesso da fertilização. Em seguida há a inserção do embrião, previamente analisado e selecionado (ALPHA; ESHRE, 2011).

Diante dos aspectos supracitados, juntamente com a corroboração da literatura, este estudo pretende identificar quais fatores são preditivos para que haja a formação de um embrião euplóide, ou seja, a formação de um embrião dito normal, para, finalmente, passar pelo diagnóstico pré-implantacional para análise genética do embrião. Essa avaliação combinada dos parâmetros de geração embrionária e da técnica de fertilização in vitro, poderia favorecer o aperfeiçoamento do processo de seleção do melhor embrião, evitando, assim, a submissão de todos os embriões de um mesmo casal à técnica de PGS, propiciando, além da diminuição dos custos do procedimento, uma possível elevação nas taxas de gestação bem sucedidas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Tipo de estudo**

Estudo transversal.

#### **3.2. População e Aspectos Éticos**

Foram selecionados 431 embriões de pacientes com diagnóstico de infertilidade conjugal com indicação para realizar fertilização in vitro Centro de Medicina Reprodutiva Pró Social e Clínica Pronatus – Medicina Reprodutiva / Belém que fizeram PGS no período de 13 de março de 2013 a 30 de abril de 2018 e que atenderam os critérios de inclusão mencionados a seguir. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/UFGPA, sob o CAAE: 12779919.0000.0018 (ANEXO A). Todas as pacientes estiveram em protocolo assistencial de atendimento para FIV.

#### **3.3. Critérios de inclusão**

As pacientes incluídas no estudo foram pacientes submetidas à FIV no respectivo período e seguiram os seguintes protocolos de atendimento: avaliação pré-conceptual protocolar do casal, avaliação da reserva ovariana, contagem de folículos antrais no dia 2 ou 3 do ciclo menstrual, além da dosagem de FSH, hormônio luteinizante (LH) e estradiol e hormônio antimulleriano no 3 dia do ciclo menstrual.

#### **3.4. Procedimentos**

Foram analisados 431 embriões de pacientes que passaram pelo processo de FIV e que foram analisados por PGS. As pacientes forma submetidas à avaliação pré-conceptual

protocolar, posteriormente, foi realizada uma contagem de folículos antrais no dia 2 ou 3 do ciclo menstrual, além da dosagem de FSH, hormônio luteinizante (LH) e estradiol. No 6º dia do ciclo foi iniciado o acompanhamento do crescimento folicular através do US tv e a cada dois dias até o crescimento adequado dos folículos. Quando um ou mais folículos estavam com 14 mm ou mais, foi iniciado o antagonista do GNRH (orgalutram). Após o 9º dia, a dose complementar de RFSH (PUREGON) 150 UI dia foi iniciada. Quando a maior parte dos folículos atingiu 17 mm ou mais, desencadeou-se o processo de maturação dos oócitos pela administração de HCG (250 µg), sendo programada a captação ovular após 34 a 36 horas.

Os oócitos foram colhidos pela aspiração individual de cada folículo, por meio de agulhas especiais. A intervenção foi realizada em torno de 26 a 28 horas depois da detecção do pico de LH endógeno (ciclo natural) ou de 34 a 36 horas após a injeção de hCG (ciclos estimulados).

O espermatozoide foi coletado por masturbação (dois dias de abstinência sexual) em placa de cultura. Uma vez liquefeito, foi processado segundo as técnicas de capacitação espermática. Após o preparo, foi determinada a concentração dos espermatozoides móveis em progressão linear. Ajustou-se a concentração entre 1 e 2 milhões de espermatozoides móveis por ml, conservando-se o material na temperatura de 37°C e na atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Os oócitos foram inseminados com 100 mil a 150 mil espermatozoides móveis por ml, após quatro a seis horas da coleta. Em casos de oligozoospermia moderada ou grave e/ou astenozoospermia, utilizou-se a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (IIE).

Após a punção folicular por ultrassom vaginal, o líquido folicular foi depositado em placas de cultura. Em seguida, os oócitos foram identificados e seu complexo *cumulus-corona*, removido por exposição à hialuronidase e manuseio mecânico. A IIE foi realizada em sistema com microscópio invertido e equipado com um sistema de lentes especiais e acoplado a um micromanipulador automático. Uma delicada sucção foi aplicada cuidadosamente para quebrar o oolema e evidenciar a presença de ooplasma dentro da micropipeta, confirmando a deposição intracitoplasmática do espermatozoide. O processo de fertilização normal foi definido pela formação de dois pronúcleos distintos, seguida do aparecimento de clivagem embrionária após 24 horas da fertilização. Um número ideal de embriões (análise caso a caso) foi transferido após 48 horas, 72 horas ou 150 horas de cultura (período determinado de acordo com cada situação clínica), sendo os embriões excedentes criopreservados.



### 3.5. Avaliação e classificação embrionária

A avaliação da fertilização e da morfologia embrionária foram realizadas por observação da evolução do embrião nos dias 1, 2 e 3 (fase de clivagem) e dias 5 e 6 (fase de blastocisto). No dia 4 o embrião não é avaliado por estar em fase de mórula (compactação), fase que não há parâmetros adequados para análise. Os parâmetros morfológicos para a pontuação embrionária foram: polarização, presença de halo citoplasmático, número de pronúcleos e aparência pronuclear. Uma vez que as características morfológicas estão relacionadas ao tempo pós-fertilização, a pontuação do zigoto foi realizada dentro de um período de tempo fixo após a inseminação. Morfológicamente o embrião pode ser classificado da seguinte forma:

- CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA:

A: qualidade superior.

B: boa qualidade (não para transferência de um único embrião eletivo).

C: qualidade embrionária prejudicada.

D: não recomenda a transferência (inclui todos os embriões multinucleados).

### 3.6. Avaliação da fertilização

D1: O oócito fertilizado considerado ideal foi o esférico e com dois corpos polares, dois pronúcleos justapostos centralmente localizados e de tamanho uniforme, com membranas distintas. Os pronúcleos tinham números e tamanhos equivalentes de núcleos polares precursores que estivessem idealmente alinhados equatorialmente na região da justaposição da membrana. Tanto o tamanho quanto a localização do pronuclear foram avaliados no teste de fertilização. As seguintes características dos pronúcleos foram consideradas atípicas: pronúcleos amplamente separados; pronúcleos de tamanhos grosseiramente diferentes; micronúcleos. O consenso sobre a pontuação pronuclear foi que deveria haver três categorias: simétrica; não simétrica; e anormal. A categoria anormal inclui pronúcleos sem núcleos polares precursores (os chamados "pronúcleos fantasmas") e aqueles com um único corpo precursor nucleolar ("pronúcleos de olho de boi"), que foram associados a resultados anormais em modelos animais.

D2/D3: O consenso é de que, em média, os embriões que se separaram mais lentamente do que a taxa esperada têm um potencial de implantação reduzido, e que os embriões que se

clivaram mais rapidamente do que a taxa esperada são provavelmente anormais e têm um potencial reduzido de implantação. Portanto, a observação para o desenvolvimento embrionário foi de 4 células no dia 2 e 8 células no dia 3, dependendo do tempo decorrido pós-inseminação.

Um fragmento foi definido como uma estrutura citoplasmática ligada à membrana extracelular que tem 45 µm de diâmetro em um embrião no Dia 2 e 40 µm de diâmetro em um embrião do Dia 3. Os graus relativos de fragmentação foram definidos como: leve (10%); moderada (10-25%) e grave (0,25%). Os valores percentuais são baseados nos equivalentes celulares, portanto, para um embrião de 4 células, a fragmentação de 25% equivaleria a um volume de blastômero. O consenso foi de que uma definição do impacto da localização de fragmentos não poderia ser incluída, pois isso pode ser um fenômeno dinâmico, ou seja, os fragmentos podem se mover dentro do embrião.

A multinucleação foi definida como a presença de mais de um núcleo em um blastômero e inclui micronúcleos. O consenso foi que a multinucleação está associada à diminuição do potencial de implantação, e que os embriões multinucleados estão associados a um aumento do nível de anomalia cromossômica e, como consequência, aumento do risco de aborto espontâneo. Concordou-se que a avaliação de multinucleação foi realizada no dia 2 (ou seja, 44 +/- 1 h pós-inseminação), e que a observação de multinucleação em uma célula foi suficiente para o embrião ser considerado multinucleado. O esquema de classificação para multinucleação foi binário, observando sua presença ou ausência.

Para embriões nas fases de 2, 4 e 8 células, os blastômeros deveriam ser de tamanho uniforme. O esquema de classificação para o tamanho da célula foi binário, observando se todos os tamanhos de células são apropriados para o estágio. Outras características morfológicas, como a granulosidade citoplasmática, a aparência da membrana e a presença de vacúolos, também foram usadas como parte da avaliação morfológica dos embriões do Dia 2 e Dia 3.

Um embrião do Dia 2 foi considerado ideal (44 + 1 h pós-inseminação) com 4 blastômeros mononucleados de tamanho igual em um arranjo tetraédrico tridimensional, com 10% de fragmentação. Um embrião foi considerado ideal no Dia 3 (68 + 1 h pós-inseminação) com 8 blastômeros mononucleados do mesmo tamanho, com 10% de fragmentação. O formato de pontuação seria o número de células, grau e razão para o grau (por exemplo, 4 células, grau 2, fragmentação).

