

Ianaê Ichikawa Ceschin

Avaliação funcional de embriões humanos doados para pesquisa: viabilidade, qualidade morfológica e potencial de geração de linhagem de células-tronco pluripotentes

Functional assessment of human embryos donated for research: viability, morphological quality and potential of generation a pluripotent stem cell line

Instituto de Biociências

Universidade de São Paulo

Ianaê Ichikawa Ceschin

Avaliação funcional de embriões humanos doados para pesquisa: viabilidade, qualidade morfológica e potencial de geração de linhagem de células-tronco pluripotentes

Functional assessment of human embryos donated for research: viability, morphological quality and potential of generation a pluripotent stem cell line

Título: Avaliação funcional de embriões humanos doados para pesquisa: viabilidade, qualidade morfológica e potencial de geração de linhagem de células-tronco pluripotentes

São Paulo

2022

Ianaê Ichikawa Ceschin

Avaliação funcional de embriões humanos doados para pesquisa: viabilidade, qualidade morfológica e potencial de geração de linhagem de células-tronco pluripotentes

Functional assessment of human embryos donated for research: viability, morphological quality and potential of generation a pluripotent stem cell line

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Aconselhamento Genético, na Área de Genética Humana.

Orientador(a): Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2022

Ichikawa Ceschin, Ianaê

Avaliação funcional de embriões humanos doados para pesquisa: viabilidade, qualidade morfológica e potencial de geração de linhagem de células-tronco pluripotentes / Ianaê Ichikawa Ceschin ; orientador Oswaldo Keith Okamoto -- São Paulo, 2022. 62 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

1. Células-tronco embrionárias humanas. 2. Teste genético pré-implantacional. 3. Aconselhamento genético . I. Keith Okamoto, Oswaldo, orient. II. Título.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Oswaldo Keith Okamoto
Orientador(a)

Dedico este trabalho á Deus, a Shiro Ichikawa, Alvaro Ceschin, meus avós – pelos ensinamentos que moldaram meu caráter – e a Bárbara Sordi Ichikawa, minha prima – pelo brevíssimo, mas amoroso e intenso convívio. Deles recebi grande estímulo para entrar neste universo da genética e sei que compartilhariam da minha alegria pela conclusão deste estudo, se ainda estivessem entre nós. Para mim eles são símbolos de honestidade, simplicidade, alegria, amizade e amor, sem essas virtudes esta pesquisa científica não seria possível.

Epígrafe

“Ainda que eu tenha o dom de profecia, saiba todos os mistérios e todo o conhecimento e tenha uma fé capaz de mover montanhas, se não tiver amor, nada serei.”

1 Coríntios 13:2 - A Bíblia Sagrada

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter me permitido ingressar no universo da genética acompanhada de pessoas únicas e tão especiais. Por ter, literalmente, feito desse caminho de pesquisa com células tronco possível.

Agradeço a minha família, Alvaro, Evana, Lucas, Nathan, Ilka, Vavo, Erna, Shiro, Bárbara, Evandro, Amanda, Cláudia e Hector pelo apoio incondicional e por me permitirem e me incentivarem a mergulhar nessa trajetória. Agradeço a Lucileine Keico pelo suporte na área de embriologia; a toda equipe Felicità Instituto de Fertilidade pela confiança e auxílio necessário à realização do trabalho, no laboratório de fertilização *in vitro*. Agradeço às pacientes que em anonimato, doaram para pesquisa um material tão precioso, fonte de conhecimento à sociedade científica.

Agradeço ao Professor Dr. Oswaldo Keith Okamoto, por todos seus ensinamentos, conselhos e acolhimento desde nosso primeiro encontro. Agradeço por ter acreditado em mim, e me dado a oportunidade de fazer parte de seu grupo incrível. Aos meus colegas da USP, por compartilharem seus conhecimentos: Thiago Giove, Kaique Silva, Dra. Patricia Semedo, Maria Susana Soia, Dra. Caroline Kaid, Dra. Beatriz Cortes, Leticia Rocha, Rodolfo Sanches, Sofia Ramos, Gabriella Hsia, Dr. Luiz Caires, Dr. Antonio Fernando Júnior, Matt Scherwood e Gabriel Bandeira. Assimilei de uma pessoa que considero sábia a ideia, de que, na ciência ninguém faz nada sozinho. Grata a todos vocês por contribuírem para essa constatação.

Índice

I. INTRODUÇÃO -----	10
Células-tronco de pluripotência induzida e células-tronco embrionárias	11
Processo de derivação de linhagem de células-tronco embrionárias-----	12
Embriões com análise genética com o teste genético pré-implantacional -----	14
Derivação de linhagem de células-tronco a partir de embriões com anormalidades genéticas -----	16
II. OBJETIVOS -----	18
III. MATERIAIS E MÉTODOS-----	19
Desenho e casuística do trabalho -----	19
Aprovação do comitê de ética-----	19
FASE I: Descongelamento e análise quanto a sobrevida, viabilidade e qualidade morfológica embrionária -----	20
FASE II: Manipulação embrionária com isolamento da massa celular interna ou remoção da zona pelúcida -----	21
FASE III: Condição de cultivo para adesão e expansão das células-tronco embrionárias-----	22
FASE IV: Caracterização das células-tronco embrionárias -----	23
IV. RESULTADOS -----	26
FASE I: Resultado quanto ao descongelamento e análise quanto a sobrevida, viabilidade e qualidade morfológica embrionária -----	26
FASE II: Resultado da manipulação embrionária com isolamento da massa celular interna ou remoção da zona pelúcida -----	28
FASE III: Resultado da expansão das células-tronco embrionárias -----	28

FASE IV: Resultado quanto a caracterização das células-tronco embrionárias-----	30
V. DISCUSSÃO-----	35
VI. CONCLUSÕES -----	44
VII. RESUMO -----	45
VIII. ABSTRACT -----	47
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	49
ANEXOS -----	62
BIBLIOGRAFIA -----	63

I. Introdução

Células-tronco embrionárias são células que possuem potencial de pluripotência, a qual reflete na capacidade de repovoar células do embrião e contribuir para a formação de todos os tipos celulares descendentes para formação de um tecido, incluindo a linhagem primordial germinativa (BRADLEY, EVANS, *et al.*, 1984). Pesquisas sobre células pluripotentes oferecem oportunidade terapêutica para milhões de pessoas afetadas por condições degenerativas, uma vez que têm a capacidade de diferenciação em três linhagens germinativas ectoderma, mesoderma e endoderma. Já se demonstrou com propriedade a derivação de células maduras, a partir de células pluripotentes humanas como, por exemplo, células adrenais e neurônios que, por sua capacidade de se diferenciarem, oferecem uma esperança promissora, quanto ao seu uso para o reparo ou reestruturação do tecido lesionado perdido (BANDA, GRABEL, 2015, LI, ZHOU, *et al.*, 2016). Por exemplo, no campo da terapia de células-tronco em estudo controlado, os pacientes com degeneração macular e perda da capacidade visual estão sendo tratados com a substituição do epitélio pigmentar da retina derivada de células-tronco embrionárias humanas (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03102138).

Para utilização de células diferenciadas em tratamentos terapêuticos, um dos desafios desse tipo de abordagem é a obtenção de uma grande quantidade de células diferenciadas necessárias para realização do transplante celular. Visando à obtenção otimizada de uma grande quantidade de células indiferenciadas e posteriormente diferenciadas, além das células-tronco embrionárias, também as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) são células promissoras em tratamentos terapêuticos (BANDA, GRABEL, 2015).

Células-tronco de pluripotência induzida e células-tronco embrionárias

As células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) revolucionaram a biologia molecular, quando descobertas, em 2006. O pesquisador Yamanaka Takahashi demonstrou, a partir da expressão de quatro fatores de transcrição (Pou5f1, Sox2, Klf4, c-Myc) a capacidade de reprogramação das células somáticas adultas para o estado de pluripotência (YAMANAKA, TAKAHASHI, 2006). Atualmente, os métodos para reprogramação variam entre os integrativos, como a utilização de retrovírus e lentivírus, a métodos não integrativos, como o uso de plasmídeos, adenovírus, mRNA modificadores (EGUIZABAL, ARAN, *et al.*, 2019) Apesar da técnica de iPSC ser considerada bem-sucedida, existem preocupações em relação a sua aplicabilidade. Por se tratar de células reprogramadas *in vitro*, há uma apreensão em relação à memória epigenética e também ao possível risco de apresentarem um maior potencial para o desenvolvimento de tumores (MAYSHAR, BEN-DAVID, *et al.*, 2010).

Em relação às células iPSC e células-tronco embrionárias humanas (hESC), estudos mostram diferenças quanto ao transcriptoma e epigenoma entre esses dois tipos celulares (BILIC, IZPISUA BELMONTE, 2012). A hESC é considerada o padrão ouro de células pluripotentes, uma vez que são, por natureza, pluripotentes, ou seja, sem manipulação externa. Ainda que isso represente uma inovação, novas linhagens de hESC se fazem necessárias para pesquisa básica e controle positivo de células pluripotentes. No Brasil, foi possível a obtenção de apenas algumas linhagens nacionais (DE OLIVEIRA GEORGES, VERGANI, *et al.*, 2014, FONSECA, COSTAS, *et al.*, 2015, FRAGA, SUKOYAN, *et al.*, 2011),

uma vez que se trata de material nobre e com dificuldades técnicas e éticas para sua derivação.

Processo de derivação de linhagem de células-tronco embrionárias

O processo de derivação de linhagem de hESC ocorre a partir de embriões em desenvolvimento inicial. Uma possibilidade, demonstrada primeiramente em embrião de camundongo, é a de obtenção a partir do isolamento de blastômeros de um embrião em estágio de clivagem com oito células (EISTETTER, 1989). Outra alternativa cujas células-tronco embrionárias foram obtidas e demonstradas em embriões humanos por Thomson e colaboradores – pode-se dar, a partir de embriões em um estágio de desenvolvimento mais avançado que o de clivagem, o blastocisto (KAUFMAN, EVANS, 1981, MARTIN, 1981, THOMSON, 1998). O embrião, em estágio avançado de desenvolvimento com o blastocisto, possui dois tipos celulares distintos. Um deles, é o trofotoderma, o qual contribui para a formação do tecido placentário (NICHOLS, SMITH, 2011). O outro, a massa celular interna (MCI), contribui para formação das células fetais propriamente ditas (NICHOLS, SMITH, 2011).

Para obtenção de hESC, a partir do blastocisto, pode-se utilizar amostra de embrião obtido a fresco, assim como aqueles que haviam sido previamente congelados e armazenados (ARAN, SOLE, *et al.*, 2012, YE, BATES, *et al.*, 2017). Diferentes metodologias já foram exploradas com objetivo do isolamento da MCI. Cada uma delas oferece vantagem e desvantagem específicas. O método com a imunocirurgia oferece uma alta taxa de isolamento da MCI. Em contrapartida, geralmente, o meio necessário pode conter componente animal, não apropriado para a geração de células-tronco embrionárias com objetivo clínico. Já, a dissecação com o laser é um método sem componentes animais, promissor para o

isolamento da MCI, mas sua desvantagem relacionada a manipulação que exige treinamento específico com equipamento de acesso restrito (KHAN, ALMOHAZEY, *et al.*, 2018). Outros pontos importantes para derivação são as condições de cultivo a que as células são expostas, como a matriz extracelular.

Os primeiros trabalhos com matriz extracelular utilizavam o cultivo com uma camada alimentadora (“feeder layer”) de fibroblastos mitoticamente inativados, que permitia uma matriz para o crescimento com a manutenção das células pluripotentes (REUBINOFF, PERA, *et al.*, 2000, THOMSON, 1998). Entretanto, pela presença do componente animal e o risco teórico de infecção por patógenos na linhagem estabelecida, a utilização desse tipo de matriz não é o mais apropriado. Outros tipos de matriz, compostas de proteínas extracelulares e fatores de crescimento, permitem a proliferação e renovação celular. O Matrigel é uma das matrizes extracelulares de membrana basal mais utilizadas *in vitro*, podendo ser utilizada em conjunto com meio de cultivo e fator de crescimento (KHAN, ALMOHAZEY, *et al.*, 2018). Ainda há um outro tipo de matriz - que pode ser utilizado com E-caderina/Laminina 521 - que contribui para o crescimento de hESC, com ausência de componente animal e, por isso, aparenta vantajosa para derivação (RODIN, ANTONSSON, *et al.*, 2014). Além da preocupação quanto às condições de cultivo específicas para geração de células pluripotentes humanas, a matéria prima a ser obtida - o embrião humano - é um material extremamente nobre, portanto de acessibilidade restrita.

