

Embriología

Taxa de Clivagem de embriões in vitro e seu impacto no peso dos recém nascidos

Embryo in vitro Cleavage and its impact on neonates birth weight

Pires I, Figueiredo H, Pinelo S, Serra H, Barbosa A, Felgueira E, Tavares A

Unidade de Medicina da Reprodução. Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia/Espinho, EPE.

Resumo

A avaliação da morfologia tem sido empregue desde há muitos anos para determinar que embriões in vitro têm maior potencial de gravidez. Os embriões são avaliados de acordo com o número de células, extensão de fragmentação, presença de granulosidades citoplasmáticas e vacúolos, assim como simetria dos blastómeros.

Raros estudos relacionam dados neonatais com as características dos embriões in vitro transferidos num tratamento de fertilização assistida.

O presente estudo analisou a hipótese dos embriões com menor número de células ao terceiro dia estarem associados a recém-nascidos de menor peso.

Foram recolhidos dados de 128 gestações de feto único (≥ 37 semanas) para determinar o peso médio dos recém-nascidos de acordo com o número médio de células dos embriões transferidos ao terceiro dia. Foram excluídos os ciclos com recurso a espermatozóides do testículo e/ou criopreservados, assim como gestações obtidas com embriões criopreservados.

Os dados obtidos permitiram verificar que o peso médio dos recém-nascidos aumenta com o número médio de células: 2947,0g para embriões com menos de 7 células (Grupo I; n=49); 3007,9g para embriões com 7 a 8 células (Grupo II; n=62) e 3147,0g para embriões com mais de 8 células (Grupo III; n=13). Esta correlação positiva não foi influenciada nem pelo sexo dos recém-nascidos, nem pela técnica de inseminação.

A demonstração de casualidade é limitada devido ao facto de ser impossível saber qual o embrião transferido que implantou e originou o feto. Apesar do incompleto registo de alguns factores que influenciam o peso à nascença, o nosso estudo sugere que o número médio de células dos embriões ao terceiro dia está associado com o peso dos recém-nascidos.

Palavras-chave: Taxa de clivagem. Peso dos recém-nascidos. Transferência de embriões ao terceiro dia

Correspondência: Ilda Pires.

Unidade de Medicina da Reprodução.
Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho,
EPE. Unidade II.
Rua Dr. Francisco Sá Carneiro. 4400-129
Vila Nova de Gaia.
Portugal
imspires75@gmail.com

Summary

Morphology evaluation has been used for many years to determine which in vitro embryos have higher potential to implant. Embryos are evaluated according to cells number, extension of fragmentation, presence of cytoplasmic granulosity and vacuoles, as well as blastomeres symmetry.

Rare studies related birth outcomes with embryonic characteristics of in vitro embryos transferred on an assisted fertilization treatment.

The present study analysed the hypothesis that embryos with a lower cells number on day 3 could be associated with neonates of lower weight.

One hundred and twenty eight singleton births data (≥ 37 weeks) were analysed to assess mean birth weight according to mean cell number in the transferred cohort at third day. Cycles with testicular spermatozoa and/or cryopreserved spermatozoa were excluded, as well as pregnancies obtained from frozen embryos.

The analyse from data allowed to conclude that mean birth weight increased with increasing average cell number: 2947,0g for embryos with fewer than 7 cells (Group I; n=49); 3007,9g to embryos with 7 to 8 cells (Group II; n=62) and 3147,0g (Group III; n=13) for embryos with more than 8 cells. This positive correlation was not influenced by neonates' sex nor insemination technique.

Demonstration of causality is limited due to impossibility to know which embryo in the transferred group implanted and grew into a fetus. Complete data were also lacking on some factors that influence birth weight, however, our data indicates that mean cell number on day three is positively associated with birth weight.

Key-words: Cleavage rate. Neonates' birth weight. Third day embryo transfer

INTRODUÇÃO

A introdução das técnicas de procriação medicamente assistida (PMA) tornou-se o avanço mais significativo no tratamento da infertilidade, tanto masculina como feminina. Desde o relato da primeira criança concebida por fertilização in vitro (FIV) (1), mais de um milhão de crianças foram assim concebidas (2). Em vários países estas crianças representam já 2-4% do total de crianças nascidas (3). Os registos nacionais e internacionais apontam para um aumento gradual das taxas de sucesso.