D5/D6 (BLASTOCISTO): Foi considerado que um embrião ideal nesta fase de desenvolvimento estava completamente expandido através de blastocistos eclodidos com uma massa intracelular proeminente, facilmente discernível e consistindo em muitas células, com as células compactadas e firmemente aderidas, e com um trofoectoderma que compreende muitas células formando um epitélio coeso. A massa intracelular e um trofoectoderma funcional tem um alto valor prognóstico para implantação e desenvolvimento fetal. A classificação do blastocisto foi realizada de acordo com do estágio de desenvolvimento, da massa intracelular e do trofoectoderma, seguindo o esquema abaixo:

- ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO:

Estágio 1 = Prematuro

Estágio 2 = Blastocisto

Estágio 3 = Expandido

Estágio 4 = Hatched/hatching

- MASSA CELULAR INTERNA:

1 - BOM: Proeminente, facilmente discernível, com muitas células compactadas e firmemente aderidas.

2 - RAZOÁVEL: Facilmente discernível, com muitas células que são agrupadas livremente.

3 - POBRE: Difícil de discernir, com poucas células.

- TROFOECTODERMA:

1 - BOM: Muitas células formando um epitélio coeso.

2 - RAZOÁVEL: Poucas células formando um epitélio solto.

3 - POBRE: Pouquíssimas células.

Um embrião não viável foi um embrião em que o desenvolvimento foi interrompido por pelo menos 24 h, ou em que todas as células degeneraram ou foram lisadas.

Todos os blastocistos foram biopsiados, enviados para PGS e divididos em 2 grupos: grupo euplóide (n = 201) e grupo aneuplóide (n = 225). Foi realizada uma análise de associação entre euploidia e aneuploidia com todas as variáveis do desenvolvimeto embrionário, além das características clínicas do casal, como idade, causa e tempo de infertilidade, presença ou não de endometriose, síndrome dos ovários policísticos, fator imune, fator trombofílico, número de folículos antrais, peso, altura, qualidade seminal e qualidade do oócito.

### **3.7. Análise estatística**

Análise estatística foi realizada através do software SPSS. A análise do qui-quadrado foi utilizada para avaliar a diferença nos valores categóricos e teste T para valores não categóricos. Os valores contínuos serão apresentados como médias com desvio padrão. O odds-ratio foi utilizado para calcular a chance de aneuloidia embrionária. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## **4. RESULTADOS**

Dos 431 embriões selecionados para estudo, foram excluídos 5 embriões por falha de ampliação de DNA, sendo que no total foram analisados 426 embriões, os quais foram divididos em euploides (201) e aneuploides (225).

Influência de fatores clínicos, doenças maternas e de reserva ovariana no risco de aneuploidia embrionária está demosntarda nas tabelas 1 e 2. Quanto maior a idade média materna, maior o risco de aneuploidia (grupo euploide 33,99 anos DP 3,98 idade versus grupo aneuploide 36,48 anos DP 4,52 idade,  $p=0,001$ ). Mulheres acima de 40 anos tem OR 2,9 (IC 1,6 – 5, P 0,001,) para aneuploidia. A endometriose tem um OR 0,4, (IC 0,1 – 1, P 0,049) para aneuploidia. Os outros fatores como aborto de repetição, fator masculino, fator tubário, fator uterino, SOP, fator imunológico, trombofilias, embrião fresco e poor responder não foram associados com o risco de aneuploidia.

**TABELA 1**  
Influência de fatores clínicos e doenças maternas no risco de aneuploidia embrionária

	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	OR	p <sup>a</sup>
<b>Idade</b>				
< 40	88,6% (163)	72,6% (151)	2,9 (1,6 - 5)	0,001
> 40	11,4% (21)	27,4% (57)		
<b>Aborto de repetição</b>				
Não	92,4% (170)	92,8% (193)		0,881
Sim	7,6% (14)	7,2% (15)		
<b>Fator tubário<sup>b</sup></b>				
Não	52,2% (96)	55,3% (115)		0,537
Sim	47,8% (88)	44,7% (93)		
<b>Fator uterino<sup>c</sup></b>				
Não	84,6% (154)	85,5% (177)		0,805
Sim	15,4% (28)	14,5% (30)		
<b>SOP</b>				
Não	46,5% (86)	53,1% (111)		0,189
Sim	53,5% (99)	46,9% (98)		
<b>Endometriose</b>				
Não	91,4% (169)	96,1% (199)	0,4 (0,1 - 1)	0,049
Sim	8,6% (16)	3,9% (8)		
<b>Fator imunológico</b>				
Não	69,2% (128)	76,6% (160)		0,1
Sim	30,8% (57)	23,4% (49)		
<b>Trombofilias</b>				
Não	85,4% (158)	88% (184)		0,441
Sim	14,6% (27)	12% (25)		
<b>Embrião fresco</b>				
Não	84,6% (170)	79,6% (179)		0,179
Sim	15,4% (31)	20,4% (46)		
<b>Poor responder</b>				
Não	97,9% (190)	94,9% (205)		0,103
Sim	2,1% (4)	5,1% (11)		

<sup>a</sup> Teste: Qui-quadrado

<sup>b</sup> Fatores tubários: aderências, más formações, , laqueadura.

<sup>d</sup> Fatores uterinos: más formações, histerectomia, mioma.

<sup>c</sup> Poor responder: menos de 6 embriões

**TABELA 2**

Influência de fatores clínicos e de reserva ovariana maternas no risco de aneuploidia embrionária

	Euploide M (DP)	Aneuploide M (DP)	p <sup>a</sup>
Tempo de infertilidade	3,07 (2,53)	3,74 (3,24)	0,340 <sup>b</sup>
Idade da mulher	33,99 (3,98)	36,48 (4,52)	0,001 <sup>b</sup>
Peso da mulher	63,45 (8,04)	1233,78 (8711,85)	0,830 <sup>b</sup>
Altura da mulher	3,16 (15,29)	2,82 (13,54)	0,861
Folículos antrais	16,10 (8,99)	14,59 (11,44)	0,155
<sup>a</sup> T-test			
<sup>b</sup> Mann-Whitney			
Média			
Desvio Padrão			

Na Tabela 3 está demonstrada a avaliação dos fatores masculinos no risco de aneuploidia embrionária. Os fatores como idade e qualidade do sêmen (concentração, motilidade, capacitação e espermatozoides ovais) não foram associados com aneuploidia.

**TABELA 3**

Avaliação dos fatores masculinos no risco de aneuploidia embrionária

	Euploide M (DP)	Aneuploide M (DP)	p <sup>a</sup>
Idade do homem	39,07 (7,44)	40,83 (7,51)	0,18
Concentração sêmen	58,69 (45,39)	56,69 (48,65)	0,686
Motilidade do semên	51,64 (22,19)	50 (21,98)	0,483
Capacitação do semên	29,39 (31,43)	21,32 (29,65)	0,058
Espermatozoides ovais	2,54 (2,45)	1,98 (1,20)	0,052 <sup>b</sup>
<sup>a</sup> T-test			
<sup>b</sup> Mann-Whitney			
Média			
Desvio Padrão			

A influência do número de células em D2 e D3 na euploidia está exposta na tabela 4. Não houve associação no número de células embrionárias em D2 e D3 com euploidia.

**TABELA 4**

Número de células no embrião em D2 e D3 relacionados com euploidia

	Euploide Média (DP)	Aneuploide Média (DP)	P <sup>a</sup>
D2 CEL	3,99 (0,9)	3,88 (1,0)	0,099
D3 CEL	7,54 (1,8)	7,56 (1,5)	0,169
<sup>a</sup> T-test			
<sup>b</sup> Mann-Whitney			
Média			
Desvio Padrão			

Nas tabelas 5, 6 e 7 estão expostas as avaliações da morfologia embrionária em D1, D2 e D3 no risco de aneuploidia. Não foi encontrada associação do número e tipo de pró-núcleos e do número de corpúsculo polar em D1 com a euploidia embrionária, bem como, também foi demonstrado que não houve influência na taxa de formação de blastocistos euploides em relação à qualidade embrionária em D2 e D3.

**TABELA 5**

Avaliação da morfologia embrionária do D1 no risco de aneuploidia

	Tipo	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	p <sup>a</sup>
<b>D1 Número de pró-núcleos</b>	0	2,1% (4)	4,7% (10)	0,256
	1	0	0,5% (1)	
	2	97,4% (188)	94,9% (204)	
	3	0,5% (1)	0	
<b>D1 Tipo de pró-núcleos</b>	1	58% (109)	58,5% (120)	0,978
	2	18,1% (34)	18,5% (38)	
	3	19,7% (37)	19,5% (40)	
	4	4,3% (8)	3,4% (7)	
<b>D1 Número de corpúsculo polar</b>	1	1,6% (3)	1,9% (4)	0,812
	2	98,4% (190)	98,1% (211)	

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado**TABELA 6**

Avaliação da morfologia embrionária do D2 no risco de aneuploidia

	Tipo	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	p <sup>a</sup>
<b>D2 Irregularidade celular</b>	0	53,9% (103)	56,5% (122)	0,605
	1	46,1% (88)	43,5% (94)	

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado**TABELA 7**

Avaliação da morfologia embrionária do D3 no risco de aneuploidia

<b>D3 Grau</b>	1	88,8% (159)	93% (187)	0,367
	2	9,5% (17)	7% (14)	
	3	0,6% (1)	0	

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado

Na tabela 8 está demonstrada a avaliação da morfologia embrionária do blastocisto no risco de aneuploidia. A classificação da trofoectoderme foi dividida em A, B e C. Analisando os tipos morfológicos do trofoectoderme, massa celular interna e grau de expansão, os resultados demonstram que apenas a qualidade do trofoectoderme ( $p = 0,001$ ) está relacionada com a euploidia. Maiores taxas de euploidia foram encontradas em embriões com trofoectoderme do tipo A (36,3%) quando comparados com os aneuploides do tipo A (27,1%), enquanto que os do tipo B tiveram taxas semelhantes, euploides (47,3%) aneuploides (50,7%) e já no tipo C a taxa de euploidia foi menor (16,4%) do que de aneuploidia (22,2%). Já a análise do grau de expansão ( $p = 0,228$ ) e o tipo de massa celular interna ( $p = 0,084$ ) não tiveram influência na euploidia embrionária.