A acessibilidade restrita se dá, principalmente, porque na derivação de uma linhagem de células-tronco, a partir de blastocistos, é necessário destruir o embrião para fim reprodutivo, com a geração da linhagem celular. Sendo assim, existe o desafio em estabelecer novas linhagens de células-tronco embrionárias destinadas à pesquisa e, simultaneamente,

manter o respeito e direito à vida que exerce promove debate ético e social sobre o tema (ROBERTSON, 2001). No Brasil, a Lei de Biossegurança 11.105, aprovada pelo congresso, após debates com prós e contras a utilização desse material de pesquisa, permite o uso para pesquisa, em condições específicas (ZATZ, 2009). A Lei permite o uso de embriões excedentes, obtidos em ciclo de fertilização *in vitro* (FIV), os quais só podem ser doados, após consentimento assinado pelos doadores. Nesse sentido, os embriões considerados inviáveis podem ser doados, e aqueles viáveis excedentes devem ser mantidos congelados por três anos, no mínimo, na clínica de fertilização, antes da sua utilização para pesquisa. A Lei proíbe a produção de embriões humanos para fins exclusivos de pesquisa e clonagem terapêutica. As instituições de pesquisa devem submeter os projetos à apreciação e aprovação, nos respectivos comitês de ética em pesquisa.

Embriões com análise genética com o teste genético pré-implantacional

No contexto da reprodução humana assistida, além dos casais que buscam o auxílio das técnicas reprodutivas, devido à infertilidade, outro grupo de pacientes que faz uso dessa tecnologia são os casais que buscam a seleção embrionária com base no status genético do embrião, para redução do risco de ocorrência de uma determinada condição genética. A depender do objetivo da análise genética, existem estudos específicos a serem realizados nas células embrionárias, com limite de detecção específicos da técnica aplicada. Sendo assim, o teste genético pré-implantacional para aneuploidias (PGT-A), visa à detecção de aneuploidia, mosaicismo e alterações segmentares. Esse teste normalmente é oferecido com objetivo de aumentar a taxa de implantação por transferência de embrião e redução da taxa de aborto (RUBIO, RODRIGO, *et al.*, 2019).

A metodologia de sequenciamento de nova geração (NGS) é uma das técnicas mais utilizadas atualmente. A categorização do resultado é de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo laboratório de genética por meio de validações (COONEN, RUBIO, *et al.*, 2020). Sendo assim, a categorização se dá de acordo com resultados do NGS, podendo ser: <30% das células com aneuploidia como euploide; entre 30 a 70% das células aneuploides como embrião mosaico e >70% das células aneuploides como aneuploide; aneuploides simples (aneuploidia presente em um cromossomo); aneuploides complexos (aneuploidia presente em 2-5 cromossomos); aneuploides caóticos (aneuploidia presente em >5 cromossomos); aneuploide segmentar (duplicações/deleções > 10 Mb) (RUBIO, RODRIGO, *et al.*, 2019).

Nos casos de doença genética causada por uma variante em gene alvo conhecido, o processo de análise é alvo específico e por isso, procedimento de pré-teste pode ser realizado antes da análise genética em si, das células embrionárias com o teste genético pré-implantacional para doenças monogênicas (PGT-M)(CARVALHO, MOUTOU, *et al.*, 2020). Para o processo de pré-teste, a análise de segregação por marcadores *short tandem repeat* (STR) são realizadas em amostras de DNA dos membros da família, essas amostras são necessárias para estabelecimento do haplótipo de risco. Posto isso, uma vez sendo realizado com sucesso o pré-teste, a análise com PGT-M pode ser realizada por meio da análise da variante patogênica específica no gene ligada aos marcadores STR previamente estudados (CARVALHO, MOUTOU, *et al.*, 2020). As amostras são categorizadas de acordo com a herdabilidade em relação haplótipo risco. “Alto risco” quando a variante direcionada e marcadores STR estão presentes; e “baixo risco”, quando a variante direcionada e marcadores STR não estão presentes. O PGT-M auxilia casais com alto risco de transmissão de uma condição monogênica a sua prole, com possibilidade

de redução do risco de ocorrência, com a seleção embrionária para transferência para o útero materno (SERMON, 2002).

Para realizar o estudo genético do embrião, é necessário realizar o procedimento de biopsia embrionária na qual são retiradas células do embrião, que são enviadas a centros especializados de genética para estudo do material (CARVALHO, MOUTOU, *et al.*, 2020). Posto isso, os embriões, normalmente, são congelados à espera do resultado do estudo genético. Uma vez revelado esse resultado, os genitores têm a livre escolha quanto ao destino do material: a transferência do mesmo à cavidade intrauterina com o intuito de gestação, ou o descarte, ou a doação para pesquisa. Embriões excedentes cujos seus genitores autorizam a doação para pesquisa são fontes celulares importantes, uma vez que podem ser utilizados como contribuição para o conhecimento da ciência básica, como a derivação de linhagem de células-tronco embrionárias.

Derivação de linhagem de células-tronco a partir de embriões com anormalidades genéticas

Embriões com anormalidades genéticas podem servir de modelo para o conhecimento científico de determinada alteração. Em modelos para o entendimento de doenças genéticas, a abordagem com a utilização de células primárias de pacientes com determinada doença possui a limitação quanto a variedade de tecido que podem ser gerados a partir das células obtidas. Outra limitação seria o curto tempo de vida que as células normalmente possuem *in vitro*, a não ser que sejam transformadas (BEN-YOSEF, MALCOV, *et al.*, 2008). Nesse sentido, embriões humanos anormalidades genéticas podem contribuir para a geração do conhecimento e modelo de estudo, por exemplo já foram derivadas linhagem com variantes patogênicas para condições: Huntington, Distrofia Miotônica de Duchenne, Anemia Fanconi, síndrome X Frágil e

síndrome de Marfan (NICLIS, TROUNSON, *et al.*, 2009, TELIAS, KUZNITSOV-YANOVSKY, *et al.*, 2015, VERLINSKY, STRELCHENKO, *et al.*, 2005). Além de condições monogênicas, já foram derivadas linhagens hESC de embriões com aneuploidia como por exemplo, trissomia do 13, 16, 17, 21, X e monossomia do X (BIANCOTTI, NARWANI, *et al.*, 2010).

Sendo linhagens de células-tronco embrionárias importantes para modelo de estudo para conhecimento científico, nosso estudo se propôs a avaliar a viabilidade de embriões humanos com anomalias genéticas e verificar a capacidade de derivação de novas linhagens de hESC a partir desses embriões.

II. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar o potencial funcional de embriões humanos destinados a doação para pesquisa básica, com geração de linhagem de células-tronco embrionárias.

Os objetivos específicos foram:

- I. Verificar a qualidade e viabilidade para geração de linhagem de células-tronco embrionárias a partir de embriões com anormalidade genética detectada no teste genético pré-implantacional;
- II. Verificar a viabilidade de geração de linhagem de células-tronco embrionárias de embrião com ótima qualidade morfológica;
- III. Caracterização quanto ao potencial de pluripotência da linhagem de células-tronco embrionárias obtida.

III. Materiais e Métodos

Desenho e casuística do trabalho

Este trabalho foi desenvolvido adotando-se de uma metodologia prospectiva de cunho exploratório. Foram doados e incluídos um total de 23 embriões, sendo que 22 já haviam sido submetidos a biopsia de trofotoderma com análise PGT no Laboratório Igenomix Brasil, dos quais possuíam qualidade morfológica intermediária e baixa. Em relação ao resultado da análise genética, nossa casuística foi composta de 16 embriões com aneuploidia no PGT-A; 5 embriões com haplótipo de “alto risco” para uma mutação alvo específica no gene *COL1A2* no PGT-M; 1 embrião com resultado não informativo no PGT-A. Um embrião o qual não possuía análise genética no PGT, também foi incluído no trabalho. Esse embrião foi doado à pesquisa científica uma vez que possuía tempo excedido de armazenamento congelado estipulado pela legislação.

Aprovação do comitê de ética

Todos os embriões utilizados no estudo foram doados à pesquisa de acordo com a Lei Brasileira de Biossegurança 11.105, de 25 de março de 2005, com o consentimento assinado pelos pais biológicos do centro de reprodução humana – Felicitá Instituto de Fertilidade – no qual os embriões foram formados (Anexo 1 – Carta de Anuência).

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - CAAE número 30686420.8.0000.5464.

Formação dos embriões em laboratório de fertilização *in vitro* e manipulação prévia

Os embriões obtidos para pesquisa, na clínica de FIV, haviam sido fertilizados por técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides

(PALERMO, JORIS, *et al.*, 1992) e cultivados em meio GV Blast (Ingamed, Brasil), em incubadora de atmosfera umidificada, com 5,0% de CO₂ e 20% de O₂ a 37 °C, até o dia 5 ou 6 de fertilização. A equipe de embriologia, realizou a avaliação dos blastocistos de acordo com a classificação de Gardner & Scofield, antes da biópsia de trofotoderma para os embriões com análise genética, e antes do congelamento, para o embrião sem análise genética (GARDNER, SCHOOLCRAFT, 1999). O procedimento de biópsia do trofotoderma havia sido realizado por embriologista sênior de acordo com as recomendações (KOKKALI, COTICCHIO, *et al.*, 2020). As células obtidas do procedimento foram lavadas em tampão fosfato salino (PBS), coletadas em tubos estéreis. As amostras foram congeladas a -20°C, armazenadas e enviadas para o Laboratório Igenomix Brasil para estudo com PGT-A e PGT-M. Os embriões foram criopreservados, conforme (ALMODIN, MINGUETTI-CAMARA, *et al.*, 2010).

FASE I: Descongelamento e análise quanto a sobrevida, viabilidade e qualidade morfológica embrionária

Os 23 blastocistos doados foram descongelados seguindo protocolo de Almodin e colaboradores (ALMODIN, MINGUETTI-CAMARA, *et al.*, 2010). Os embriões foram mantidos com condições ideais de cultivo em meio GV Blast (Ingamed, Brasil) em incubadora de atmosfera umidificada com 5,0% de CO₂ e 20% de O₂ a 37 °C, por 24 horas. Após esse período, a sobrevida embrionária foi avaliada morfolologicamente no microscópio invertido Diaphot 300. Considerou-se embriões que sobreviveram ao procedimento aqueles que apresentaram menos de 50% de células degeneradas.

Os embriões que sobreviveram ao procedimento foram avaliados quanto a viabilidade no microscópio invertido Diaphot 300. Considerou-

se embriões viáveis aqueles blastocistos que apresentaram mais de 50% de expansão do blastocelo. Os embriões viáveis foram avaliados por aspectos de qualidade, segundo classificação de Gardner & Scofield (GARDNER, SCHOOLCRAFT, 1999).

O sistema de classificação foi composto pelo grau de expansão do blastocelo, qualidade da MCI e trofotoderma. Os blastocistos receberam pontuação numérica de 1 a 6 com base em seu grau de expansão da blastocelo e status de expansão: (1) blastocisto precoce, com blastocelo com menos da metade do volume do embrião; (2) blastocisto, a blastocelo é maior ou igual à metade o volume do embrião; (3) blastocisto completo, a blastocelo preenche o embrião; (4) expandido, volume da blastocelo é maior e a zona pelúcida (ZP) está afinada; (5) blastocisto eclodido, o trofotoderma começou a herniar através da ZP; (6) blastocisto eclodido, com embrião fora da ZP. Segunda etapa na pontuação dos blastocistos, com classificação a partir do grau 2 de expansão da blastocelo, avaliou-se o aspecto da MCI e o trofotoderma em A, B e C. Classificação MCI: A- células bem compactadas; B- células frouxamente agrupadas; C- poucas células. Classificação do trofotoderma: A- células formando um epitélio coesivo; B-poucas células formando um epitélio frouxo; C- poucas células grandes (GARDNER, 2000, GARDNER, SCHOOLCRAFT, 1999).

FASE II: Manipulação embrionária com isolamento da massa celular interna ou remoção da zona pelúcida

Aqueles embriões que apresentaram viabilidade e que foram avaliados morfológicamente, foram manipulados para tentativa de derivação de hESC. A manipulação do embrião variou dependendo da definição de MCI e qualidade do blastocisto. Embriões com MCI bem definida foram submetidos à dissecação da MCI por pulso de laser de alta precisão (TURETSKY, AIZENMAN, *et al.*, 2008). Em seguida, a MCI

foi transferida para a placa de cultura pré-tratada para expansão celular. Embriões sem a MCI definida ou com baixa qualidade morfológica tiveram a ZP removida por pulso de laser e manipulação mecânica. O embrião inteiro sem a ZP foi então transferido para a placa de cultura pré-tratada para expansão celular.