As técnicas de FIV e microinjecção intracitoplasmática (ICSI) permitiram a visualização do desenvolvimento morfológico dos embriões humanos previamente à implantação. Vários autores são de opinião que, os embriões com um número de células inferior a seis ao terceiro dia, apresentam um desenvolvimento anormalmente lento, enquanto que se este número for superior a oito células, os embriões apresentam um desenvolvimento anormalmente rápido (4-5). Paralelamente, embriões com fragmentação (4-5) e/ou blastómeros assimétricos (6-7) são considerados como tendo uma morfologia anormal. Vários autores demonstraram que embriões com baixa taxa de clivagem, fragmentação e assimetria apresentam baixas taxas de implantação (8-10).

Alguns estudos têm mostrado alguma preocupação com o bem-estar das crianças concebidas por técnicas de PMA devido a aumentos na incidência de anomalias congénitas relativamente a grupos de controlo de gravidez espontânea (11-14). Uma outra preocupação é o baixo peso à nascença destas crianças, mas há poucos estudos que correlacionem a morfologia dos embriões e os dados neonatais. Por outro lado Ebner et al. (15) estabeleceram uma correlação positiva entre o grau de fragmentação e a taxa de malformações.

Neste estudo pretendeu-se avaliar a relação entre características morfológicas dos embriões e dados neonatais, com particular interesse pela associação entre a taxa de clivagem e o peso dos recém-nascidos. Procurou verificar-se se embriões com progressão mais lenta (medida pelo número de células) podem estar associados a crianças com menor peso à nascença.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo envolveu 128 nascimentos de feto único de termo (idade gestacional (IG) igual ou superior a 37 semanas (provenientes de ciclos FIV/ICSI com espermatozóides do ejaculado colhidos a fresco e nos quais as transferências foram realizadas com em-

bríões não criopreservados ao terceiro dia (aproximadamente 72 horas após a inseminação).

Situações como a gravidez múltipla e a presença de malformações congénitas, foram excluídas por poderem influenciar o peso dos recém-nascidos (RN).

A idade gestacional foi calculada do seguinte modo: (data do parto - (data da punção folicular + 14)) (.Esta definição é equivalente à datação efectuada para a gravidez espontânea, na qual o último período menstrual é usado, adicionando 14 dias (em média) para calcular o tempo de gestação).

A avaliação morfológica dos embriões teve em consideração a morfologia dos pronúcleos (segundo os critérios de Scott e Smith (16)), presença de primeira divisão às 24 horas, taxa de clivagem, fragmentação, assimetria, multinucleação, granulosidades no espaço peri-vitelino e aspecto da zona pelúcida.

Para a transferência foram seleccionados os embriões com maior número de células, menor grau de fragmentação, maior simetria entre os blastómeros e ausência de células multinucleadas.

O levantamento dos dados foi efectuado através da consulta dos processos e contacto telefónico com os casais.

Foram estabelecidos três grupos mediante o número médio de células dos embriões transferidos: Grupo I (embriões com menos de 7 células (n=49), Grupo II (embriões com 7 a 8 células; n=62) e Grupo III: (embriões com mais de 8 células; n=13), tendo sido calculado o peso médio dos RN em cada grupo.

A associação entre o número de células e peso à nascença foi avaliada segundo teste t-Student.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta algumas características da população em estudo, destacando-se a idade da mulher (31,7±3,8 anos), idade do homem (33,6±5,2 anos) e duração da infertilidade (5,0±2,8 anos). Foram transferidos em média 2,1±0,7 embriões com uma média de 6,9±1,5 células. O peso médio dos RN foi de 3004,0±607,3g, tendo nascido com uma IG média de 39,0±1,1 semanas. A percentagem de crianças nascidas do sexo masculino foi de 47,9.

Número de células ao terceiro dia

Quando se analisou a relação entre o peso médio à nascença em função do número médio de células por embrião transferido, observou-se uma correlação positiva com significado estatístico (P<0,05), uma vez que no Grupo I o peso médio foi de 2947±6620g, no

Tabela 1

Características e resultados globais da população em estudo (n=128)

idade média (±SD) mulher (anos)	31,7±3,8
idade média (±SD) homem (anos)	33,6±5,2
duração média (±SD) infertilidade (anos)	5,0±2,8
n.º médio (±SD) ovócitos colhidos	9,0±5,5
n.º médio (±SD) ovócitos inseminados	7,4±4,0
n.º médio (±SD) ovócitos fecundados	3,9±2,3
taxa de fecundação (%)	52,6
taxa de implantação (%)	51,9
n.º médio (±SD) embriões transferidos	2,1±0,7
peso médio (±SD) à nascença (g)	3004,0±607,3
n.º médio (±SD) semanas à nascença	39,0±1,1
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	6,9±1,5
RN do sexo masculino (%)	47,9

Grupo II foi de 3008±608,3g e no Grupo III foi de 3147±424,7g (Figura 1).