**TABELA 8**

Avaliação da morfologia embrionária do blastocisto no risco de aneuploidia

	Tipo	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	OR	p <sup>a</sup>
<b>Grau de expansão</b>	3	62,2% (125)	66,7% (150)		0,228
	4	34,3% (69)	32,4% (73)		
	5	2,5% (5)	0,9% (2)		
	6	1% (2)	0		
<b>Massa celular interna</b>	A	36,3% (73)	27,1% (61)		0,084
	B	47,3% (95)	50,7% (114)		
	C	16,4% (33)	22,2% (50)		
<b>Trofoectoderme</b>	A	26,9% (54)	13,8% (31)	2,7 (1,6 - 4,3) <sup>b</sup>	0,001
	B	58,2% (117)	53,8% (121)	4,1 (2,2 - 7,7) <sup>c</sup>	
	C	14,9% (30)	32% (72)		

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado<sup>b</sup>Risco de aneuploidia: (TIPO A + TIPO B) x TIPO C<sup>c</sup>Risco de aneuploidia: TIPO A x TIPO C

Embriões com trofoectoderma do tipo C apresentaram risco 2,7 vezes maior de aneuploidia (OR 2,7, IC 1,6 – 4,3) quando comparadas aos trofoectoderma tipos A + B e risco



4,1 vezes maior de aneuploidia (OR 4.1, IC 2.2 – 7.7), quando comparados ao trofoectoderma do tipo A. Não foi encontrada associação entre grau de expansão e euploidia ( $p=0,228$ ) nem entre massa celular interna e euploidia ( $p=0,084$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar a presença de fatores morfológicos do embrião e clínicos do casal que sejam preditivos para a formação de blastocistos euploides. Encontramos que um embrião com trofoderme tipo C tem 4,1 mais chances de ser aneuploide (IC 2,2 - 7,7) sendo este o único parâmetro de morfologia embrionária que foi associada com a aneuploidia. Os demais parâmetros morfológicos das fases de clivagem e de formação do blastocisto não foram associados com aneuploidia. Além disso, entre os fatores clínicos, apenas a idade da mulher e a endometriose tiveram associação com a euploidia sendo que mulheres a partir de 40 anos tem 2,9 vezes mais risco de aneuploidia (IC 1,6 – 5) e pacientes com endometriose tem risco 0,4 vezes maior (IC 0,1 -1).

A avaliação morfológica do blastocisto parece apresentar correlação com as taxas de implantação, mas não há uma resposta definitiva sobre a associação desta com a euploidia (ALFARAWATI et al, 2011; BARASH et al, 2017; MAJUMDAR et al,2017). Analisando os tipos morfológicos do trofoectoderme, massa celular interna e grau de expansão, encontramos resultados que demonstram que apenas a qualidade do trofoectoderme está relacionada com a euploidia. Maiores taxas de euploidia foram encontradas em embriões com trofoectoderme do TIPO A quando comparados aos do TIPO C (OR 4,1; 2,2 – 7,7). Já a análise do grau de expansão e do tipo de massa celular interna não teve influência na euploidia embrionária. Alguns estudos também demonstraram que a morfologia do embrião em estágio de blastocisto tem associação com a euploidia, especialmente os parâmetros de massa celular interna e trofoectoderme (BARASH et al, 2017; MAJUMDAR et al,2017). Nosso estudo demonstrou que a qualidade das células do trofoblasto está associada com a euploidia, mas a qualidade da massa interna não. O número reduzido de células do TE pode ser atribuído à falha da divisão celular devido a anormalidades das organelas e anormalidades cromossômicas como aneuploidia e morte celular (IWASAWA et al, 2019). Alguns estudos encontraram associação da euploidia com o estágio de clivagem do embrião (KROENER et al, 2015; PHAN et al, 2014). Entretanto não encontramos relação da morfologia embrionária com a euploidia

corroborando com estudos recentes sobre este tema (BARASH et al, 2017; MAJUMDAR et al, 2017).

Foi encontrada relação entre a idade da mulher e euploidia. Pesquisa anterior apresentou o mesmo achado, usando 38 anos como idade de corte (BARASH et al, 2017; SHAHINE et al, 2016). Foi constatado que mulheres com idade inferior a 40 anos têm embriões com maiores taxas de euploidia (OR 2,9; IC 1,6 - 5). Sabe-se que mulheres com idade acima de 38 anos apresentam redução da reserva ovariana, além disso, tem baixa qualidade oocitária e maior risco de anomalias cromossômicas (COSTA et al, 2016; BEGUM, 2008). Segundo estudos, a idade materna avançada afeta negativamente o desenvolvimento embrionário e isso poderia estar relacionado com a aneuploidia (ZIEBE et al, 2001). Nossos dados apontaram, entretanto, que a idade do homem não esteve relacionada com a euploidia.

Encontramos que mulheres com endometriose tem maior risco de aneuploidia embrionária (OR 0,4; 0,1 - 1). Nossos resultados foram diferentes de estudos anteriores que não encontraram essa associação (POLAT et al, 2015; JUNEAU, 2017). Essa relação poderia ser explicada pela presença de alterações no complexo de células fusiformes de oócitos em mulheres com endometriose que poderia estar alterado e ser propenso a comprometer os microtúbulos, aumentando os erros meióticos, isso poderia explicar o risco aumentado de aneuploidia (DE BROU, et al, 2013).

Sabe-se que as taxas de implantação estão relacionadas com a presença da euploidia (BEGUM, 2008). Por isso nosso estudo buscou relacionar se as mulheres que tinham abortos recorrentes podiam ter associação com a aneuploidia, analisamos se tempo de infertilidade da mulher e o número de abortos recorrentes poderiam estar relacionados com a aneuploidia e não encontramos associação. Outras patologias clínicas maternas, como síndrome dos ovários policísticos, alterações imunológicas e trombofilias, alterações tubárias e uterinas não tiveram influência estatística com euploidia em nosso estudo. Em relação à SOP, pouco se sabe sobre a informação genética de oócitos e embriões de pacientes com essa patologia, entretanto, estudo demonstrou que não há relação da aneuploidia com a SOP (WANG, 2016).

Conforme estudos, fator masculino grave prejudica a competência embrionária precoce em termos de taxa de fertilização e potencial de desenvolvimento. No entanto, a taxa de euploidia e potencial de implantação dos blastocistos obtidos independem do espermatozoide (MAZZILLI, 2017). Apesar disso, a qualidade do gameta masculino como concentração,

motilidade e capacitação do sêmen, e também a presença de espermatozoides ovais não influenciaram na euploidia.

Nosso estudo foi transversal retrospectivo, mas apesar disso o nosso número de embriões é significativo e nossos resultados são representativos. Tivemos, em nossa análise, achados que nos fazem compreender melhor a dinâmica embrionária, dessa forma nosso estudo tem grande contribuição, pois poderá orientar melhor a seleção de embriões submetidos ao PGS.

## **6. CONCLUSÃO**

Nosso estudo demonstrou que a má qualidade do trofoectoderma embrionário está associada a um risco de 4,1 vezes para formação de embriões aneuploides. Demonstramos que os outros parâmetros de avaliação embrionária não estão associados à aneuploidia. Além disso, entre os fatores clínicos maternos e paternos, somente a presença de endometriose (OR 0,4; IC 0,1 – 1) e o avanço da idade materna, especialmente mulheres acima de 40 anos (OR 2,9; 1,6 - 5) estão associadas com a aneuploidia. Esse achado tem grande importância para as tecnologias de reprodução assistida, visto que pode auxiliar na seleção dos embriões que serão submetidos a análise genética pre-implantacional .