FASE III: Condição de cultivo para adesão e expansão das células-tronco embrionárias

Para o recebimento das MCI ou do embrião sem a ZP, as placas foram pré-tratadas com matriz de membrana basal. Para matriz, utilizou-se na fase inicial de derivação, laminina recombinante 521 (Biolamina) e E-caderina (R&D Systems) diluídas na razão 9:1 com PBS (Dulbecco, Ingamed, Brasil). As placas de cultura foram tratadas a 37 °C, por 2 horas, em concentração de 13,5 µg/mL de 521 laminina e 1,5 µg/mL de E-caderina (DOMOGATSKAYA, RODIN, *et al.*, 2012, RODIN, ANTONSSON, *et al.*, 2014). Empregou-se meio de cultivo Mtser Plus, previamente aquecido a 37 °C (LUDWIG, LEVENSTEIN, *et al.*, 2006). As células foram mantidas em incubadora, com atmosfera controlada, 5% de CO₂ e 5% de O₂. A primeira troca de meio foi realizada após 48 horas, substituindo metade do volume por meio de cultivo fresco. Após essa primeira meia troca de meio, novas trocas foram realizadas a cada 48 horas, por meio de cultivo fresco previamente aquecido. A primeira passagem celular foi realizada mecanicamente, com 9 dias do plaqueamento. As colônias de hESC foram cortadas e transferidas para uma nova placa pré-tratada, em área semelhante, e cultivadas com meio suplementado com 10 µM de Rock inibidor (Y-27632).

Novas colônias hESC foram passadas a cada 5-12 dias nas primeiras semanas. A partir da passagem 4, à medida que a cultura celular se tornou mais estável e homogênea, as passagens foram feitas em razão de divisão

de 1:2 realizadas com o reagente de dissociação (BAJPAI, LESPERANCE, *et al.*, 2008), utilizando Matrigel (Corning) como matriz, e 10µm de Rock inibidor (Y-27632) no meio. Uma vez estabelecida a linhagem hESC, as células foram mantidas com agente de dissociação química, Matrigel como matriz e meio de cultivo com 1:500 Normocin (Invivogen).

Na clínica de FIV, as células foram criopreservadas com Cryostor CS10 (Stemcell technologies), de acordo com as instruções do fabricante (RAMOS, MATHEW, *et al.*, 2014). As células com o meio de criopreservação foram progressivamente resfriadas pelo seguinte programa de incubação: -20 °C por 2 horas, seguido por -80°C por 24 horas, e armazenamento final em nitrogênio líquido a -196 °C.

FASE IV: Caracterização das células-tronco embrionárias

As células congeladas foram levadas para o Laboratório do Centro de pesquisa sobre o genoma humano e genômica – USP, as quais foram descongeladas e mantidas em incubadora 5% de CO₂ e 20% de O₂ com meio de cultivo Mtser Plus, e Matrigel de matriz extracelular e 1:500 de Normocin. As células-tronco embrionárias foram avaliadas quanto ao potencial de pluripotência determinada pela expressão dos marcadores OCT4A, NANOG, SOX2 e SSEA4, em microscopia de imunofluorescência e citometria de fluxo.

Para a análise de imunofluorescência, as hESC na passagem 7, foram cultivadas em câmaras de lâminas (Labtech, NUNC, ThermoFisher), fixadas com paraformaldeído 4%, por uma hora. As células foram então incubadas, durante a noite, a 4°C, com mAb Rabbit primário, nas seguintes diluições: 1:400 para OCT4A (OCT4A Cell Signaling, Massachusetts, EUA); 1:200 para NANOG (NANOG Cell Signaling, Massachusetts, EUA); 1:400 para SOX2 (SOX2 Cell Signaling, Massachusetts, EUA) e

1:10 para SSEA4 (SSEA4Alexa Fluor 488 Mouse, BD-Biosciences, EUA). No dia seguinte, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com anticorpos secundários, conjugados com Alexa-Fluor 488 Goat Anti-Rabbit (ThermoFisher) e 1µg/mL de DAPI. As lâminas foram dispostas em meio de montagem VectaShield (Vector Laboratory, Burlingame, CA, EUA) e analisadas no microscópio confocal de fluorescência Zeiss LSM 800.

Para a citometria de fluxo, as células na passagem 7 foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por uma hora, e incubadas por 24 horas a 4°C, com mAb - Rabbit primário nas diluições: 1:200 para OCT4A (OCT4A Cell Signaling, Massachusetts, EUA); 1:100 para NANOG (NANOG Cell Signaling, Massachusetts, EUA); 1:300 para SOX2 (SOX2 Cell Signaling, Massachusetts, EUA) e 1:10 para SSEA4 (SSEA4Alexa Fluor 488 Mouse, BD-Biosciences, EUA). Após três lavagens, as células foram incubadas com anticorpos secundários, conjugados com Alexa-Fluor 488 Goat Anti-Rabbit (ThermoFisher). A análise foi realizada com cinco mil eventos adquiridos com o citômetro de fluxo FACS ARIA II (BD Bioscience), e os resultados foram analisados com o software Flow Jo.

A diferenciação espontânea *in vitro* de hESC foi analisada pela formação de corpos embrioides (CE) como descrito (ITSKOVITZ-ELDOR, SCHULDINER, *et al.*, 2000). As células hESC foram dissociadas e colocadas a uma concentração de 9000 células/poço, em uma placa de 96 poços de fundo redondo, de fixação ultrabaixa (Corning), em meio MTser Plus. Após o quarto dia de crescimento, o meio foi trocado por um meio de diferenciação, contendo 80% de dulbecco's modified eagle medium (DMEM), com alta glicose (Gibco), 20% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco), Glutamax 1X (Gibco) e solução antibiótico-antimicótica a 1% (Gibco). Após uma semana de crescimento, foi avaliada a presença de células das três camadas germinativas por imunofluorescência. Os CE

foram fixados com paraformaldeído a 4%, por quinze minutos, e incubados durante a noite a 4°C, com anticorpos primários, em uma diluição de 1:1000. Os anticorpos primários utilizados foram: mesoderma-rabbit Brachyury (T) (Albacam, Reino Unido); endoderma-mouse FOXA4 (Albacam, Reino Unido); ectoderma-rabbit PAX6 (Albacam, Reino Unido). No dia seguinte, os EC foram lavados três vezes e incubados por uma hora com anticorpos secundários de anti-rabbit Alexa Fluor 647 (ThermoFisher) e anti-mouse Alexa Fluor 488 (ThermoFisher) na diluição de 1:1000. Os CE foram transferidos para uma placa com PBS, e as imagens foram capturadas imediatamente por microscopia confocal de fluorescência (Zeiss LSM 800).

A avaliação cromossômica da hESC foi avaliada por *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) e *microarray comparative genomic hybridization* (array-CGH). O DNA genômico foi extraído da linhagem de hESC (passagem 7) usando o mini kit QIAmp DNA (QIA Gen), de acordo com o protocolo do fabricante. O MLPA foi realizado com MLPA-MRC-Holland – Probemix P070 *Subtomereres* Mix 1 (Salsa-MLPA) (AHN, MACKIE OGILVIE, *et al.*, 2007), para avaliar a alteração em *copy number variation* (CNV), deleção e duplicação das regiões subteloméricas. O ensaio array-CGH (plataforma 180 K; Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EUA) também foi realizado para investigar a presença de CNVs raras em todo o genoma, e a análise foi realizada usando o software Nexus Copy Number (Biodiscovery).

IV. Resultados

FASE I: Resultado quanto ao descongelamento e análise quanto a sobrevida, viabilidade e qualidade morfológica embrionária

Os embriões doados para o presente estudo foram avaliados morfológicamente após o descongelamento, cujo resultado encontra-se resumido na Tabela 1.

Tabela 1. Casuística dos 23 embriões avaliados neste estudo. E-embrião; Classificação do embrião de acordo com Gardner e Scofield (1999); PGT-A- teste genético pré-implantacional para aneuploidias; PGT-M - teste genético pré-implantacional para doenças monogênicas; Q.M.E- qualidade morfológica embrionária N.S.- não sobrevida; N.V.- não viabilidade.

Identificação dos embriões	Q.M.E antes da biopsia de trofotoderma ou antes do congelamento	Categoria do PGT	Resultado do PGT	Q.M.E após 24 horas do descongelamento
E-1	4BB	PGT-A	(-10)	4CC
E-2	3BB	PGT-A	(+17+12-16+17)	N.S.
E-3	2BC	PGT-A	não informativo	2CC
E-4	3BB	PGT-A	(+16+22)	3CC
E-5	3BB	PGT-A	-5,-11,-13, XX	N.S.
E-6	4CC	PGT-A	(caótico)	4CC
E-7	3BC	PGT-A	(-1+22)	3BC
E-8	B1	PGT-A	(-5p,+7,+22)	B1
E-9	5BC	PGT-A	(-19)	5BB
E-10	5CC	PGT-A	(+11+16)	5BC
E-11	6BB	PGT-A	(caótico)	6CC

E-12	3CC	PGT-A	(+22, XX)	4BC
E-13	3BC	PGT-A	(-5p,-11p)	3CC
E-14	4CB	PGT-M	haplótipo de alto risco (em <i>COL1A2</i>)	4CB
E-15	4BC	PGT-M	haplótipo de alto risco (em <i>COL1A2</i>)	N.S.
E-16	4CC	PGT-M	haplótipo de alto risco (em <i>COL1A2</i>)	N.S.
E-17	4CC	PGT-M	haplótipo de alto risco (em <i>COL1A2</i>)	4CC
E-18	4CC	PGT-M	haplótipo de alto risco (em <i>COL1A2</i>)	4CC
E-19	3BC	PGT-A	(-4)	3BC
E-20	4CC	PGT-A	(-4,-X0)	N.S.
E-21	3BB	PGT-A	(+1,+15,-21)	N.V.
E-22	4CC	PGT-A	(+3,-15,+16,-17,+22)	N.S.
E-23	4AA	Não	Sem análise genética	4AA

Em relação ao parâmetro de qualidade morfológico desses blastocistos, levando-se em consideração o trofotoderma, após 24 horas do descongelamento, 75% (12/16) apresentaram baixa qualidade (BC e

CC), três embriões apresentaram qualidade intermediária (B1, CB e BB) e um embrião apresentou ótima qualidade (AA).

FASE II: Resultado da manipulação embrionária com isolamento da massa celular interna ou remoção da zona pelúcida

Dos 23 embriões avaliados, seis deles não sobreviveram ao procedimento de descongelamento, um embrião sobreviveu ao descongelamento, mas não apresentou viabilidade, e 16 embriões foram considerados viáveis e os avaliados quanto ao aspecto morfológico, tendo sido considerados adequados para manipulação. Nove desses 16 embriões viáveis foram submetidos à dissecação de MCI e depositados em placa pré-tratada. Para os sete embriões viáveis restantes, as ZP foram removidas e os embriões inteiros foram depositados na placa pré-tratada.

FASE III: Resultado da expansão das células-tronco embrionárias

Observou-se baixa taxa de adesão de células embrionárias na placa de cultura. Apenas quatro dos 16 embriões depositados (25%) foram capazes de adesão inicial nas primeiras 48 horas. Notavelmente, esses quatro embriões que apresentaram adesão inicial (identificação do embrião: E-6; E-13; E-19; E-23) foram submetidos à dissecação de MCI. No entanto, em 96 horas de cultivo, em apenas um deles manteve células com capacidade de adesão e expansão. Essas células foram cultivadas, derivando uma linhagem de hESC estável, a qual foi nomeada, Si-10. Essa linhagem celular derivou-se do único embrião que apresentou ótima morfologia e que não havia sido submetido à manipulação prévia, com a biopsia de trofotoderma, para realização de teste genético. O resumo desses resultados é apresentado na Figura 1, esquematicamente.

