

AVALIAÇÃO NÃO INVASIVA DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA HUMANA: DESENVOLVIMENTO DE UMA ABORDAGEM BIOINFORMÁTICA COM BASE EM MICRORNAS

RODRIGO ALBERTHO ALMEIDA WEDY¹; CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ;
FREDERICO SCHMITT KREMER²; PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON³

¹Universidade Federal de Pelotas – wedy.rodrico@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – christian.kun@gmail.com; fred.s.kremer@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – primleon@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Afetando cerca de um em cada seis indivíduos da população adulta global (OMS, 2023), a infertilidade consolida as tecnologias de reprodução assistida (TRAs), como a fertilização *in vitro* (FIV), como uma alternativa crucial (DE MOUZON et al., 2020). No entanto, as baixas taxas de implantação embrionária e os riscos associados à transferência de múltiplos embriões, como gestações múltiplas e complicações neonatais, evidenciam a demanda por métodos mais eficazes para a seleção de embriões de alta competência (GLEICHER et al., 2025).

Tradicionalmente, os principais métodos de seleção embrionária (SE) são a avaliação morfológica e a biópsia. Contudo, as limitações inerentes a esses métodos, como a subjetividade na classificação embrionária, o impacto na viabilidade e a incerta correlação com o potencial de implantação, impulsionam a busca por abordagens mais objetivas e que preservem a integridade do embrião (BASHIRI et al., 2025). Nesse cenário, as abordagens não invasivas, que analisam o meio de cultivo embrionário (*spent culture medium* - SCM), têm ganhado destaque (BASHIRI et al., 2025). Dentre as biomoléculas secretadas e passíveis de análise, os microRNAs (miRNAs) emergem como candidatos promissores (FANG et al., 2021).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, desempenhando papéis cruciais em processos celulares como diferenciação, apoptose, pluripotência e no desenvolvimento embrionário precoce (NIAZI; MAGOOLA, 2024). Sua estabilidade em fluidos corporais, incluindo o SCM, é um fato estabelecido; no entanto, o potencial de utilizar sua expressão para refletir o estado fisiológico do embrião ainda é uma área a ser analisada, o que os qualifica como promissores biomarcadores diagnósticos (HUANG, et al., 2022).

A presente pesquisa busca desenvolver uma ferramenta bioinformática para a otimização da seleção embrionária não invasiva, com base na análise de miRNAs do SCM. A relevância científica deste trabalho reside na integração de dados de miRNAs com bases de dados de predição de alvos e análise funcional. Esta abordagem é fundamental para preencher uma lacuna na compreensão dos mecanismos moleculares da embriogênese precoce e, por sua vez, impulsionar o desenvolvimento de estratégias diagnósticas mais eficazes em TRAs.

2. METODOLOGIA

Este trabalho teve como foco o desenvolvimento de uma ferramenta de bioinformática, para a classificação não invasiva de embriões humanos, fundamentado em uma abordagem computacional robusta e reprodutível. As análises ocorreram em um sistema operacional Ubuntu, versão 22.04.5 LTS.

A execução deste trabalho compreendeu a integração de várias ferramentas e bases de dados. Dados brutos de sequenciamento de small RNA (FASTQ), provenientes de estudos públicos, passaram por um controle de qualidade utilizando FastQC (Andrews, 2010) e MultiQC (Ewels et al., 2016). Em seguida, o alinhamento das *reads* de miRNAs foi efetuado com o alinhador STAR, otimizado para pequenos RNAs (Dobin et al., 2013). Para isso, será utilizado o genoma de referência humano GRCh38 e anotações de miRNAs do miRBase (Griffiths-Jones et al., 2008) e GENCODE (Frankish et al., 2019). O processamento dos arquivos de alinhamento (SAM/BAM) foi realizado com o Samtools (Li et al., 2009), e a qualidade do alinhamento foi avaliada com a ferramenta Qualimap (García-Alcalde et al., 2012).

A identificação de miRNAs de interesse baseou-se em dados públicos de RNA-seq (Petrooulos et al., 2016) e literatura científica, aplicando filtros rigorosos para expressão diferencial. Para a análise funcional e predição de alvos, consultou-se bases de dados como miRDB e TargetScan, que fornecem informações sobre as interações miRNA-mRNA. A interpretação biológica foi aprofundada por meio de análises de enriquecimento funcional utilizando *Gene Ontology* (GO) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), com o suporte de ferramentas como DAVID, Enrichr e clusterProfiler.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O trabalho consistiu na aplicação de um *pipeline* bioinformático rigoroso para a análise de miRNAs, que utilizou ferramentas como FastQC, MultiQC, STAR e Samtools para pré-processamento e alinhamento de dados. Através deste processo, foram identificados 46 miRNAs com potencial de regular genes-alvo importantes. Entre os genes preditos, destacam-se MYCN, CCND1, SOS1, BCL2, CDK6, LATS2, PTEN, ZEB1, MYCBP, FOXO1, MYCBP2, LIN28A, LIN28B, RUNX2, IGF1R, BAG4 e KLF4. A análise funcional desses genes sugere que os miRNAs identificados podem influenciar mecanismos de diferenciação celular e manutenção da totipotência, reforçando sua relevância para o desenvolvimento embrionário inicial.