## REFERÊNCIAS

1. ALFARAWATI, Samer et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 2, p. 520-524, 2011.
2. ALPHA, Scientists In Reproductive Medicine; ESHRE, Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Reproductive biomedicine online**, v. 22, n. 6, p. 632, 2011.
3. ALVES, Ana Elisabete Martins. Relatório de Estágio em Procriação Medicamente Assistida. 2013.
4. BARASH, Oleksii O. et al. Association between growth dynamics, morphological parameters, the chromosomal status of the blastocysts, and clinical outcomes in IVF PGS cycles with single embryo transfer. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, n. 8, p. 1007-1016, 2017.
5. BEGUM, Mosammat Rashida. Assisted Reproductive Technology: Techniques and Limitations. **Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons**, v. 26, n. 3, p. 135-141, 2008.
6. BING, Yinzhong; OUELLETTE, Rodney J. Fertilization in vitro. In: **Human Embryogenesis**. Humana Press, p. 251-266, 2009.
7. BREZINA, Paul R. et al. Preimplantation genetic testing. **Bmj**, v. 345, p. e5908, 2012.
8. BROWN, Julie; DAYA, Salim; MATSON, Phill. Day three versus day two embryo transfer following in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. **The Cochrane Library**, 2016.
9. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION et al. American Society for Reproductive Medicine, Society for Assisted Reproductive Technology. 2009 assisted reproductive technology success rates: national summary and fertility clinic reports. **Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention**, 2011.
10. COSTA, Daniela et al. Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o Tratamento da Infertilidade. 2016.

11. CROSEIRA, Ana Maria Larotonda Vieira et al. Tratamento da endometriose associada à infertilidade-revisão da literatura. **Femina**, 2010.
12. DA BROI, M. G. et al. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. **Human Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 315-323, 2013.
13. DE CARVALHO, Bruno Ramalho et al. ADVERSE OUTCOMES OF ASSISTED REPRODUCTION TECHNIQUES, 2013.
14. DOR, J. et al. The treatment of patients with polycystic ovarian syndrome by in-vitro fertilization and embryo transfer: a comparison of results with those of patients with tubal infertility. **Human Reproduction**, v. 5, n. 7, p. 816-818, 1990.
15. ENIOLA, Olooto Wasiu; ADETOLA, Amballi Adebayo; ABAYOMI, Banjo Taiwo. A review of Female Infertility; important etiological factors and management. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 3, p. 379-385, 2017.
16. EVANS, Jemma et al. Fresh versus frozen embryo transfer: backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. **Human reproduction update**, v. 20, n. 6, p. 808-821, 2014.
17. FARQUHAR, Cynthia et al. Assisted reproductive technology: an overview of **Cochrane Reviews**. Issue 7. Art. No.: CD010537. DOI: 10.1002/14651858.CD010537.pub4. 2015.
18. FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS ASSOCIAÇÕES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA et al. Manual de orientação: reprodução humana. **São Paulo: Febrasgo**, p. 89-94, 2011.
19. GARDNER, David K. In-vitro culture of human blastocyst. **Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999**, p. 378-388, 1999.
20. GOMES, Luiz Mauro Oliveira et al. The age as a predictive factor in in vitro fertilization cycles. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 31, n. 5, p. 230-234, 2009.

21. HELLANI, Ali et al. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. **Reproductive biomedicine online**, v. 17, n. 6, p. 841-847, 2008.
22. HOMBURG, Roy et al. In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 60, n. 5, p. 858-863, 1993.
23. HOURVITZ, Ariel et al. Assisted reproduction in women over 40 years of age: how old is too old?. **Reproductive biomedicine online**, v. 19, n. 4, p. 599-603, 2009.
24. IWASAWA, Takuya et al. Human frozen-thawed blastocyst morphokinetics observed using time-lapse cinematography reflects the number of trophectoderm cells. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0210992, 2019.
25. JEYENDRAN, Rajasingham. Protocols for semen analysis in clinical diagnosis. **Parthenon Publishing**. Ed.1, 2003.
26. JUNEAU, Caroline et al. Patients with endometriosis have aneuploidy rates equivalent to their age-matched peers in the in vitro fertilization population. **Fertility and sterility**, v. 108, n. 2, p. 284-288, 2017.
27. KLEMETTI, Reija et al. Complications of IVF and ovulation induction. **Human Reproduction**, v. 20, n. 12, p. 3293-3300, 2005.
28. KROENER, Lindsay L. et al. Increased blastomere number in cleavage-stage embryos is associated with higher aneuploidy. **Fertility and sterility**, v. 103, n. 3, p. 694-698, 2015.
29. LEE, Evelyn et al. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. **Human Reproduction**, v. 30, n. 2, p. 473-483, 2014.
30. MACER, Matthew Latham; TAYLOR, Hugh S. Endometriosis and infertility: a review of the pathogenesis and treatment of endometriosis-associated infertility. **Obstetrics and Gynecology Clinics**, v. 39, n. 4, p. 535-549, 2012.
31. MAHMOUD, Mk et al. In vitro fertilization. **Obstetrics, Gynaecology & Reproductive Medicine**;23(8):238-46, 2013.

32. MAJUMDAR, Gaurav et al. Relationship between morphology, euploidy and implantation potential of cleavage and blastocyst stage embryos. **Journal of human reproductive sciences**, v. 10, n. 1, p. 49, 2017.
33. MARQUARD, Kerri L. et al. Polycystic ovary syndrome and maternal obesity affect oocyte size in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection cycles. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 6, p. 2146-2149. e1, 2011.
34. MAZZILLI, Rossella et al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. **Fertility and sterility**, v. 108, n. 6, p. 961-972. e3, 2017.
35. MUNNÉ, Santiago; GRIFO, James; WELLS, Dagan. Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind”. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 5, p. 1146-1149, 2016.
36. PALTER, Steven F. Impact of uterine cavity abnormalities on IVF and pretreatment cavity evaluation. **Human Assisted Reproductive Technology**, p. 27, 2011.
37. PHAN, Vy et al. Correlation between embryo morphology and development and chromosomal complement. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 85-89, 2014
38. PODGAEC, Sérgio. Manual de endometriose. **São Paulo: Federação Brasileira das**, 2014.
39. POLAT, Mehtap et al. Endometriosis is not associated with inferior pregnancy rates in in vitro fertilization: an analysis of 616 patients. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 78, n. 1, p. 59-64, 2014.
40. POLAT, Mehtap et al. In vitro fertilization for endometriosis-associated infertility. **Women's Health**, v. 11, n. 5, p. 633-641, 2015.
41. PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE et al. Criteria for number of embryos to transfer: a committee opinion. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 1, p. 44-46, 2013.

42. PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE et al. Performing the embryo transfer: a guideline. **Fertility and sterility**, v. 107, n. 4, p. 882-896, 2017.
43. REIS, Rosana Maria dos et al. Can polycystic ovary syndrome interfere with the outcome of in vitro fertilization?. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n. 9, p. 727-733, 2004.
44. RESENDE, Luciana Ochuiuto Teixeira de et al. Concentration of steroid hormones in the follicular fluid of mature and immature ovarian follicles of patients with polycystic ovary syndrome submitted to in vitro fertilization. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 9, p. 447-453, 2010.
45. SANTANA, Laura Ferreira et al. Tratamento da infertilidade em mulheres com síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 30, n. 4, p. 201-209, 2008.
46. SCHOOLCRAFT, William B. Importance of embryo transfer technique in maximizing assisted reproductive outcomes. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 4, p. 855-860, 2016.
47. SCOTT JR, Richard T. et al. Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. **Fertility and sterility**, v. 100, n. 3, p. 697-703, 2013.
48. SCOTT, Richard T.; GALLIANO, Daniela. The challenge of embryonic mosaicism in preimplantation genetic screening. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 5, p. 1150-1152, 2016.
49. SHAHINE, Lora K. et al. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 106, n. 5, p. 1124-1128, 2016.
50. SILVA, Geisa Mara da et al. Number of antral follicles and the success of in vitro fertilization: a multivariate analysis. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 36, n. 10, p. 473-479, 2014.



51. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. **Human Reproduction**, v. 26, n. 6, p. 1270-1283, 2011.
52. THESSALONIKI ESHRE/ASRM-SPONSORED PCOS CONSENSUS WORKSHOP GROUP. Consensus on infertility treatment related to polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 462-477, 2008.
53. TURCHI, Paolo. Prevalence, definition, and classification of infertility. In: **Clinical management of male infertility**. Springer, Cham, p. 5-11, 2015.
54. VIALARD, F. et al. Predisposition to aneuploidy in the oocyte. **Cytogenetic and genome research**, v. 133, n. 2-4, p. 127-135, 2011..
55. WANG, Qiong et al. Low aneuploidy rate in early pregnancy loss abortuses from patients with polycystic ovary syndrome. **Reproductive biomedicine online**, v. 33, n. 1, p. 85-92, 2016.
56. WADOWIAK, Artur; WADOWIAK, Edyta; BOJAR, Iwona. Improving the safety of the embryo and the patient during in vitro fertilization procedures. **Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques**, v. 11, n. 3, p. 137, 2016.
57. ZEGERS-HOCHSCHILD, Fernando et al. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. **Human reproduction**, v. 24, n. 11, p. 2683-2687, 2009.
58. ZEGERS-HOCHSCHILD, Fernando et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017.
59. ZHANG, Wanlin et al. Clinical outcomes of frozen embryo versus fresh embryo transfer following in vitro fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Archives of gynecology and obstetrics**, p. 1-14, 2018
60. ZIEBE, Søren et al. Embryo quality and developmental potential is compromised by age. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, v. 80, n. 2, p. 169-169, 2001.