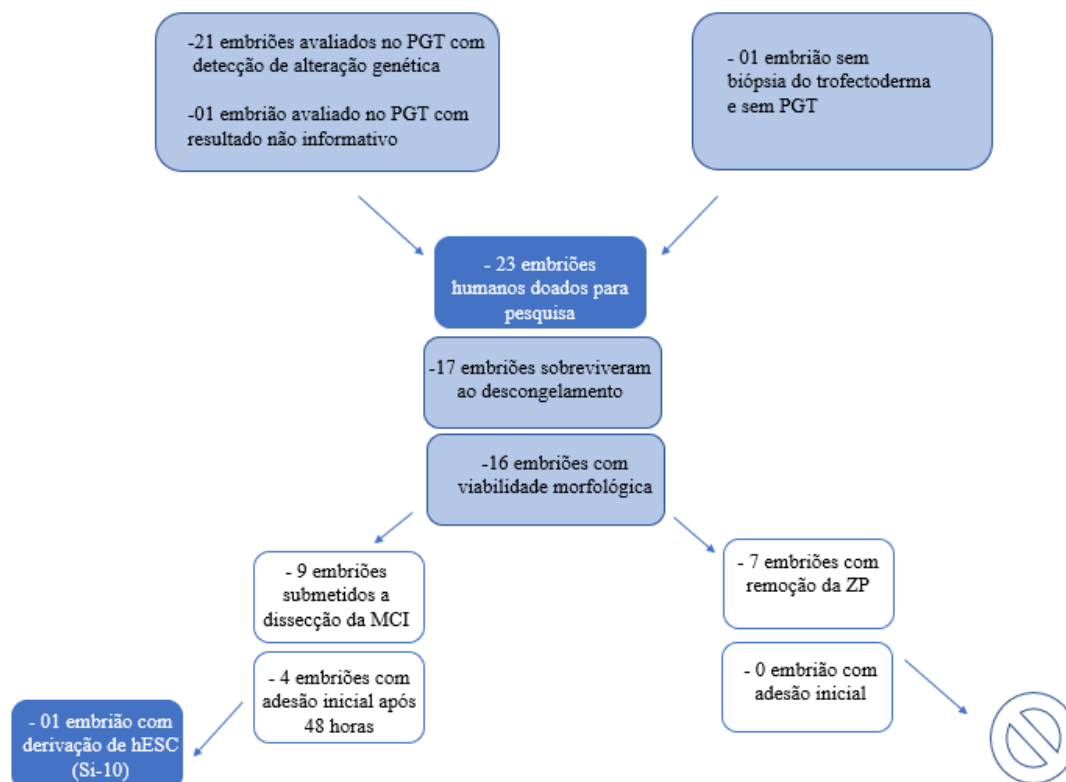


Figura 1. Esquema de manipulação embrionária pós-descongelamento, viabilidade celular embrionária e capacidade de expansão *in vitro*. PGT- teste genético pré-implantacional; MCI – massa celular interna; ZP- zona pelúcida.

As células pluripotentes, Si-10, apresentaram morfologia condizente com hESC (KIM, OH, *et al.*, 2005). As células Si-10 apresentaram morfologia compatível com pequenas células indiferenciadas e foram capazes de se expandir *in vitro*, gerando colônias celulares com morfologia típica de colônias de hESC (Figura 2).

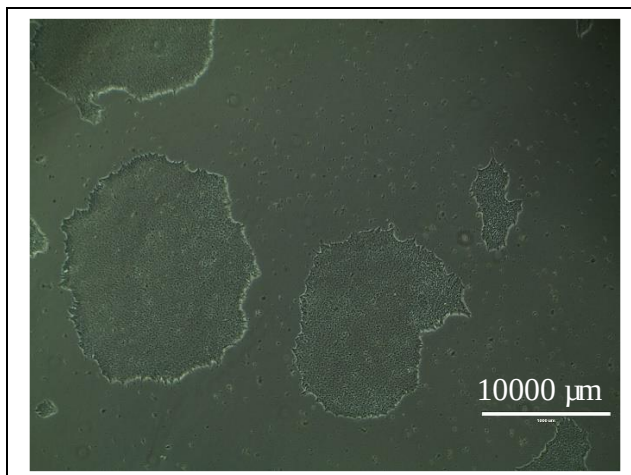


Figura 2. Colônias de células Si-10 expandidas *in vitro*, exibindo morfologia típica de colônias de hESC (Imagens de células Si-10 capturadas pelo Sistema de Imagem Celular EVOS FL).

FASE IV: Resultado quanto a caracterização das células-tronco embrionárias

As células foram avaliadas quanto a expressão de fatores de pluripotência por imunofluorescência (Figura 3 A, B, C e D) e citometria de fluxo (Figura 3 E). Esse último método revelou que 99,8%, 99,8%, 99,8% e 92,1% das células Si-10 foram positivas para OCT4A, NANOG, SOX2 e SSEA4, respectivamente.

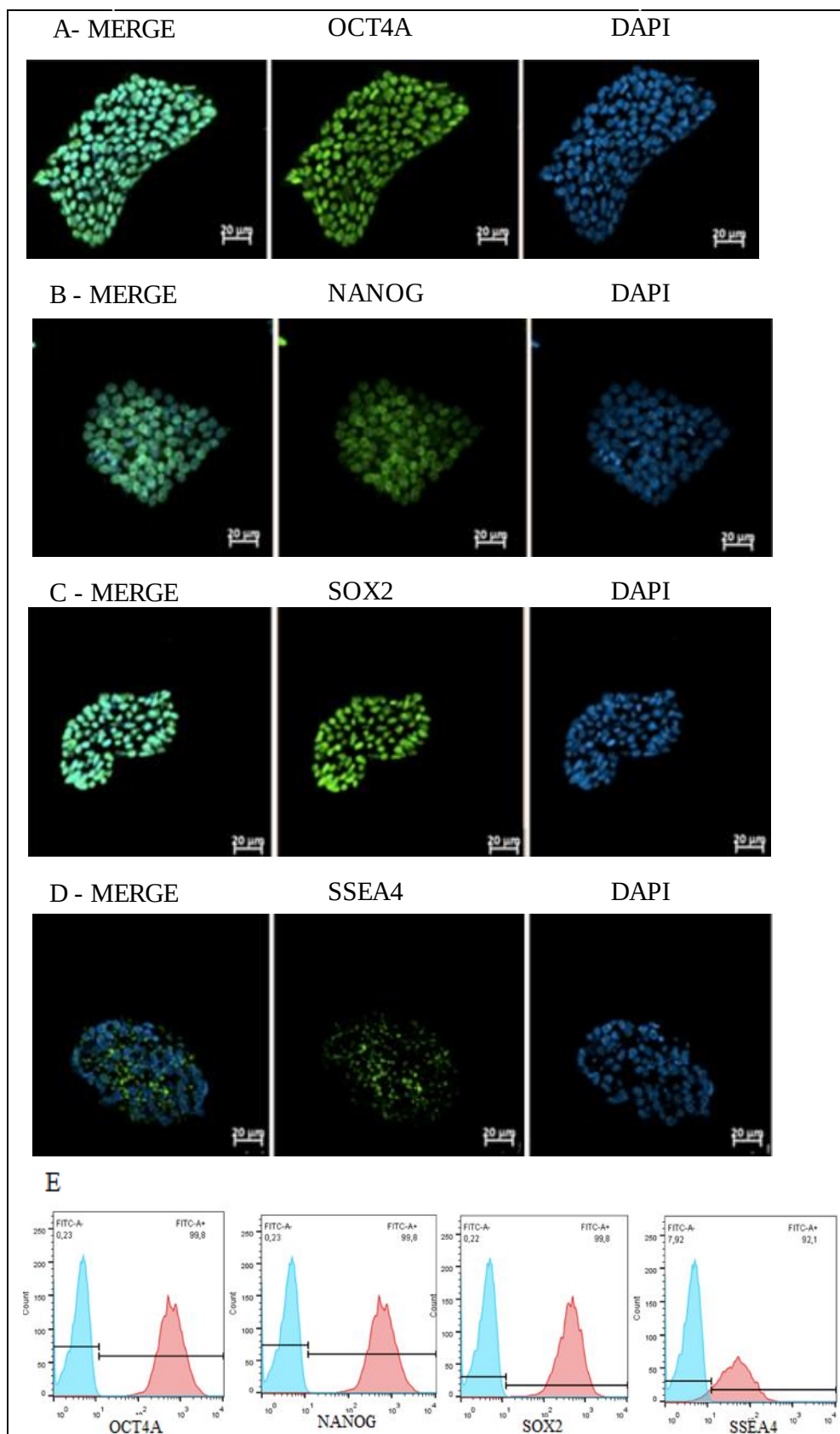


Figura 3. Expressão de marcadores de pluripotência em células Si-10. A expressão OCT4A (A), NANOG (B), SOX2 (C) e SSEA4 (D) foi detectada por imunofluorescência e citometria de fluxo (E).

A linhagem estabelecida foi avaliada quanto ao potencial de diferenciação *in vitro* com a formação de corpos embrióides. Por análise de imunofluorescência, foi detectada a expressão de proteínas que são tipicamente expressas em células de cada uma das três camadas germinativas, endoderma (FOXA2), mesoderma (Brachyury) e ectoderma (PAX6). A Figura 4 mostra o aspecto morfológico dos CE formados após 48 e 96 horas (Figura 4 A e B), e a expressão dos marcadores FOXA2, Brachyury e PAX6 em CE visualizados por microscopia de imunofluorescência (Figura 4 C e D).

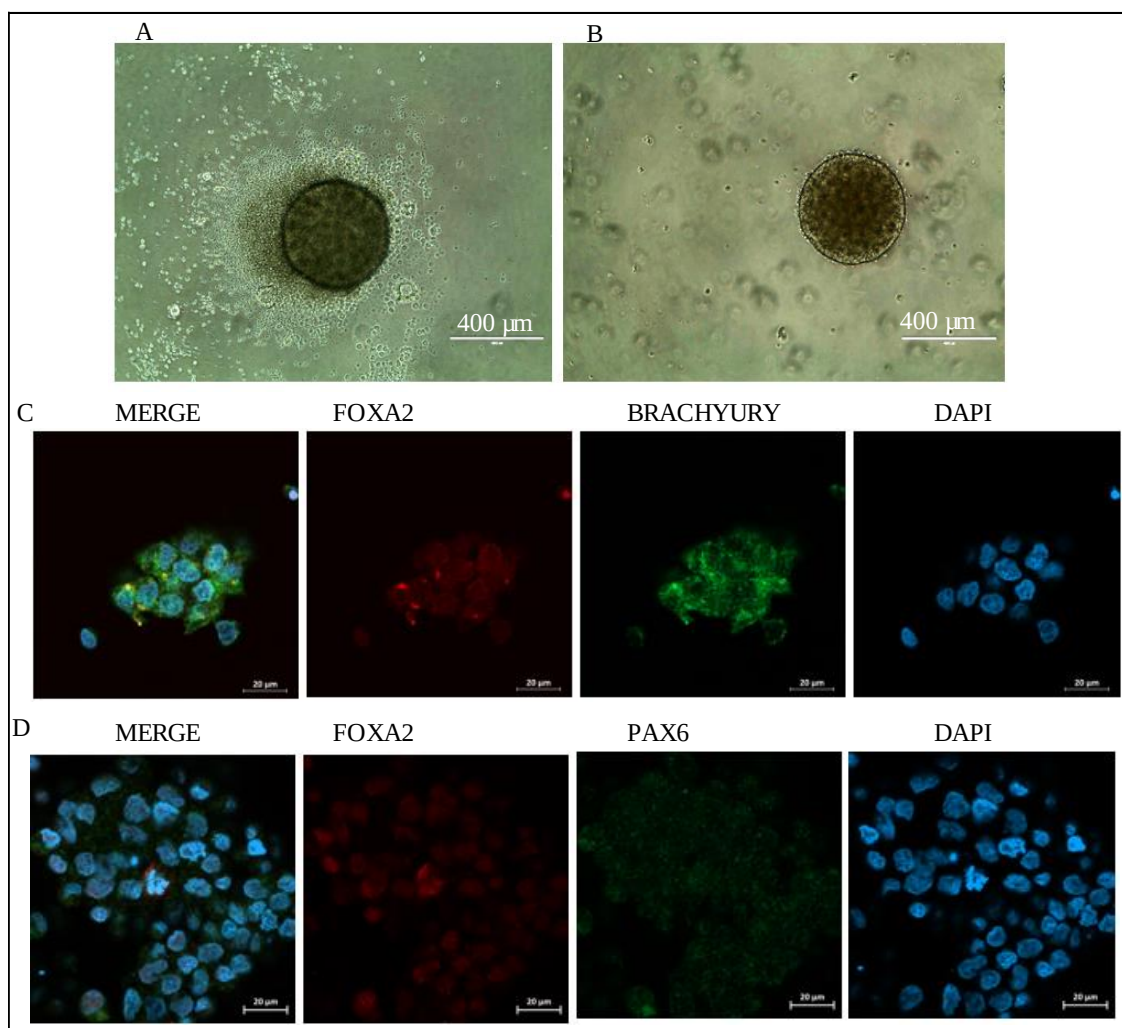


Figura 4. Corpos embrioides gerados por células Si-10 *in vitro*. Morfologia dos corpos embrioides (CE) após (A) 48 horas e (B) 96 horas. (C) Ensaio de imunofluorescência

para detecção da expressão de FOXA2 e PAX6 em corpos embrióides (marcadores de endoderme e ectoderme, respectivamente); D: Ensaio de imunofluorescência para detecção de FOXA2 e Brachyury em corpos embrióides (marcadores de endoderme e mesoderme, respectivamente).