Espera-se que a execução deste projeto culmine no desenvolvimento de uma ferramenta em Python, de código aberto e documentada, capaz de automatizar a análise funcional de perfis de miRNAs. Esta ferramenta será projetada para receber uma lista de miRNAs como entrada e realizar consultas automatizadas às bases de dados para identificar genes-alvo preditos. Adicionalmente, ela executará análises de enriquecimento funcional e de vias metabólicas para o conjunto de genes-alvo identificados, gerando relatórios e visualizações gráficas que facilitarão a interpretação dos resultados.

A aplicação da ferramenta em dados de miRNAs de embriões de alta e baixa qualidade deverá permitir a identificação de "assinaturas de miRNAs" distintas para cada grupo, caracterizando perfis específicos associados à competência desenvolvimental do embrião. Ao analisar as vias reguladas pelos miRNAs

diferencialmente expressos, espera-se obter *insights* valiosos sobre os mecanismos moleculares que governam o desenvolvimento embrionário humano, especialmente em torno do terceiro dia, onde ocorre o início da ativação do genoma zigótico (AGZ). Os resultados poderão elucidar quais processos biológicos são desregulados em embriões que não atingem seu pleno potencial de desenvolvimento.

Em última análise, este trabalho tem um potencial de avanço significativo na área de reprodução assistida, propondo o desenvolvimento de um protótipo inovador e uma prova de conceito para um método não invasivo de classificação embrionária. Este modelo, fundamentado na análise detalhada do perfil de miRNAs secretados no SCM, promete revolucionar a predição do potencial de implantação de embriões, superando as limitações da avaliação morfológica tradicional. Considerando que a taxa de gravidez por transferência em procedimentos de FIV é de aproximadamente 35% (OMS, 2023), o projeto visa um impacto transformador através de um aumento substancial nas taxas de sucesso, oferecendo desfechos mais promissores para casais que enfrentam a infertilidade.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho, utilizando dados da literatura provenientes de 1.529 células de 88 embriões humanos (Petropoulos et al., 2016), representa uma inovação significativa ao propor e detalhar o desenvolvimento de um *pipeline* bioinformático. A ferramenta visa otimizar a análise de miRNAs no meio de cultivo embrionário, oferecendo uma abordagem não invasiva e objetiva para a avaliação da qualidade embrionária. A principal inovação reside na integração sistemática de bases de dados de predição de alvos e análise funcional, permitindo a inferência de mecanismos moleculares complexos que governam a embriogênese. Este estudo tem o potencial de criar condições para a identificação de biomarcadores mais precisos, contribuindo para o avanço das tecnologias de reprodução assistida e, em última instância, para a melhoria dos desfechos clínicos da FIV.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASHIRI, Z. et al. Advanced strategies for single embryo selection in assisted human reproduction: A review of clinical practice and research methods. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 52, n. 1, p. 8–29, 1 mar. 2025.

BRANDINE, G. S.; SMITH, A. D. Falco: high-speed FastQC emulation for quality control of sequencing data. **F1000Res**, v. 8, n. 1874, 2019.

DE MOUZON, J. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology 2012. **Human Reproduction**, v. 35, n. 8, p. 1900–1913, 1 ago. 2020.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

EWELS, P. et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047-3048, 2016.

FANG, F. et al. MicroRNAs secreted by human embryos could be potential biomarkers for clinical outcomes of assisted reproductive technology. **Journal of Advanced Research**, v. 31, p. 25–34, jul. 2021.

GARCÍA-ALCALDE, F. et al. Qualimap: evaluating next-generation sequencing alignment data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 20, p. 2678-2679, 2012.

GLEICHER, N. et al. Why the hypothesis of embryo selection in IVF/ICSI must finally be reconsidered. **Human Reproduction Open**, v. 2025, n. 2, p. hoaf011, 7 mar. 2025.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D154–D158, 2008.

HARROW, J. et al. GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1760-1774, 2012.

HUANG, H. et al. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA–target interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D222–D230, 7 jan. 2022.

LI, H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. **Bioinformatics**, v. 25, n. 16, p. 2078–2079, 2009.

NIAZI, S. K.; MAGOOLA, M. MicroRNA Nobel Prize: Timely Recognition and High Anticipation of Future Products—A Prospective Analysis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 12883, 29 nov. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (WHO). 1 in 6 people globally affected by infertility: WHO. Geneva: WHO, 4 abr. 2023. **News release**. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/04-04-2023-1-in-6-people-globally-affected-by-infertility>. Acesso em: 10 jun. 2025.

PETROPOULOS, S. et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 1012–1026, maio 2016.