## APÊNDICE A - ARTIGO CIENTÍFICO

### BLASTOCISTOS EUPLOIDES: AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITIVOS DE FORMAÇÃO ATRAVÉS DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL (PGS)

#### Resumo

**Introdução:** A aneuploidia é o tipo mais comum de defeito cromossômico e a principal causa de falha na implantação do embrião, aborto espontâneo e anormalidades congênitas em seres humanos. Na fertilização in vitro, o diagnóstico genético pré-implantacional (PGS) permite a seleção de um embrião geneticamente normal para transferência. Porém, cerca de 48% dos embriões que passam por PGS são aneuploides, ou seja, além dos altos custos dessa tecnologia, muitos embriões são biopsiados desnecessariamente. Uma avaliação combinada de parâmetros do desenvolvimento e morfologia embrionária poderia melhorar o procedimento de seleção, sem a necessidade de submeter muitos embriões à técnica de PGS.

**Objetivo:** identificar fatores preditivos para a formação de um embrião euplóide avaliados por PGS.

**Método:** estudo transversal onde foram incluídos 431 embriões de casais com indicação de FIV que foram submetidos a PGS, entre 2013 e 2018. Os embriões foram divididos em euploides e aneuploides. Foram analisados dados acerca do perfil clínico das pacientes; qualidade do óvulo e do sêmen; morfologia e genética do embrião.

**Resultados:** Foram incluídos 426 embriões, sendo divididos em euploides (201) e aneuploides (225). O tipo de trofoectoderme foi significativo na euploidia. Dentre os embriões euploides, 26,9% foram do tipo A, 58,2% do tipo B e 14,9% do tipo C ( $p=0,001$ ). A idade materna também influenciou na formação de um embrião euplóide. 88,6% das pacientes estavam abaixo dos 40 anos e 11,4% estavam acima dos 40 anos ( $p=0,001$ ). A endometriose apresentou valor significativo na euploidia. 91,4% eram de mulheres sem endometriose e 8,6% foram de mulheres com endometriose ( $p = 0,049$ ). A média de idade das mulheres com embriões euploides foi 33,99 anos (DP 3,98), já entre mulheres com embriões aneuploides a média foi 36,48 (DP 4,52) ( $p=0,001$ ). **Conclusão:** A análise demonstrou que a morfologia TIPO A do trofoectoderma de embriões em fase de blastocisto, a ausência de endometriose e a idade da mulher sendo menor que 40 anos, são fatores preditivos para que o embrião seja euploide.

**Palavras-chave:** fator preditivo, aneuploidia, PGS, trofoectoderme.

**Abstract**

**Introduction:** Aneuploidy is the most common type of chromosomal defect and the leading cause of failure in embryo implantation, miscarriage, and congenital abnormalities in humans. In vitro fertilization, pre-implantation genetic diagnosis (PGS) allows the selection of a genetically normal embryo for transfer. However, about 48% of the embryos that pass through PGS are aneuploid, that is, in addition to the high costs of this technology, many embryos are unnecessarily biopsied. A combined evaluation of developmental parameters and embryonic morphology could improve the selection procedure without the need to submit many embryos to the PGS technique.

**Objective:** to identify predictive factors for the formation of a euploid embryo evaluated by PGS.

**Method:** A cross-sectional study involving 431 embryos of couples with indication of IVF that were submitted to PGS between 2013 and 2018. The embryos were divided into euploids and aneuploid. Data on the clinical profile of the patients were analyzed; quality of egg and semen; morphology and genetics of the embryo.

**Results:** 426 embryos were divided into euploids (201) and aneuploid (225). The type of trophoectoderm was significant in euploidy. Among the euploid embryos, 26.9% were type A, 58.2% type B and 14.9% type C ( $p = 0.001$ ). Maternal age also influenced the formation of a euploid embryo. 88.6% of the patients were under 40 years old and 11.4% were over 40 years old ( $p = 0.001$ ). Endometriosis presented significant euploidy value. 91.4% were women without endometriosis and 8.6% were women with endometriosis ( $p = 0.049$ ). The mean age of women with euploid embryos was 33.99 years (SD 3.98), while among women with aneuploid embryos the mean was 36.48 (SD 4.52) ( $p = 0.001$ ).

**Conclusion:** The analysis showed that the morphology TYPE A of the trophoectoderm of embryos in the blastocyst phase, the absence of endometriosis and the age of the woman being less than 40 years, are predictive factors for the embryo to be euploid.

**Key words:** predictive factor, aneuploidy, PGS, trophoectoderm.

## 1. INTRODUÇÃO:

A aneuploidia é o tipo mais comum de anormalidade cromossômica e a principal causa de falha na implantação, aborto espontâneo e anormalidades congênitas em seres humanos. (LEE et al., 2013). Em torno de 34,6% das causas de aborto espontâneo em mulheres acima de 35 anos são por anormalidades cromossômicas (HODES-WERTZ et al, 2012). Por essa razão, a aneuploidia é uma consideração primária ao avaliar estratégias de triagem para a competência reprodutiva embrionária.

No procedimento da fertilização in vitro (FIV) pode ser realizado o diagnóstico genético pré-implantacional (PGS), o qual se obtém uma biópsia celular de um embrião para avaliar a sua composição genética, permitindo a seleção de um embrião euploide para transferência (BREZINA et al., 2012). O PGS melhorou as taxas de implantação e reduziu taxas de aborto espontâneo, particularmente nos pacientes com risco aumentado de produzir embriões aneuploides. (LEE et al., 2013). Uma avaliação combinada de parâmetros do desenvolvimento e morfologia embrionária poderia melhorar o procedimento de seleção, sem a necessidade de submeter muitos embriões à técnica de PGS.

Recentemente alguns estudos buscaram correlacionar morfologia e taxa de desenvolvimento embrionário com euploidia. Não há um consenso no que diz respeito ao estágio de clivagem, mas parece não estar relacionado com a euploidia embrionária (MAJUMDAR et al, 2017). Em outro ponto, estudo revelou uma proporção significativa de embriões aneuploides capaz de atingir os mais altos escores morfológicos, enquanto alguns embriões euploides são de morfologia baixa (ALFARAWATI et al, 2011). No entanto, há evidências de que embriões em fase de blastocisto com alta pontuação de massa celular interna e trofoectoderme tem maiores chances de serem euploides (YOSHIDA, 2018; SHARARA et al., 2017; MAJUMDAR et al., 2017; BARASH et. al, 2017).

A biópsia embrionária elevou as taxas de implantação para cerca de 70% a 80%, devido a isso, muitos casais com riscos de gerar embriões aneuploides buscam por essa tecnologia (LEE et al., 2013). Porém, aproximadamente 48% dos embriões biopsiados são aneuploides, ou seja, muitos embriões inviáveis passam pelo PGS (PLATTEAU et al, 2006). Os casais encontram o desafio dos altos custos dessa tecnologia (LEE et al. 2013), sendo que muitos dos seus embriões são biopsiados desnecessariamente. O objetivo desse estudo foi identificar fatores preditivos para a formação de um embrião euploide avaliados por PGS, analisando se

a morfologia embrionária em D1, D2, D3 e D5, fatores ovarianos, uterinos e masculinos podem ter relação com aneuploidia.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal com 431 embriões na fase de blastocisto que foram submetidos ao PGS. Os blastocistos foram divididos em 2 grupos: grupo euplóide  $n = 201$  e aneuplóide  $n = 225$ . Este estudo foi realizado no Centro de Medicina Reprodutiva Pró Social e Clínica Pronatus – Medicina Reprodutiva na cidade de Belém, no Estado do Pará, no período 13 de março de 2013 a 30 de abril de 2018. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/UFPA, sob o CAAE: 12779919.0000.0018. Todas as pacientes estiveram em protocolo assistencial de atendimento para FIV.

As pacientes incluídas no estudo foram pacientes submetidas à FIV no respectivo período e seguiram os seguintes protocolos de atendimento: avaliação pré-conceitual, protocolo do casal, avaliação da reserva ovariana, contagem de folículos antrais no dia 2 ou 3 do ciclo menstrual, além da dosagem de FSH, hormônio luteinizante (LH) e estradiol e hormônio antimülleriano no 3 dia do ciclo menstrual.

No 6º dia do ciclo foi iniciado o acompanhamento do crescimento folicular através da US tv e a cada dois dias até o crescimento adequado dos folículos. Quando um ou mais folículos estavam com 14 mm ou mais, foi iniciado o antagonista do GNRH (orgalutram). Após o 9º dia, a dose complementar de rFSH (PUREGON) 150 UI/dia foi iniciada. Quando a maior parte dos folículos atingiu 17 mm ou mais, desencadeou-se o processo de maturação dos oócitos pela administração de HCG (250 µg), sendo programada a captação ovular após 34 a 36 horas.

O esperma foi coletado por masturbação e foi processado segundo as técnicas de capacitação espermática. Todas as pacientes realizaram técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI – *Intracytoplasmatic Sperm Injection*).

Após a punção folicular por ultrassom vaginal, o líquido folicular foi depositado em placas de cultura. Em seguida, os oócitos foram identificados e seu complexo *cumulus-corona*, removido por exposição à hialuronidase e manuseio mecânico. A ICSI foi realizada em sistema com microscópio invertido e equipado com um sistema de lentes especiais e acoplado a um micromanipulador automático. Uma delicada sucção foi aplicada

cuidadosamente para quebrar o oolema e evidenciar a presença de ooplasma dentro da micropipeta, confirmando a deposição intracitoplasmática do espermatozoide. O processo de fertilização normal foi definido pela formação de dois pronúcleos distintos, seguida do aparecimento de clivagem embrionária após 24 horas da fertilização.