A análise do MLPA não detectou a presença de ganho ou perda de regiões cromossômicas subteloméricas na linhagem Si-10 (Figura 5A). Para interpretação da figura 5A, no intervalo entre as linhas azul e vermelha representou o conteúdo normal - 02 alelos de cada gene; no eixo X representado a localização da sonda utilizada e no eixo Y o número de cópias ou alelos de cada gene avaliados. A avaliação genômica de CNV foi realizada por array-CGH, também não detectou alterações (Figura 5B). Para interpretação da figura 5B, o log2 com linhagem Si-10/controle normal com relação as sondas de microarray plotadas de acordo com suas coordenadas genômicas ao longo dos cromossomos - do braço curto ao braço longo (cada cor representou um cromossomo). O eixo Y representou a escala log2 do número de cópia (0 indicou regiões com número de cópia semelhante entre a linhagem celular e a amostra de controle; os valores positivos representaram ganhos; valores negativos representam perdas). Ambos os métodos indicam que células da linhagem Si-10 possui conteúdo cromossômico euploide 46,XY.

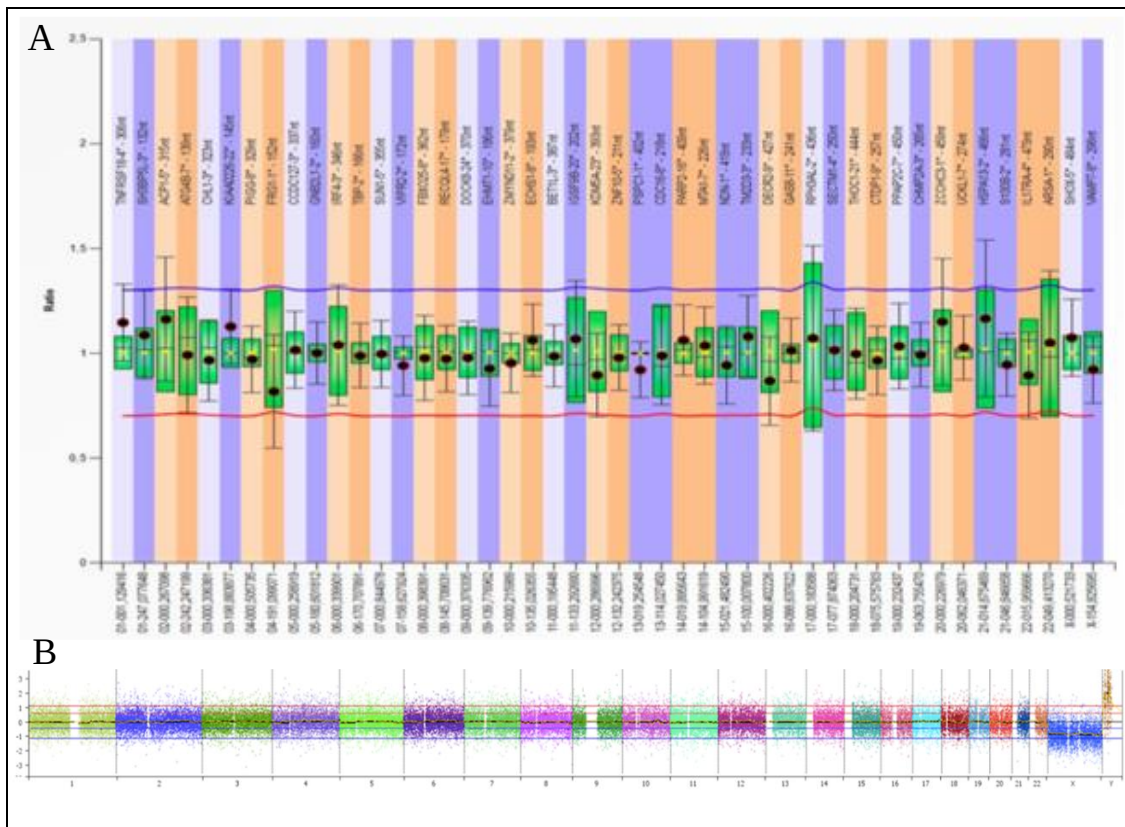


Figura 5. Análise citogenética molecular de células-tronco embrionárias da linhagem Si-10, conforme avaliação por (A) MLPA. (B) Array-CGH - Perfil CNA da linhagem de células Si-10.

V. Discussão

Embriões humanos em estágio de blastocisto que são descartados ou doados para pesquisa, na área de reprodução humana assistida, dado à detecção de alteração genética prevista em teste pré-implantacional podem ser preciosas fontes de células-tronco embrionárias. O uso de células pluripotentes na pesquisa básica pode prover conhecimento no campo de desenvolvimento embrionário, no período pré-implantacional (BEN-YOSEF, MALCOV, *et al.*, 2008). Além de ser de grande valia para impacto prático, na área do aconselhamento genético reprodutivo. Para tanto, é fundamental avaliar o impacto das alterações genéticas sobre a viabilidade e funcionalidade de embriões, sendo a derivação de linhagem de células-tronco embrionárias um importante indicador funcional. Atualmente existem poucos estudos que tentaram derivar linhagens de células-tronco embrionárias, a partir de blastocistos, com aneuploidia detectada no PGT por NGS (ZHOU, CHENG, *et al.*, 2018).

O NGS é uma metodologia altamente precisa e sensível com baixas taxas de erro diagnóstico, apresentando resultados mais expressivos que outras técnicas utilizadas no PGT, como o FISH, por exemplo. O mosaicismismo embrionário, o qual pode ser originado a partir de um erro na divisão celular mitótica, durante o desenvolvimento embrionário, pode resultar na formação de células com conteúdo cromossomicamente distinto (VERA-RODRIGUEZ, RUBIO, 2017). Embriões mosaicos podem levar a erros diagnósticos no PGT-A. A detecção do mosaicismismo depende da acurácia do teste genético realizado, tipo e quantidade de amostra biopsiada (blastômero ou trofotoderma) e artefatos de técnica (TAKEUCHI, 2021). A metodologia por FISH, normalmente, utiliza amostra obtida no dia três de desenvolvimento com a análise de um único blastômero. Essa metodologia apresenta limitações quanto à quantidade de

cromossomos estudados por vez. Habitualmente, realiza-se o estudo com apenas oito cromossomos por vez, aumentando o tempo de elaboração e análise (TAKEUCHI, 2021). Essas limitações levam a uma maior taxa de erro diagnóstico, que pode explicar alguns relatos de obtenção de linhagens de células-tronco embrionárias euploides a partir de embriões aneuploides no PGT, analisado por FISH (LAVON, NARWANI, *et al.*, 2008).

Metodologias alternativas oferecem uma análise simultânea mais ampla com os 23 pares de cromossomos, como é o caso da técnica array-CGH e o NGS. Em relação a essas metodologias, ambas permitem a detecção de mosaicismos e alterações segmentares com maior precisão. A acurácia de detecção para o mosaicismo para ambas as metodologias é similar, a depender do limite de detecção estabelecido em cada plataforma. No campo das hESC, alguns grupos conseguiram estabelecer linhagem de células euploides a partir de embriões aneuploides, detectados por array-CGH (FONSECA, COSTAS, *et al.*, 2015).

A derivação de uma linhagem pluripotente, a partir de embriões testados por NGS, foi realizada por poucos grupos (ZHOU, CHENG, *et al.*, 2018). Nesse estudo, os autores que derivaram linhagem de hESC euploides partiram de embriões que possuíam aneuploidia segmentar, ou seja, duplicação ou deleção de segmentos cromossômicos (p ou q) e ditas como *de novo*. Esse fato nos leva à hipótese de que a pressão seletiva age em favor das células euploides viáveis, durante a expansão *in vitro* dos embriões mosaicos. Nesses casos, o mosaicismo poderia estar presente na massa celular interna e no trofotoderma ou apenas no trofotoderma. A pressão seletiva é conhecida na literatura, uma vez que células euploides normalmente possuem vantagem para expansão *in vitro*, em relação às células aneuploides, as quais expandem em uma velocidade menor, a depender da aneuploidia envolvida (LAVON, NARWANI, *et al.*, 2008, SINGLA, IWAMOTO-STOHL, *et al.*, 2020).

A probabilidade de obtenção de linhagem de hESC a partir de embriões mosaicos, é maior se comparada com embriões que tiveram detecção de aneuploidia completa, envolvendo cromossomo inteiro. Zhou *et al.*, 2018, derivaram duas linhagens de hESC a partir de embriões com aneuploidia segmentar, detectados por NGS (ZHOU, CHENG, *et al.*, 2018). Entretanto, o estudo mostrou que os embriões possuíam alteração *de novo*, a qual está relacionada a erros mitóticos portanto com maior probabilidade de serem de embriões mosaicos (GIRARDI, SERDAROGULLARI, *et al.*, 2020). A probabilidade de obtenção de linhagem de hESC euploide de embrião com aneuploidia completa, envolvendo cromossomo inteiro detectada por NGS, é significativamente menor. É oportuno salientar que ainda não se conhecem estudos que relatem derivação de linhagens de hESC de embriões com aneuploidia completa, detectados por NGS.

Este projeto visou à possível contribuição para essa lacuna de conhecimento. Esta pesquisa buscou derivar linhagens de hESC de 21 embriões aneuploides conforme PGT, pela metodologia NGS. Não foi possível a derivação de hESC desses embriões e duas hipóteses podem explicar esse resultado: (i) impacto negativo da alteração genética patogênica no desenvolvimento das células *in vitro*; (ii) qualidade morfológica do embrião.

A respeito do impacto da alteração genética patogênica detectada no PGT, 69% (16/23) de nossa coorte era composta por embriões aneuploides. Na literatura, alterações de aneuploidia como trissomia e monossomia, que são o tipo mais comum de aneuploidia, ocorrem em frequência relativamente semelhante em embriões no período de pré-implantação (FRAGOULI, ALFARAWATI, *et al.*, 2013). Os cromossomos 15, 16, 18, 21 e 22 são os mais frequentemente afetados. As monossomias estão relacionadas à não implantação embrionária e perda gestacional precoce.

Estudos mostram que embriões com monossomias de cromossomos autossômicos tendem a apresentar desvantagem de expansão *in vitro* (BIANCOTTI, NARWANI, *et al.*, 2012).

As trissomias de autossomos também estão relacionadas à perda gestacional precoce. No entanto, diferentemente das monossomias de cromossomo autossomo, algumas delas podem originar nascido vivo (RODRIGUEZ-PURATA, LEE, *et al.*, 2015). A derivação de linhagem hESC de embriões com trissomias é possível a depender do cromossomo extra envolvido, desde que o mesmo ofereça vantagem ao crescimento celular (LAVON, NARWANI, *et al.*, 2008). Linhagens de hESC já foram geradas, a partir de embriões com trissomia do cromossomo 12, 20 e 21, diagnosticadas por análise de blastômero (BIANCOTTI, NARWANI, *et al.*, 2012). No entanto, alguns estudos mostram que células aneuploides em embriões humanos tendem a apresentar desvantagens, em relação às células euploides, em termos de eficiência de expansão em cultura. Isso é particularmente observado para anormalidades cromossômicas de origem meiótica (VERLINSKY, ZECH, *et al.*, 2009).

Em nosso trabalho, embriões com aneuploidia caótica, monossomia de 4 e perda parcial de 5p e 11p detectados por NGS, demonstraram uma adesão inicial, por 48 horas, *in vitro*. Porém, não foi possível estabelecer linhagem hESC desses embriões. Em pesquisa de Popovic e colaboradores, o grupo utilizou crescimento estendido em cultura de embriões *in vitro* e correlacionaram o diagnóstico de PGT anterior. Embriões euploides, com trissomia e duplicação segmentar, foram mais propensos a permanecerem viáveis, quando aderidos até 12 dias após a fertilização. Em contraste, embriões com monossomias e múltiplas aberrações permaneceram aderidos na placa apenas até o dia 8 ou menos (POPOVIC, DHAENENS, *et al.*, 2019). O estudo sugere letalidade de

monossomias autossômicas e múltiplas aberrações cromossômicas em embriões humanos pré-implantação, corroborando nossos dados.