A avaliação da fertilização e da morfologia embrionária foram realizadas por observação da evolução do embrião nos dias 1, 2 e 3 (fase de clivagem) e dias 5 e 6 (fase de blastocisto). No dia 4 o embrião não é avaliada por estar em fase de mórula (compactação), fase que não há parâmetros adequados para análise. No D1 o oócito fertilizado considerado ideal foi o esférico e com dois corpos polares, dois pronúcleos justapostos centralmente localizados e de tamanho uniforme, com membranas distintas. Tanto o tamanho quanto a localização do pronuclear foram avaliados no teste de fertilização. A pontuação pronuclear foi dividida em três categorias: simétrica; não simétrica; e anormal.

D2/D3: Um embrião do Dia 2 foi considerado ideal (44 + 1 h pós-inseminação) com 4 blastômeros mononucleados de tamanho igual em um arranjo tetraédrico tridimensional, com 10% de fragmentação. Um embrião foi considerado ideal no Dia 3 (68 + 1 h pós-inseminação) com 8 blastômeros mononucleados do mesmo tamanho, com 10% de fragmentação. O formato de pontuação seria o número de células, grau e razão para o grau. Um fragmento foi definido como uma estrutura citoplasmática ligada à membrana extracelular com 45 µm de diâmetro em um embrião no Dia 2 e 40 µm de diâmetro em um embrião do Dia 3. Os graus relativos de fragmentação foram definidos como: leve (10%); moderada (10-25%) e grave (0,25%). A multinucleação foi definida como a presença de mais de um núcleo em um blastômero e inclui micronúcleos.

D5/D6 (BLASTOCISTO): A classificação do blastocisto foi realizada de acordo com do estágio de desenvolvimento, da massa intracelular e do trofoectoderma, seguindo o esquema a seguir:

ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO: 1=Prematuro; 2=Blastocisto; 3=Expandido; 4=Hatched/hatching.

MASSA CELULAR INTERNA: 1 - BOM = Proeminente, facilmente discernível, com muitas células compactadas e firmemente aderidas; 2 - RAZOÁVEL = Facilmente discernível, com muitas células que são agrupadas livremente; 3 - POBRE = Difícil de discernir, com poucas células.

TROFOECTODERMA: 1 – BOM: Muitas células formando um epitélio coeso; 2 – RAZOÁVEL: Poucas células formando um epitélio solto; 3 – POBRE: Pouquíssimas células.

Todos os blastocistos foram biopsiados e enviados para PGS. Os blastocistos foram divididos em 2 grupos: grupo euplóide  $n = 201$  e aneuplóide  $n = 225$ .

Foi realizada uma análise de associação entre euploidia e aneuploidia com todas as variáveis do desenvolvimeto embrionário, além das características clínicas do casal, como idade, causa e tempo de infertilidade, presença ou não de endometriose, síndrome dos ovários policísticos, fator imune, fator trombofílico, número de folículos antrais, peso, altura, qualidade seminal e qualidade do oócito.

Análise estatística foi realizada através do software SPSS. A análise do qui-quadrado foi utilizada para avaliar a diferença nos valores categóricos e teste T para valores não categóricos. Os valores contínuos serão apresentados como médias com desvio padrão. O odds-ratio foi utilizado para calcular a chance de aneuloidia embrionária. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

#### **4. RESULTADOS**

Dos 431 embriões selecionados para estudo, foram excluídos 5 embriões por falha de ampliação de DNA, sendo que no total foram analisados 426 embriões, os quais foram divididos em euploides (201) e aneuploides (225).

Influência de fatores clínicos, doenças maternas e de reserva ovariana no risco de aneuploidia embrionária está demonstrada nas tabelas 1 e 2. Quanto maior a idade média materna, maior o risco de aneuploidia (grupo euploide 33,99 anos DP 3,98 idade versus grupo aneuploide 36,48 anos DP 4,52 idade,  $p=0,001$ ). Mulheres acima de 40 anos tem OR 2,9 (IC 1,6 – 5,  $P 0,001$ ,) para aneuploidia. A endometriose tem um OR 0,4, (IC 0,1 – 1,  $P 0,049$ ) para aneuploidia. Os outros fatores como aborto de repetição, fator masculino, fator tubário, fator uterino, SOP, fator imunológico, trombofilias, embrião fresco e poor responder não foram associados com o risco de aneuploidia.

**TABELA 1**  
Influência de fatores clínicos e doenças maternas no risco de aneuploidia embrionária

	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	OR	p <sup>a</sup>
<b>Idade</b>				
< 40	88,6% (163)	72,6% (151)	2,9 (1,6 - 5)	0,001
> 40	11,4% (21)	27,4% (57)		
<b>Aborto de repetição</b>				
Não	92,4% (170)	92,8% (193)		0,881
Sim	7,6% (14)	7,2% (15)		
<b>Fator tubário<sup>b</sup></b>				
Não	52,2% (96)	55,3% (115)		0,537
Sim	47,8% (88)	44,7% (93)		
<b>Fator uterino<sup>c</sup></b>				
Não	84,6% (154)	85,5% (177)		0,805
Sim	15,4% (28)	14,5% (30)		
<b>SOP</b>				
Não	46,5% (86)	53,1% (111)		0,189
Sim	53,5% (99)	46,9% (98)		
<b>Endometriose</b>				
Não	91,4% (169)	96,1% (199)	0,4 (0,1 - 1)	0,049
Sim	8,6% (16)	3,9% (8)		
<b>Fator imunológico</b>				
Não	69,2% (128)	76,6% (160)		0,1
Sim	30,8% (57)	23,4% (49)		
<b>Trombofilias</b>				
Não	85,4% (158)	88% (184)		0,441
Sim	14,6% (27)	12% (25)		
<b>Embrião fresco</b>				
Não	84,6% (170)	79,6% (179)		0,179
Sim	15,4% (31)	20,4% (46)		
<b>Poor responder</b>				
Não	97,9% (190)	94,9% (205)		0,103
Sim	2,1% (4)	5,1% (11)		

<sup>a</sup> Teste: Qui-quadrado

<sup>b</sup> Fatores tubários: aderências, más formações, , laqueadura.

<sup>d</sup> Fatores uterinos: más formações, histerectomia, mioma.

<sup>c</sup> Poor responder: menos de 6 embriões



**TABELA 2**

Influência de fatores clínicos e de reserva ovariana maternas no risco de aneuploidia embrionária

	Euploide M (DP)	Aneuploide M (DP)	p <sup>a</sup>
Tempo de infertilidade	3,07 (2,53)	3,74 (3,24)	0,340 <sup>b</sup>
Idade da mulher	33,99 (3,98)	36,48 (4,52)	0,001 <sup>b</sup>
Peso da mulher	63,45 (8,04)	1233,78 (8711,85)	0,830 <sup>b</sup>
Altura da mulher	3,16 (15,29)	2,82 (13,54)	0,861
Folículos antrais	16,10 (8,99)	14,59 (11,44)	0,155
<sup>a</sup> T-test			
<sup>b</sup> Mann-Whitney			
Média			
Desvio Padrão			

Na Tabela 3 está demonstrada a avaliação dos fatores masculinos no risco de aneuploidia embrionária. Os fatores como idade e qualidade do sêmen (concentração, motilidade, capacitação e espermatozoides ovais) não foram associados com aneuploidia.

**TABELA 3**

Avaliação dos fatores masculinos no risco de aneuploidia embrionária

	Euploide M (DP)	Aneuploide M (DP)	p <sup>a</sup>
Idade do homem	39,07 (7,44)	40,83 (7,51)	0,180
Concentração sêmen	58,69 (45,39)	56,69 (48,65)	0,686
Motilidade do semên	51,64 (22,19)	50 (21,98)	0,483
Capacitação do semên	29,39 (31,43)	21,32 (29,65)	0,058
Espermatozoides ovais	2,54 (2,45)	1,98 (1,20)	0,052 <sup>b</sup>
<sup>a</sup> T-test			
<sup>b</sup> Mann-Whitney			
Média			
Desvio Padrão			

A influência do número de células em D2 e D3 na euploidia está exposta na tabela 4. Não houve associação no número de células embrionárias em D2 e D3 com euploidia.

**TABELA 4**

Número de células no embrião em D2 e D3 relacionados com euploidia

	Euploide Média (DP)	Aneuploide Média (DP)	P <sup>a</sup>
D2 CEL	3,99 (0,9)	3,88 (1,0)	0,099
D3 CEL	7,54 (1,8)	7,56 (1,5)	0,169
<sup>a</sup> T-test			
<sup>b</sup> Mann-Whitney			
Média			
Desvio Padrão			

Nas tabelas 5, 6 e 7 estão expostas as avaliações da morfologia embrionária em D1, D2 e D3 no risco de aneuploidia. Não foi encontrada associação do número e tipo de pró-núcleos e do número de corpúsculo polar em D1 com a euploidia embrionária, bem como, também foi demonstrado que não houve influência na taxa de formação de blastocistos euploides em relação à qualidade embrionária em D2 e D3.

**TABELA 5**

Avaliação da morfologia embrionária do D1 no risco de aneuploidia

	Tipo	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	p <sup>a</sup>
<b>D1 Número de pró-núcleos</b>	0	2,1% (4)	4,7% (10)	0,256
	1	0	0,5% (1)	
	2	97,4% (188)	94,9% (204)	
	3	0,5% (1)	0	
<b>D1 Tipo de pró-núcleos</b>	1	58% (109)	58,5% (120)	0,978
	2	18,1% (34)	18,5% (38)	
	3	19,7% (37)	19,5% (40)	
	4	4,3% (8)	3,4% (7)	
<b>D1 Número de corpúsculo polar</b>	1	1,6% (3)	1,9% (4)	0,812
	2	98,4% (190)	98,1% (211)	

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado**TABELA 6**

Avaliação da morfologia embrionária do D2 no risco de aneuploidia

	Tipo	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	p <sup>a</sup>
<b>D2 Irregularidade celular</b>	0	53,9% (103)	56,5% (122)	0,605
	1	46,1% (88)	43,5% (94)	

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado**TABELA 7**

Avaliação da morfologia embrionária do D3 no risco de aneuploidia

<b>D3 Grau</b>	1	88,8% (159)	93% (187)	0,367
	2	9,5% (17)	7% (14)	
	3	0,6% (1)	0	

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado

Na tabela 8 está demonstrada a avaliação da morfologia embrionária do blastocisto no risco de aneuploidia. A classificação da trofoectoderme foi dividida em A, B e C. Analisando os tipos morfológicos do trofoectoderme, massa celular interna e grau de expansão, os resultados demonstram que apenas a qualidade do trofoectoderme ( $p = 0,001$ ) está relacionada com a euploidia. Maiores taxas de euploidia foram encontradas em embriões com trofoectoderme do tipo A (36,3%) quando comparados com os aneuploides do tipo A (27,1%), enquanto que os do tipo B tiveram taxas semelhantes, euploides (47,3%) aneuploides (50,7%) e já no tipo C a taxa de euploidia foi menor (16,4%) do que de aneuploidia (22,2%). Já a análise do grau de expansão ( $p = 0,228$ ) e o tipo de massa celular interna ( $p = 0,084$ ) não tiveram influência na euploidia embrionária.

**TABELA 8**

Avaliação da morfologia embrionária do blastocisto no risco de aneuploidia

	Tipo	Euploide % (n)	Aneuploide % (n)	OR	p <sup>a</sup>
<b>Grau de expansão</b>	3	62,2% (125)	66,7% (150)		0,228
	4	34,3% (69)	32,4% (73)		
	5	2,5% (5)	0,9% (2)		
	6	1% (2)	0		
<b>Massa celular interna</b>	A	36,3% (73)	27,1% (61)		0,084
	B	47,3% (95)	50,7% (114)		
	C	16,4% (33)	22,2% (50)		
<b>Trofoectoderme</b>	A	26,9% (54)	13,8% (31)	2,7 (1,6 - 4,3) <sup>b</sup>	0,001
	B	58,2% (117)	53,8% (121)	4,1 (2,2 - 7,7) <sup>c</sup>	
	C	14,9% (30)	32% (72)		

<sup>a</sup>Teste: Qui-quadrado<sup>b</sup>Risco de aneuploidia: (TIPO A + TIPO B) x TIPO C<sup>c</sup>Risco de aneuploidia: TIPO A x TIPO C

Embriões com trofoectoderma do tipo C apresentaram risco 2,7 vezes maior de aneuploidia (OR 2,7, IC 1,6 – 4,3) quando comparadas aos trofoectoderma tipos A + B e risco

4,1 vezes maior de aneuploidia (OR 4.1, IC 2.2 – 7.7), quando comparados ao trofoectoderma do tipo A. Não foi encontrada associação entre grau de expansão e euploidia ( $p=0,228$ ) nem entre massa celular interna e euploidia ( $p=0,084$ ).

### 3. DISCUSSÃO

Este estudo buscou avaliar a presença de fatores morfológicos embrionários e clínicos do casal que sejam preditivos para a formação de blastocistos euploides. Encontramos que um embrião com trofoectoderme tipo C tem 4,1 mais chances de ser aneuploide (IC 2,2 - 7,7), sendo este o único parâmetro de morfologia embrionária que foi associada com a aneuploidia. Os demais parâmetros morfológicos das fases de clivagem e de formação do blastocisto não foram associados com aneuploidia. Além disso, entre os fatores clínicos, apenas a idade da mulher e a endometriose tiveram associação com a euploidia sendo que mulheres a partir de 40 anos tem 2,9 vezes mais risco de aneuploidia (IC 1,6 – 5) e pacientes com endometriose tem risco 0,4 vezes maior (IC 0,1 -1).

A avaliação morfológica do blastocisto parece apresentar correlação com a as taxas de implantação, mas não há uma resposta definitiva sobre a associação desta com a euploidia (ALFARAWATI et al, 2011; BARASH et al, 2017; MAJUMDAR et al,2017). Analisando os tipos morfológicos do trofoectoderme, massa celular interna e grau de expansão, encontramos resultados que demonstram que apenas a qualidade do trofoectoderme está relacionada com a euploidia. Maiores taxas de aneuploidia foram encontradas em embriões com trofoectoderme do TIPO C quando comparados aos do TIPO A (OR 4,1; 2,2 – 7,7). Já a análise do grau de expansão e do tipo de massa celular interna não teve influência na euploidia embrionária. Alguns estudos também demonstraram que a morfologia do embrião em estágio de blastocisto tem associação com a euploidia, especialmente os parâmetros de massa celular interna e trofoectoderme (BARASH et al, 2017; MAJUMDAR et al,2017). Nosso estudo demonstrou que a qualidade das células do trofoblasto está associada com a euploidia, mas a qualidade da massa interna não. O número reduzido de células do TE pode ser atribuído à falha da divisão celular devido a anormalidades das organelas e anormalidades cromossômicas como aneuploidia e morte celular (IWASAWA et al, 2019). Alguns estudos encontraram associação da euploidia com o estágio de clivagem do embrião (KROENER et al, 2015; PHAN et al, 2014). Entretanto, não encontramos relação da morfologia embrionária com a euploidia corroborando com estudos recentes sobre este tema (BARASH et a, 2017; MAJUMDAR et al, 2017).

Foi encontrada relação entre a idade da mulher e euploidia. Pesquisa anterior apresentou o mesmo achado, usando 38 anos como idade de corte (BARASH et al, 2017; SHAHINE et al, 2016). Foi constatado que mulheres com a partir dos 40 anos têm embriões com maiores taxas de aneuploidia (OR 2,9; IC 1,6 - 5). Sabe-se que mulheres com idade acima de 38 anos apresentam redução da reserva ovariana, além disso, tem baixa qualidade oocitária e maior risco de anomalias cromossômicas (COSTA et al, 2016; BEGUM, 2008). Segundo estudos, a idade materna avançada afeta negativamente o desenvolvimento embrionário e isso poderia estar relacionado com a aneuploidia (ZIEBE et al, 2001). Ademais, nossos dados apontaram que a idade do homem não teve relação com a euploidia embrionária.

Encontramos que mulheres com endometriose tem maior risco de aneuploidia embrionária (OR 0,4; IC 0,1 - 1). Nossos resultados foram diferentes de estudos anteriores que não encontraram essa associação (POLAT et al, 2015; JUNEAU, 2017). Essa relação poderia ser explicada pela presença de alterações no complexo de células fusiformes de oócitos em mulheres com endometriose que poderia estar alterado e ser propenso a comprometer os microtúbulos, aumentando os erros meióticos, isso poderia explicar o risco aumentado de aneuploidia (DE BROU, et al, 2013).

Sabe-se que as taxas de implantação estão relacionadas com a presença da euploidia (BEGUM, 2008). Por isso nosso estudo buscou relacionar se as mulheres que tinham abortos recorrentes podiam ter associação com a aneuploidia, analisamos se tempo de infertilidade da mulher e o número de abortos recorrentes poderiam estar relacionados com a aneuploidia e não encontramos associação. Outras patologias clínicas maternas, como síndrome dos ovários policísticos, alterações imunológicas e trombofilias, alterações tubárias e uterinas não tiveram influência estatística com euploidia em nosso estudo. Em relação à SOP, pouco se sabe sobre a informação genética de oócitos e embriões de pacientes com essa patologia, entretanto, estudo demonstrou que não há relação da aneuploidia com a SOP (WANG, 2016).

Conforme estudos, fator masculino grave prejudica a competência embrionária precoce em termos de taxa de fertilização e potencial de desenvolvimento. No entanto, a taxa de euploidia e potencial de implantação dos blastocistos obtidos independem do espermatozoide (MAZZILLI, 2017). Apesar disso, a qualidade do gameta masculino como concentração, motilidade e capacitação do sêmen, e também a presença de espermatozoides ovais não influenciaram na euploidia.

Nosso estudo foi transversal retrospectivo, mas apesar disso o nosso número de embriões é significativo e nossos resultados são representativos. Tivemos, em nossa análise, achados que nos fazem compreender melhor a dinâmica embrionária, dessa forma nosso estudo tem grande contribuição, pois poderá orientar melhor a seleção de embriões submetidos ao PGS.