Em relação à qualidade morfológica embrionária, em nosso estudo, 75% (12/16) dos embriões em nossa coorte apresentaram baixa qualidade morfológica em período de 24 horas após o procedimento de descongelamento. A taxa de sobrevivência dos embriões obtida em nosso trabalho -73% (17/23), foi ligeiramente inferior às relatadas em outros estudos que também utilizaram a técnica de vitrificação (taxa de sobrevivência em torno de 95%) (COBO, DE LOS SANTOS, *et al.*, 2012). A diferença na taxa de sobrevivência pode ser parcialmente explicada pela qualidade morfológica dos embriões. Em Cobo *et al.*, 2012, a coorte do estudo foi composta principalmente por embriões com qualidade morfológica ótima ou satisfatória. Outro estudo usando embriões com baixa qualidade morfológica mostrou taxa de sobrevivência, em torno de 70,6% (ARAN, SOLE, *et al.*, 2012). Aparentemente, embriões de baixa qualidade podem ser mais sensíveis ao procedimento de vitrificação (REN, LIU, *et al.*, 2012).

A qualidade morfológica do embrião também é um fator importante para a derivação da linhagem de células-tronco. Lerou *et al* relataram que a derivação de hESC é possível em embriões de baixa qualidade, porém com menor eficácia (LEROU, YABUUCHI, *et al.*, 2008). A eficácia relatada da derivação de hESC desses embriões varia de 4,1 a 25% (LIU, YIN, *et al.*, 2009, MATEIZEL, DE TEMMERMAN, *et al.*, 2006, OLEARY, DUGGAL, *et al.*, 2012). No entanto, a comparação eficaz entre laboratórios é difícil dada a variação na metodologia de derivação e tipo de amostra obtida (CORTES, SANCHEZ, *et al.*, 2009). O tipo de amostra embrionária utilizada na pesquisa é crucial para o sucesso da geração de linhagens celulares. Alguns estudos utilizaram embriões de FIV doados para pesquisa por causa de sua baixa qualidade morfológica. Outros

utilizam embriões com alteração PGT doados por causa de suas anormalidades genéticas. Essa diferença quanto à fonte embrionária utilizada na pesquisa pode refletir na taxa de sucesso da derivação. Sendo assim, pesquisas que utilizam embriões com baixa qualidade morfológica e alterações genéticas identificadas no PGT precisam ser exploradas, como se fez neste trabalho.

A associação entre aneuploidia e qualidade morfológica embrionária foi alvo de interesse em alguns grupos, considerando embrião desde a fase inicial de desenvolvimento ao blastocisto (CAPALBO, RIENZI, *et al.*, 2014, MUNNÉ, VELILLA, *et al.*, 2005). Estudos relataram uma relação com melhor qualidade morfológica e a taxa de euploidia. Alfarawati e pesquisadores, relataram maior proporção de blastocisto euploide com qualidade A na massa celular interna e análise do trofotoderma. O grupo também observou maior taxa de expansão de blastocle com ampla expansão (com grau de expansão 5 e 6) nesses embriões (ALFARAWATI, FRAGOULI, *et al.*, 2011). Wang e colaboradores também relataram relação para qualidade de grau C no trofotoderma associado à diminuição da taxa de euploidia (WANG, KORT, *et al.*, 2018). Capalbo e colaboradores observaram que parâmetros morfológicos foram associados à euploidia em uma análise de regressão logística controlada. No entanto, nesse estudo não encontraram efeito na qualidade da massa celular interna (CAPALBO, RIENZI, *et al.*, 2014).

Essas observações devem ser interpretadas com cautela, uma vez que uma proporção significativa de embriões aneuploides pode atingir ótima qualidade morfológica, e alguns embriões euploides podem apresentar baixa qualidade. Em relação ao tipo de aneuploidia, Alfarawati *et al.*, constatou que as trissomias eram comuns em embriões com alta qualidade morfológica, enquanto as monossomias eram mais comuns em padrão de baixa qualidade (ALFARAWATI, FRAGOULI, *et al.*, 2011).

Para as aneuploidias complexas, Capalbo observou maior proporção de embriões com baixa qualidade morfológica (CAPALBO, RIENZI, *et al.*, 2014). Esses achados podem ser úteis na área de aconselhamento genético a pacientes de fertilização *in vitro* que devem receber embriões na transferência para cavidade intrauterina, com base no resultado da análise genética no PGT e qualidade morfológica.

Em relação ao aconselhamento genético na área de reprodução assistida, para pacientes que obtiveram apenas embriões anormais no PGT-A é importante que elas recebam uma orientação adequada. O aconselhamento genético deve abordar os benefícios e riscos envolvendo embriões anormais, bem como a limitação dos testes genéticos de pré-implantação (BESSER, MOUNTS, 2017). Os dados sobre resultado clínico após a transferência de embriões aneuploides e mosaicos estão sendo explorados com mais atenção na última década. Em relação à transferência de embrião mosaico, há pontos cruciais a serem considerados, como o tipo de alteração envolvida, grau de mosaicismo e cromossomo afetado e o risco de efeito adverso envolvido (CRAM, LEIGH, *et al.*, 2019, GRATI, GALLAZZI, *et al.*, 2018). Estudos mostram diferentes prognósticos de gravidez viável, dependendo do conteúdo genético do embrião: embrião normal/euploide (65%), embrião mosaico (35%) e embrião anormal (<4%) (MUNNÉ, VELILLA, *et al.*, 2005). Em relação à transferência de embrião aneuploide, estudos mostram impacto clínico negativo para esses embriões (TIEGS, TAO, *et al.*, 2021). O prognóstico de gestação para embriões mosaicos e euploides devem ser considerados com cautela, uma vez que outros autores discordam do baixo prognóstico para os embriões com mosaicismo <50%. Capalbo e pesquisadores não observaram diferença estatística na taxa de nascidos vivos e na taxa de perda gestacional entre embriões euploides e embriões

com mosaicismos de baixo (20-30%) e médio grau (30-50%) (CAPALBO, POLI, *et al.*, 2021).

Nossos achados indicam que embriões com baixa qualidade morfológica e com anormalidades genéticas no PGT por NGS geralmente apresentam potencial de expansão *in vitro* limitado. Esse dado pode contribuir indiretamente na área de aconselhamento genético, uma vez que o prognóstico para uma gravidez apresenta indicadores baixos. Baixa eficiência para expansão *in vitro* também foi observada para embriões com variante patogênica em gene específico. Em nossa coorte, haviam cinco embriões que apresentavam haplótipo de “alto risco”, com variante patogênica em *COL1A2*. A variante analisada nesse gene está associada à osteogênese imperfeita, uma rara doença autossômica dominante. De acordo com a literatura, não há linhagem de hESC disponível com mutação *COL1A2*, embora a capacidade de estabelecer uma linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) com variante em *COL1A2* tenha sido demonstrada (ZHENG, LU, *et al.*, 2020). Considerando a baixa qualidade morfológica nesses embriões, supõe-se que a qualidade morfológica pode ter sido o principal fator limitante para a derivação da linhagem hESC.

De acordo com esse dado, a única linhagem de hESC foi derivada de um embrião com ótima qualidade morfológica, sem informação prévia quanto ao PGT-A. Vale ressaltar que as condições de cultivo utilizadas para esse embrião foram as mesmas utilizadas para todos os outros embriões com anomalia genética e cromossômica detectadas no PGT, sugerindo a adequação das condições de expansão *in vitro* utilizadas. Essa nova linhagem de hESC, denominada Si-10, foi composta por células euplóides 46,XY. Este dado sugere que o embrião original era provavelmente euploide, embora a presença de mosaicismos não possa ser descartada, uma vez que para este embrião não foi realizado o PGT.

A pluripotência das células Si-10 foi evidenciada pela capacidade de autorrenovação *in vitro*, expressão de marcadores de pluripotência, capacidade de gerar corpos embrioides e de se diferenciar em células de origem endodérmica, mesodérmica e ectodérmica. Esses resultados indicam que a linhagem de hESC Si-10, é adequada para uso em pesquisas nas áreas de desenvolvimento humano, genética e terapia celular. Ao todo, nosso trabalho sugere que embriões com baixa qualidade morfológica e anormalidades genéticas apresentam capacidade limitada de expansão *in vitro* e derivação de linhagens de hESC para fins de pesquisa.

VI. Conclusões

- Embriões com baixa qualidade morfológica e com anormalidades genéticas no PGT por NGS, doados para pesquisa, apresentam potencial limitado de expansão *in vitro* e de geração de linhagem de células-tronco embrionárias;
- Embrião com ótima qualidade morfológica, doado para pesquisa, demonstrou capacidade de expansão *in vitro* e potencial de geração de linhagem de células-tronco embrionárias;
- A linhagem celular derivada de embrião com ótima qualidade morfológica é composta por células que pluripotência demonstrada *in vitro*, construindo fonte importante de células-tronco embrionárias para o campo da pesquisa básica.

VII. Resumo

As células-tronco embrionárias humanas (hESC) são um recurso precioso para pesquisadores que estudam biologia celular do desenvolvimento e terapia celular. Eles podem ser obtidos de embriões doados por tempo excedido de armazenamento congelado estipulado pela legislação ou por possuir anormalidades genéticas detectadas em teste genético pré-implantacional (PGT). No entanto, existem poucos estudos relatando a viabilidade de derivar linhagens de hESC de embriões com baixa qualidade morfológica e com anormalidades genéticas detectadas no PGT.

Este estudo foi prospectivo e realizado de fevereiro de 2020 a abril de 2021 com 23 blastocistos humanos doados para pesquisa. Os embriões foram avaliados morfolologicamente antes do procedimento de biópsia do trofotoderma ou congelamento e 24 horas após o descongelamento. Os embriões foram descongelados e colocados em condições de cultura apropriadas para a geração de hESC. A linhagem hESC foi avaliada com potencial de pluripotência por imunofluorescência, citometria de fluxo e diferenciação espontânea *in vitro*. A presença de aneuploidia foi avaliada por *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) e *microarray comparative genomic hybridization* (array-CGH).

Dezessete blastocistos sobreviveram ao procedimento de descongelamento, dezesseis deles apresentaram viabilidade. Em relação a qualidade morfológica embrionária, com 24 horas após o descongelamento, 75% deles apresentaram baixa qualidade. Apenas um embrião, com ótima qualidade morfológica, que não foi realizado o PGT, foi capaz de gerar uma nova linhagem de hESC. A caracterização adicional da linha hESC revelou células-tronco euploides totalmente funcionais com pluripotência preservada. Esta linhagem de células euploides pode ser um

recurso útil para o desenvolvimento humano e pesquisa básica. Embriões com baixa qualidade morfológica e com anormalidades genéticas no PGT, apresentam potencial limitado de expansão *in vitro* e de geração de linhagem de células-tronco embrionárias.

VIII. Abstract

Human embryonic stem cells (hESC) are a precious resource for researchers studying developmental cell biology and cell therapy. They can be obtained from donated embryos with exceeding frozen storage time stipulated by legislation or the ones with genetic abnormalities detected in preimplantation genetic testing (PGT). However, there are few studies reporting the feasibility of deriving hESC lines from embryos with low morphological quality with genetic abnormalities in the PGT.

This study was prospective and conducted from February 2020 to April 2021 with 23 human blastocysts donated for research. Embryos were morphologically evaluated before the trophectoderm biopsy or freezing procedure and 24 hours after thawing procedure. Embryos were thawed and placed in appropriate culture conditions for the generation of hESC. The hESC line was evaluated for pluripotency potential by immunofluorescence, flow cytometry, spontaneous differentiation *in vitro*. Presence of aneuploidy was evaluated by *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) and *microarray comparative genomic hybridization* (array-CGH).

Seventeen blastocysts survived the thawing procedure, sixteen of them showed viability. Regarding the embryonic morphological quality, 24 hours after thawing, 75% of them presented low quality. Only one embryo, with excellent morphological quality, which was not submitted to PGT, was able to generate a new hESC lineage. Further characterization of the hESC line revealed fully functional euploid stem cells with preserved pluripotency. This euploid cell line could be a useful resource for human development and basic research. Embryos with low morphological quality and with genetic abnormalities in PGT,

have limited potential for *in vitro* expansion and generation of embryonic stem cell line.