#### 4. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou que a má qualidade do trofoctoderma embrionário está associada a um risco de 4,1 vezes para formação de embriões aneuploides. Demonstramos que os outros parâmetros de avaliação embrionária não estão associados à aneuploidia. Além disso, entre os fatores clínicos maternos e paternos, somente a presença de endometriose (OR 0,4; IC 0,1 – 1) e o avanço da idade materna, especialmente mulheres acima de 40 anos (OR 2,9; 1,6 - 5) estão associadas com a aneuploidia. Esse achado tem grande importância para as tecnologias de reprodução assistida, visto que pode auxiliar na seleção dos embriões que serão submetidos a análise genética pre-implantacional .

#### REFERÊNCIAS

1. ALFARAWATI, Samer et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 2, p. 520-524, 2011.
2. BARASH, Oleksii O. et al. Association between growth dynamics, morphological parameters, the chromosomal status of the blastocysts, and clinical outcomes in IVF PGS cycles with single embryo transfer. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 34, n. 8, p. 1007-1016, 2017
3. BEGUM, Mosammat Rashida. Assisted Reproductive Technology: Techniques and Limitations. **Journal of Bangladesh College of Physicians and Surgeons**, v. 26, n. 3, p. 135-141, 2008.
4. BREZINA, Paul R. et al. Preimplantation genetic testing. **Bmj**, v. 345, p. e5908, 2012.
5. COSTA, Daniela et al. Técnicas de Reprodução Humana Assistida para o Tratamento da Infertilidade. 2016

6. DA BROI, M. G. et al. Follicular fluid from infertile women with mild endometriosis may compromise the meiotic spindles of bovine metaphase II oocytes. **Human Reproduction**, v. 29, n. 2, p. 315-323, 2013.
7. HODES-WERTZ, Brooke et al. Idiopathic recurrent miscarriage is caused mostly by aneuploid embryos. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 3, p. 675-680, 2012.
8. IWASAWA, Takuya et al. Human frozen-thawed blastocyst morphokinetics observed using time-lapse cinematography reflects the number of trophoctoderm cells. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0210992, 2019.
9. JUNEAU, Caroline et al. Patients with endometriosis have aneuploidy rates equivalent to their age-matched peers in the in vitro fertilization population. **Fertility and sterility**, v. 108, n. 2, p. 284-288, 2017.
10. KROENER, Lindsay L. et al. Increased blastomere number in cleavage-stage embryos is associated with higher aneuploidy. **Fertility and sterility**, v. 103, n. 3, p. 694-698, 2015.
11. LEE, Evelyn et al. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. **Human Reproduction**, v. 30, n. 2, p. 473-483, 2014.
12. MAJUMDAR, Gaurav et al. Relationship between morphology, euploidy and implantation potential of cleavage and blastocyst stage embryos. **Journal of human reproductive sciences**, v. 10, n. 1, p. 49, 2017.
13. MAZZILLI, Rossella et al. Effect of the male factor on the clinical outcome of intracytoplasmic sperm injection combined with preimplantation aneuploidy testing: observational longitudinal cohort study of 1,219 consecutive cycles. **Fertility and sterility**, v. 108, n. 6, p. 961-972. e3, 2017.
14. MUNNÉ, Santiago et al. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. **Fertility and sterility**, v. 85, n. 2, p. 326-332, 2006.
15. MUNNÉ, Santiago; GRIFO, James; WELLS, Dagan. Mosaicism: “survival of the fittest” versus “no embryo left behind”. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 5, p. 1146-1149, 2016.
16. PHAN, Vy et al. Correlation between embryo morphology and development and chromosomal complement. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 85-89, 2014
17. PLATTEAU, Peter et al. Which patients with recurrent implantation failure after IVF benefit from PGD for aneuploidy screening?. **Reproductive biomedicine online**, v. 12, n. 3, p. 334-339, 2006.

18. POLAT, Mehtap et al. In vitro fertilization for endometriosis-associated infertility. **Women's Health**, v. 11, n. 5, p. 633-641, 2015.
19. SCOTT, Richard T.; GALLIANO, Daniela. The challenge of embryonic mosaicism in preimplantation genetic screening. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 5, p. 1150-1152, 2016.
20. SHAHINE, Lora K. et al. Higher rates of aneuploidy in blastocysts and higher risk of no embryo transfer in recurrent pregnancy loss patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 106, n. 5, p. 1124-1128, 2016.
21. SHARARA, F.; GOODWIN, M. R.; ABDO, G. A. Morphology matters: increased embryo euploidy rates and pregnancy rates with increased blastocyst quality. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 3, p. e278-e279, 2017.
22. WANG, Qiong et al. Low aneuploidy rate in early pregnancy loss abortuses from patients with polycystic ovary syndrome. **Reproductive biomedicine online**, v. 33, n. 1, p. 85-92, 2016.
23. YOSHIDA, Ivan H. et al. Can trophectoderm morphology act as a predictor for euploidy?. **JBRA assisted reproduction**, v. 22, n. 2, p. 113, 2018.
24. ZHANG, Wanlin et al. Clinical outcomes of frozen embryo versus fresh embryo transfer following in vitro fertilization: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Archives of gynecology and obstetrics**, p. 1-14, 2018
25. ZIEBE, Søren et al. Embryo quality and developmental potential is compromised by age. **Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica**, v. 80, n. 2, p. 169-169, 2001.



## ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UFPA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DOS FATORES PREDITIVOS DE FORMAÇÃO DE BLASTOCISTOS EUPLOIDES AVALIADOS POR DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL (PGS)

**Pesquisador:** João Paolo Bilibio

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 12779919.3.0000.0018

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará - ICS/ UFPA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.291.616

#### Apresentação do Projeto:

Em um programa de fertilização in vitro, a viabilidade embrionária deve ser estimada antes da transferência, com o objetivo de melhorar a eficiência da técnica. Uma questão importante na FIV é como avaliar a viabilidade do embrião e como selecionar o(s) embrião(s) para transferência. Uma análise morfológica não invasiva por meio da avaliação dos embriões em desenvolvimento até a fase de blastocisto. Atualmente, realiza-se a biópsia genética pré-implantacional dos embriões para analisar se estes são euploides. Nesse estudo, pretende-se encontrar uma relação entre a morfologia embrionária, observada ao longo dos dias de seu desenvolvimento in vitro que possa prever se este embrião é euploide, dispensando a análise genética.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Identificar os fatores preditivos para a formação de um embrião euploide avaliados por PGS.

**Objetivo Secundário:** Avaliar se a análise da morfologia embrionária em D5 está associada com aneuploidia. Avaliar se a análise da morfologia embrionária em D3 está associada com aneuploidia. Avaliar se a análise da morfologia embrionária em D2 está associada com aneuploidia.

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-SI do ICS 13 - 2º and.

**Bairro:** Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110

**UF:** PA **Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

UFPA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 3.291.616

Avaliar se a análise da morfologia embrionária em D1 está associada com aneuploidia. Avaliar se a disfunção ovulatória está associada com aneuploidia. Avaliar se a diminuição da reserva ovariana está associada com aneuploidia. Avaliar se a endometriose está associada com aneuploidia. Avaliar se os fatores uterinos estão associados com aneuploidia. Avaliar se os fatores masculinos estão associados com aneuploidia.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos: Os riscos são de quebra de sigilo e constrangimento aos participantes da pesquisa.

Benefícios: Buscar por fatores preditivos na morfologia embrionária durante o desenvolvimento do embrião que reduza o número de biópsias para análise genética pré-implantacional, reduzindo assim os custos para a realização da fertilização in vitro.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O protocolo encaminhado dispõe de metodologia e critérios definidos conforme resolução 466/12 do CNS/MS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os documentos apresentados contemplam os sugeridos pelo sistema CEP/CONEP.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Diante ao exposto somos pela aprovação do protocolo. Este é nosso parecer, SMJ.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1203386.pdf	29/04/2019 12:41:16		Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTOASSINADA.pdf	29/04/2019 02:04:44	João Paolo Bilíbio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AVALIACAO_DOS_FATORES_PREDITIVOS_DE_FORMACAO_DE_BLASTOCISTOS_EUPLOIDES_AVALIADOS_POR_DIAGNOSTICO_GENETICO_PREIMPLANTACIONAL_PGS.pdf	29/04/2019 02:03:28	João Paolo Bilíbio	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório /	TermodeCompromissodeutilizacaoedados.pdf	29/04/2019 01:58:05	João Paolo Bilíbio	Aceito

**Endereço:** Rua Augusto Corrêa nº 01-Si do ICS 13 - 2º and.:  
**Bairro:** Campus Universitário do Guamá **CEP:** 66.075-110  
**UF:** PA **Município:** BELEM  
**Telefone:** (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br

UFPA - INSTITUTO DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 3.291.616

Biobanco	TermodeCompromissodeutilizacaodeDa dos.pdf	29/04/2019 01:58:05	João Paolo Bilibio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	justificativadeisencao.pdf	29/04/2019 01:56:41	João Paolo Bilibio	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciadaInstituicao.pdf	29/04/2019 01:55:59	João Paolo Bilibio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaBilibio.pdf	29/04/2019 01:54:41	João Paolo Bilibio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuenciabrenda.pdf	29/04/2019 00:41:00	João Paolo Bilibio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	AnuenciaFLORA.pdf	29/04/2019 00:33:42	João Paolo Bilibio	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	28/04/2019 23:31:52	João Paolo Bilibio	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	28/04/2019 23:29:46	João Paolo Bilibio	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não