IX. Referências bibliográficas

Ahn JW, Ogilvie CM, Welch A, Thomas H, Madula R, Hills A, Donaghue C, Mann K. Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. **BMC Med Genet.** 2007 Mar 5;8:9. doi: 10.1186/1471-2350-8-9. PMID: 17338807; PMCID: PMC1831468.

Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. **Fertil Steril.** 2011 Feb;95(2):520-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.04.003. Epub 2010 May 26. PMID: 20537630.

Almodin CG, Minguetti-Camara VC, Paixao CL, Pereira PC. Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. **Hum Reprod.** 2010 May;25(5):1192-8. doi: 10.1093/humrep/deq042. Epub 2010 Feb 25. PMID: 20185514.

Aran B, Sole M, Rodriguez-Pizà I, Parriego M, Muñoz Y, Boada M, Barri PN, Izpisúa JC, Veiga A. Vitrified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation. **J Assist Reprod Genet.** 2012 Oct;29(10):1013-20. doi: 10.1007/s10815-012-9820-0. Epub 2012 Jun 27. PMID: 22735930; PMCID: PMC3492575.

Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. **Mol Reprod Dev.** 2008 May;75(5):818-27. doi: 10.1002/mrd.20809. PMID: 18157870.

Banda E, Grabel L. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Neural Progenitors. **Methods Mol Biol.** 2016;1307:289-98. doi: 10.1007/7651_2014_67. PMID: 24500897.

Ben-Yosef D, Malcov M, Eiges R. PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders. **Mol Cell Endocrinol.** 2008 Jan 30;282(1-2):153-8. doi: 10.1016/j.mce.2007.11.010. Epub 2007 Nov 22. PMID: 18180094.

Besser AG, Mounts EL. Counselling considerations for chromosomal mosaicism detected by preimplantation genetic screening. **Reprod Biomed Online.** 2017 Apr;34(4):369-374. doi: 10.1016/j.rbmo.2017.01.003. Epub 2017 Jan 16. PMID: 28129970.

Biancotti JC, Narwani K, Buehler N, Mandefro B, Golan-Lev T, Yanuka O, Clark A, Hill D, Benvenisty N, Lavon N. Human embryonic stem cells as models for aneuploid chromosomal syndromes. **Stem Cells.** 2010 Sep;28(9):1530-40. doi: 10.1002/stem.483. PMID: 20641042.

Biancotti JC, Narwani K, Mandefro B, Golan-Lev T, Buehler N, Hill D, Svendsen CN, Benvenisty N. The in vitro survival of human monosomies and trisomies as embryonic stem cells. **Stem Cell Res.** 2012 Nov;9(3):218-24. doi: 10.1016/j.scr.2012.07.002. Epub 2012 Jul 22. PMID: 22892439.

Bilic J, Izpisua Belmonte JC. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart? **Stem Cells.** 2012 Jan;30(1):33-41. doi: 10.1002/stem.700. PMID: 22213481.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature.** 1984 May 17-23;309(5965):255-6. doi: 10.1038/309255a0. PMID: 6717601.

Capalbo A, Poli M, Rienzi L, Girardi L, Patassini C, Fabiani M, Cimadomo D, Benini F, Farcomeni A, Cuzzi J, Rubio C, Albani E, Sacchi L, Vaiarelli A, Figliuzzi M, Findikli N, Coban O, Boynukalin FK, Vogel I, Hoffmann E, Livi C, Levi-Setti PE, Ubaldi FM, Simón C. Mosaic human preimplantation embryos and their developmental potential in a prospective, non-selection clinical trial. *Am J Hum Genet.* 2021 Dec 2;108(12):2238-2247. doi: 10.1016/j.ajhg.2021.11.002. Epub 2021 Nov 18. PMID: 34798051; PMCID: PMC8715143.

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod.* 2014 Jun;29(6):1173-81. doi: 10.1093/humrep/deu033. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24578475.

ESHRE PGT-M Working Group, Carvalho F, Moutou C, Dimitriadou E, Dreesen J, Giménez C, Goossens V, Kakourou G, Vermeulen N, Zuccarello D, De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. *Hum Reprod Open.* 2020 May 29;2020(3):hoaa018. doi: 10.1093/hropen/hoaa018. PMID: 32500103; PMCID: PMC7257022.

Cobo A, de los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P, Remohí J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril.* 2012 Nov;98(5):1138-46.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1107. Epub 2012 Aug 3. PMID: 22862909.

ESHRE PGT-SR/PGT-A Working Group, Coonen E, Rubio C, Christopikou D, Dimitriadou E, Gontar J, Goossens V, Maurer M,

Spinella F, Vermeulen N, De Rycke M. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. **Hum Reprod Open**. 2020 May 29;2020(3):hoaa017. doi: 10.1093/hropen/hoaa017. PMID: 32500102; PMCID: PMC7257111.

Cortes JL, Sanchez L, Ligerio G, Gutierrez-Aranda I, Catalina P, Elosua C, Leone PE, Montes R, Bueno C, Ramos-Mejía V, Maleno I, García-Pérez JL, Menendez P. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. **Hum Reprod**. 2009 Aug;24(8):1844-51. doi: 10.1093/humrep/dep107. Epub 2009 Apr 28. PMID: 19401322.

Cram DS, Leigh D, Handyside A, Rechitsky L, Xu K, Harton G, Grifo J, Rubio C, Fragouli E, Kahraman S, Forman E, Katz-Jaffe M, Tempest H, Thornhill A, Strom C, Escudero T, Qiao J, Munne S, Simpson JL, Kuliev A. PGDIS Position Statement on the Transfer of Mosaic Embryos 2019. **Reprod Biomed Online**. 2019 Aug;39 Suppl 1:e1-e4. doi: 10.1016/j.rbmo.2019.06.012. PMID: 31421710.

de Oliveira Georges JA, Vergani N, Fonseca SA, Fraga AM, de Mello JC, Albuquerque MC, Fujihara LS, Pereira LV. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in a new line of human embryonic stem cells established in physiological oxygen concentrations. **Stem Cell Rev Rep**. 2014 Aug;10(4):472-9. doi: 10.1007/s12015-014-9505-4. PMID: 24633531.

Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. **Annu Rev Cell Dev Biol**. 2012;28:523-53. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155750. PMID: 23057746.

Eguizabal C, Aran B, Chuva de Sousa Lopes SM, Geens M, Heindryckx B, Panula S, Popovic M, Vassena R, Veiga A. Two decades of embryonic stem cells: a historical overview. **Hum Reprod Open**.

2019 Jan 29;2019(1):hoy024. doi: 10.1093/hropen/hoy024. PMID: 30895264; PMCID: PMC6396646.

Eistetter, H. R. Pluripotent Embryonal Stem Cell Lines Can Be Established from Disaggregated Mouse Morulae: (mouse embryonal stem (ES) cells/disaggregated morulae/in vitro development/teratoma). **Development, growth & differentiation**, 31(3), 275-282.1989. doi: 10.1111/j.1440-169X.1989.00275.x

Fonseca SA, Costas RM, Morato-Marques M, Costa S, Alegretti JR, Rosenberg C, da Motta EL, Serafini PC, Pereira LV. A Euploid Line of Human Embryonic Stem Cells Derived from a 43,XX,dup(9q),+12,-14,-15,-18,-21 Embryo. **PLoS One**. 2015 Nov 5;10(11):e0140999. doi: 10.1371/journal.pone.0140999. PMID: 26540511; PMCID: PMC4634922.

Fraga AM, Sukoyan M, Rajan P, Braga DP, Iaconelli A Jr, Franco JG Jr, Borges E Jr, Pereira LV. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplant**. 2011;20(3):431-40. doi: 10.3727/096368910X522261. Epub 2010 Aug 18. PMID: 20719082.

Fragouli E, Alfarawati S, Spath K, Jaroudi S, Sarasa J, Enciso M, Wells D. The origin and impact of embryonic aneuploidy. **Hum Genet**. 2013 Sep;132(9):1001-13. doi: 10.1007/s00439-013-1309-0. Epub 2013 Apr 26. PMID: 23620267.

Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. **Curr Opin Obstet Gynecol**. 1999 Jun;11(3):307-11. doi: 10.1097/00001703-199906000-00013. PMID: 10369209.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards

a single blastocyst transfer. **Fertil Steril**. 2000 Jun;73(6):1155-8. doi: 10.1016/s0015-0282(00)00518-5. PMID: 10856474.

Girardi L, Serdarogullari M, Patassini C, Poli M, Fabiani M, Caroselli S, Coban O, Findikli N, Boynukalin FK, Bahceci M, Chopra R, Canipari R, Cimadomo D, Rienzi L, Ubaldi F, Hoffmann E, Rubio C, Simon C, Capalbo A. Incidence, Origin, and Predictive Model for the Detection and Clinical Management of Segmental Aneuploidies in Human Embryos. **Am J Hum Genet**. 2020 Apr 2;106(4):525-534. doi: 10.1016/j.ajhg.2020.03.005. Epub 2020 Mar 26. PMID: 32220293; PMCID: PMC7118577.

Grati FR, Gallazzi G, Branca L, Maggi F, Simoni G, Yaron Y. An evidence-based scoring system for prioritizing mosaic aneuploid embryos following preimplantation genetic screening. **Reprod Biomed Online**. 2018 Apr;36(4):442-449. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.01.005. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29433970.

Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Mol Med**. 2000 Feb;6(2):88-95. PMID: 10859025; PMCID: PMC1949933.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**. 1981 Jul 9;292(5819):154-6. doi: 10.1038/292154a0. PMID: 7242681.

Khan FA, Almohazey D, Alomari M, Almofty SA. Isolation, Culture, and Functional Characterization of Human Embryonic Stem Cells: Current Trends and Challenges. **Stem Cells Int**. 2018 Aug 26;2018:1429351. doi: 10.1155/2018/1429351. PMID: 30254679; PMCID: PMC6142731.

- Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW, Moon SY. Methods for derivation of human embryonic stem cells. **Stem Cells**. 2005 Oct;23(9):1228-33. doi: 10.1634/stemcells.2004-0296. Epub 2005 Jul 28. PMID: 16051988.
- ESHRE PGT Consortium and SIG-Embryology Biopsy Working Group, Kokkali G, Coticchio G, Bronet F, Celebi C, Cimadomo D, Goossens V, Liss J, Nunes S, Sfontouris I, Vermeulen N, Zakharova E, De Rycke M. ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. **Hum Reprod Open**. 2020 May 29;2020(3):hoaa020. doi: 10.1093/hropen/hoaa020. PMID: 32500104; PMCID: PMC7257009.
- Lavon N, Narwani K, Golan-Lev T, Buehler N, Hill D, Benvenisty N. Derivation of euploid human embryonic stem cells from aneuploid embryos. **Stem Cells**. 2008 Jul;26(7):1874-82. doi: 10.1634/stemcells.2008-0156. Epub 2008 May 1. PMID: 18450823.
- Lerou PH, Yabuuchi A, Huo H, Takeuchi A, Shea J, Cimini T, Ince TA, Ginsburg E, Racowsky C, Daley GQ. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. **Nat Biotechnol**. 2008 Feb;26(2):212-4. doi: 10.1038/nbt1378. Epub 2008 Jan 27. PMID: 18223642.
- Li H, Zhou H, Fu X, Xiao R. Directed differentiation of human embryonic stem cells into keratinocyte progenitors in vitro: an attempt with promise of clinical use. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**. 2016 Sep;52(8):885-93. doi: 10.1007/s11626-016-0024-2. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27496193.
- Liu W, Yin Y, Long X, Luo Y, Jiang Y, Zhang W, Du H, Li S, Zheng Y, Li Q, Chen X, Liao B, Xiao G, Wang W, Sun X. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from poor quality

embryos. **J Genet Genomics**. 2009 Apr;36(4):229-39. doi: 10.1016/S1673-8527(08)60110-1. PMID: 19376483.

Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. **Nat Biotechnol**. 2006 Feb;24(2):185-7. doi: 10.1038/nbt1177. Epub 2006 Jan 1. PMID: 16388305.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1981 Dec;78(12):7634-8. doi: 10.1073/pnas.78.12.7634. PMID: 6950406; PMCID: PMC349323.

Mateizel I, De Temmerman N, Ullmann U, Cauffman G, Sermon K, Van de Velde H, De Rycke M, Degreef E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. **Hum Reprod**. 2006 Feb;21(2):503-11. doi: 10.1093/humrep/dei345. Epub 2005 Nov 10. PMID: 16284066.

Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, Plath K, Lowry WE, Benvenisty N. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**. 2010 Oct 8;7(4):521-31. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.017. PMID: 20887957.

Munné S, Velilla E, Colls P, Garcia Bermudez M, Vemuri MC, Steuerwald N, Garrisi J, Cohen J. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. **Fertil Steril**. 2005 Nov;84(5):1328-34. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.06.025. PMID: 16275225.

Nichols J, Smith A. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development*. 2011 Jan;138(1):3-8. doi: 10.1242/dev.050831. PMID: 21138972.

Niclis J, Trounson AO, Dottori M, Ellisdon A, Bottomley SP, Verlinsky Y, Cram D. Human embryonic stem cell models of Huntington disease. **Reprod Biomed Online**. 2009 Jul;19(1):106-13. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60053-3. PMID: 19573298.

O'Leary T, Duggal G, Lierman S, Van den Abbeel E, Heindryckx B, De Sutter P. The influence of patient and cohort parameters on the incidence and developmental potential of embryos with poor quality traits for use in human embryonic stem cell derivation. **Hum Reprod**. 2012 Jun;27(6):1581-9. doi: 10.1093/humrep/des040. Epub 2012 Mar 22. PMID: 22442247.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**. 1992 Jul 4;340(8810):17-8. doi: 10.1016/0140-6736(92)92425-f. PMID: 1351601.

Popovic M, Dhaenens L, Taelman J, Dheedene A, Bialecka M, De Sutter P, Chuva de Sousa Lopes SM, Menten B, Heindryckx B. Extended in vitro culture of human embryos demonstrates the complex nature of diagnosing chromosomal mosaicism from a single trophectoderm biopsy. **Hum Reprod**. 2019 Apr 1;34(4):758-769. doi: 10.1093/humrep/dez012. PMID: 30838420.

Ramos TV, Mathew AJ, Thompson ML, Ehrhardt RO. Standardized cryopreservation of human primary cells. *Curr Protoc Cell Biol*. 2014 Sep 2;64:A.3I.1-8. doi: 10.1002/0471143030.cba03is64. PMID: 25181304.

Ren X, Liu Q, Chen W, Zhu G, Li Y, Jin L, Zhang H. Selection and vitrification of embryos with a poor morphological score: a proposal to

avoid embryo wastage. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.** 2012 Jun;32(3):405-409. doi: 10.1007/s11596-012-0070-2. Epub 2012 Jun 9. PMID: 22684566.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nat Biotechnol.** 2000 Apr;18(4):399-404. doi: 10.1038/74447. Erratum in: *Nat Biotechnol* 2000 May;18(5):559. PMID: 10748519.

Robertson JA. Human embryonic stem cell research: ethical and legal issues. **Nat Rev Genet.** 2001 Jan;2(1):74-8. doi: 10.1038/35047594. PMID: 11253076.

Rodin S, Antonsson L, Niaudet C, Simonson OE, Salmela E, Hansson EM, Domogatskaya A, Xiao Z, Damdimopoulou P, Sheikhi M, Inzunza J, Nilsson AS, Baker D, Kuiper R, Sun Y, Blennow E, Nordenskjöld M, Grinnemo KH, Kere J, Betsholtz C, Hovatta O, Tryggvason K. Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. **Nat Commun.** 2014;5:3195. doi: 10.1038/ncomms4195. PMID: 24463987.

Rodriguez-Purata J, Lee J, Whitehouse M, Moschini RM, Knopman J, Duke M, Sandler B, Copperman A. Embryo selection versus natural selection: how do outcomes of comprehensive chromosome screening of blastocysts compare with the analysis of products of conception from early pregnancy loss (dilation and curettage) among an assisted reproductive technology population? **Fertil Steril.** 2015 Dec;104(6):1460-66.e1-12. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.08.007. Epub 2015 Sep 8. PMID: 26361205.

Rubio C, Rodrigo L, Garcia-Pascual C, Peinado V, Campos-Galindo I, Garcia-Herrero S, Simón C. Clinical application of embryo aneuploidy testing by next-generation sequencing. **Biol Reprod.** 2019 Dec 24;101(6):1083-1090. doi: 10.1093/biolre/ioz019. PMID: 30721942.

Sermon K. Current concepts in preimplantation genetic diagnosis (PGD): a molecular biologist's view. **Hum Reprod Update**. 2002 Jan-Feb;8(1):11-20. doi: 10.1093/humupd/8.1.11. PMID: 11866237.

Singla S, Iwamoto-Stohl LK, Zhu M, Zernicka-Goetz M. Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism. **Nat Commun**. 2020 Jun 11;11(1):2958. doi: 10.1038/s41467-020-16796-3. PMID: 32528010; PMCID: PMC7290028.

Takeuchi K. Pre-implantation genetic testing: Past, present, future. **Reprod Med Biol**. 2020 Oct 13;20(1):27-40. doi: 10.1002/rmb2.12352. PMID: 33488281; PMCID: PMC7812490.

Telias M, Kuznitsov-Yanovsky L, Segal M, Ben-Yosef D. Functional Deficiencies in Fragile X Neurons Derived from Human Embryonic Stem Cells. **J Neurosci**. 2015 Nov 18;35(46):15295-306. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0317-15.2015. PMID: 26586818; PMCID: PMC6605488.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7. doi: 10.1126/science.282.5391.1145. Erratum in: *Science* 1998 Dec 4;282(5395):1827. PMID: 9804556.

Tiegs AW, Tao X, Zhan Y, Whitehead C, Kim J, Hanson B, Osman E, Kim TJ, Patounakis G, Gutmann J, Castelbaum A, Seli E, Jalas C, Scott RT Jr. A multicenter, prospective, blinded, nonselection study evaluating the predictive value of an aneuploid diagnosis using a targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic testing for aneuploidy assay and impact of biopsy. **Fertil Steril**. 2021 Mar;115(3):627-637. doi: 10.1016/j.fertnstert.2020.07.052. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32863013.

- Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, Laufer N, Simon A, Abeliovich D, Reubinoff BE. Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. **Hum Reprod.** 2008 Jan;23(1):46-53. doi: 10.1093/humrep/dem351. Epub 2007 Nov 7. PMID: 17989069.
- Vera-Rodriguez M, Rubio C. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos. **Fertil Steril.** 2017 May;107(5):1107-1112. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.03.019. Epub 2017 Apr 19. PMID: 28433370.
- Verlinsky Y, Strelchenko N, Kukhareno V, Rechitsky S, Verlinsky O, Galat V, Kuliev A. Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. **Reprod Biomed Online.** 2005 Jan;10(1):105-10. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60810-3. PMID: 15705304.
- Verlinsky Y, Zech NH, Strelchenko N, Kukhareno V, Shkumatov A, Zlatopolsky Z, Kuliev A. Correlation between preimplantation genetic diagnosis for chromosomal aneuploidies and the efficiency of establishing human ES cell lines. **Stem Cell Res.** 2009 Jan;2(1):78-82. doi: 10.1016/j.scr.2008.07.002. Epub 2008 Jul 23. PMID: 19383411.
- Wang A, Kort J, Behr B, Westphal LM. Euploidy in relation to blastocyst sex and morphology. **J Assist Reprod Genet.** 2018 Sep;35(9):1565-1572. doi: 10.1007/s10815-018-1262-x. Epub 2018 Jul 20. PMID: 30030712; PMCID: PMC6133810.
- Yamanaka S, Takahashi K. [Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblast cultures]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso.** 2006 Dec;51(15):2346-51. Japanese. PMID: 17154061.
- Ye J, Bates N, Soteriou D, Grady L, Edmond C, Ross A, Kerby A, Lewis PA, Adeniyi T, Wright R, Poulton KV, Lowe M, Kimber SJ, Brison DR. High quality clinical grade human embryonic stem cell lines derived from fresh discarded embryos. **Stem Cell Res Ther.** 2017

Jun 5;8(1):128. doi: 10.1186/s13287-017-0561-y. PMID: 28583200; PMCID: PMC5460457.

Zatz M. Stem cell researches in Brazil: present and future challenges. **Stem Cell Rev Rep.** 2009 Jun;5(2):123-9. doi: 10.1007/s12015-009-9057-1. Epub 2009 Feb 19. PMID: 19225912.

Zheng Z, Lu W, Pei Z, Chen J, Yang T, Luo F. Generation of an induced pluripotent stem cell line (CHFUi001-A) from an osteogenesis imperfecta patient with COL1A2 mutation. **Stem Cell Res.** 2020 Jul 5;47:101907. doi: 10.1016/j.scr.2020.101907. Epub ahead of print. PMID: 32659730.

Zhou S, Cheng D, Ouyang Q, Xie P, Lu C, Gong F, Hu L, Tan Y, Lu G, Lin G. Prevalence and authenticity of de-novo segmental aneuploidy (>16 Mb) in human blastocysts as detected by next-generation sequencing. **Reprod Biomed Online.** 2018 Nov;37(5):511-520. doi: 10.1016/j.rbmo.2018.08.006. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30228073.

Anexos

Anexo 1 – Carta de Anuência Clínica de Fertilização *in vitro*



São Paulo, 13 fevereiro de 2020

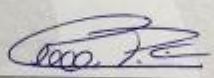
Ao Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP

Carta de Anuência

Eu, Prof. Dr. Alvaro Pigatto Ceschin, diretor da Felicità Instituto de Fertilidade, venho por meio desta informar que autorizo a Ianaê Ichikawa Ceschin, aluna de mestrado profissional do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da USP, a realizar a pesquisa intitulada **"Estudo de células-tronco embrionárias com anormalidades genéticas patogênicas"**, sob a orientação do Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto. Serão realizadas no Felicità Instituto de Fertilidade as seguintes atividades:

Descongelamento dos embriões a serem estudados, processo de derivação da linhagem tronco pluripotente e congelamento das amostras.

Declaro conhecer e cumprir as Resoluções Éticas em especial a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Esta instituição está ciente de suas responsabilidades como instituição coparticipante do projeto de pesquisa, e do seu compromisso no resguardo e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.



Prof. Dr. Alvaro Pigatto Ceschin
Diretor da Felicità Instituto de Fertilidade

Bibliografia

Ianaê Ichikawa Ceschin

Currículo Lattes: https://www.cnpq.br/cvlattesweb/pkg_impv.trata

Formação acadêmica/titulação

2012 - 2015

Graduação em Biomedicina.

Universidade Positivo, POSITIVO, Brasil.

Título: A prospective randomized study comparing two commercially available types of human embryo culture media: G1 - PLUSTM/G2 - PLUSTM sequential medium (Vitrolife) and the GL BLASTTM sole medium (Ingamed).

Orientador: Prof. José Eduardo Baroneza.

2016 - 2016

Especialização em Embriologia. (Carga Horária: 450h).

Associação Instituto Sapientiae, SAPIENTIAE, Brasil.

Título: Estudo comparando dois meios de comerciais: o meio GV BLAST e GLOBAL quanto ao desenvolvimento embrionário.

Orientador: Profa. Dra. Vania Cibele Minguetti-Camara.

Produção bibliográfica

CESCHIN, IANAÊ; ALI, TACCYANNA; CARVALHO, CRISTINA; UEHARA, MARIANE; MOTTA, PRISCILA; RIBOLDI, MARCIA

COVID-19: A review and considerations for the resumption of activities in an IVF laboratory and clinic in Brazil. JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. , v.25, p.293 - , 2021.

PÉREZ, PAULINA A. SANTANDER; CESCHIN, ÁLVARO P.; MORAES, DANIELA M P DE; OLIVEIRA, LUCILEINE K S N DE; CESCHIN, IANAE I; CESCHIN, NATHAN I

Early serum progesterone and prolactin analysis at day 9 of oocyte retrieval as a predictor of success in fresh ICSI cycles. JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. , v.22, p.95 - 98, 2018.

CESCHIN, IANAE I.; RIBAS, MARIANA H.; CESCHIN, ALVARO P.; NISHIKAWA, LUCILEINE; ROCHA, CLAUDIA C.; PIC-TAYLOR, ALINE; BARONEZA, JOSÉ EDUARDO

A prospective randomized study comparing two commercially available types of human embryo culture media: G1-PLUSTM/G2-PLUSTM sequential medium (Vitrolife) and the GL BLASTTM sole medium (Ingamed). JORNAL BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA. , v.20, p.23 - 26, 2016.

Atuação profissional

2016 - 2019 Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Privado , Carga horária: 40, Regime: Integral - Felicità Instituto de Fertilidade Ltda.

2020 - Atual Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Assessoria científica ,
Carga horária: 40, Regime: Integral - Laboratório Igenomix - IGX
Outras informações:
Atuo como assessora científica no aconselhamento pós laudo de
pacientes, elaboração científica e liberação de exames