Conforme se pode verificar na Tabela 2 não houve diferenças significativas entre os três grupos relativamente às características globais, taxa de fecundação, taxa de implantação, número de embriões transferidos, IG e percentagem de RN do sexo masculino.

O número médio de células por embrião transferido foi de 5,3±0,9 para o Grupo I, 7,7±0,4 para o Grupo II e 9,0±0,5 para o Grupo III (P<0,001).

Sexo

Analisando os resultados globais face ao sexo dos RN, verificou-se que as crianças do sexo masculino (representando 47,9% de todas as crianças) nasceram com um peso médio de 3145,2±655,9g e uma IG de

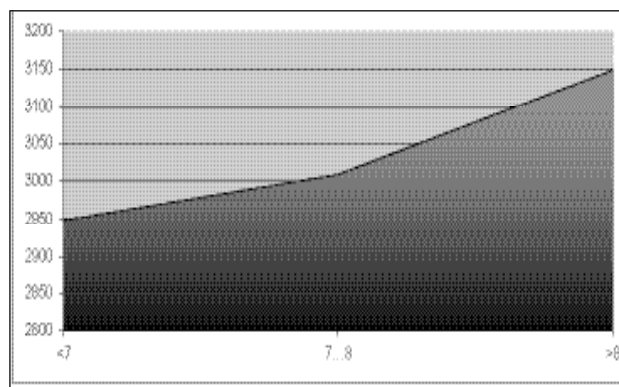


Figura 1

Distribuição do peso à nascença (g) por número de células ao terceiro dia.

Tabela 2

Características e resultados dos ciclos consoante o número de células

	Grupo I	Grupo II	Grup III
idade média (±SD) mulher (anos)	31,6±3,7	32,0±4,0	30,2±3,8
idade média (±SD) homem (anos)	32,6±5,2	34,3±5,4	32,9±4,5
duração média (±SD) infertilidade (anos)	5,5±3,3	4,6±2,4	4,4±2,4
taxa de fecundação (%)	47,62	55,56	62,04
taxa de implantação (%)	45,55	56,78	53,57
n.º médio (±SD) embriões transferidos	2,3±0,7	1,9±0,6	2,2±0,5
peso médio (±SD) à nascença (g)	2947,0±662,0*	3007,9±608,3*	3147,0±424,7*
n.º médio (±SD) semanas à nascença	38,1±2,8	38,1±2,8	38,8±1,3
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	5,3±0,9**	7,7±0,4**	9,0±0,5**
RN do sexo masculino (%)	53,1	40,8	50,0

*P<0,05

**P<0,001

38,1±2,9 semanas, enquanto as crianças do sexo feminino nasceram com um peso médio inferior (2943,2±552,5g) e uma IG superior (38,5±2,2 semanas) (Figura 2 e Tabela 3).

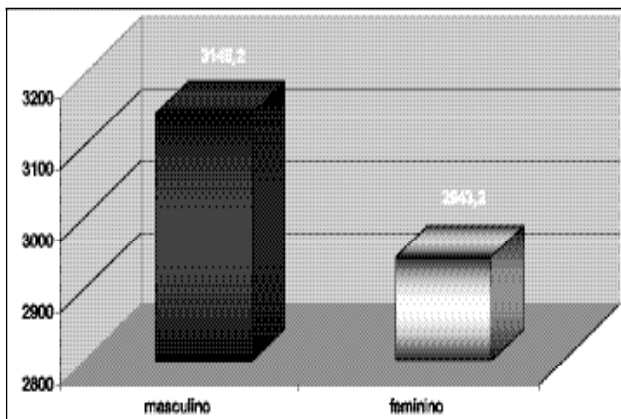


Figura 2

Distribuição do peso à nascença (g) por sexo dos RN

Tabela 3

Resultados dos ciclos por sexo dos RN

	masculino	feminino
peso médio (±SD) à nascença (g)	3145,2±655,9	2943,2±552,5
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	7,0±1,5	7,2±1,4
n.º médio (±SD) semanas à nascença	38,1±2,9	38,5±2,2

Os RN do sexo masculino resultaram de embriões transferidos com uma média de 7,0±1,5 células e os do sexo feminino de embriões transferidos com uma

média de 7,2±1,4 células. Ao analisar a distribuição do peso médio dos RN por sexo nos três grupos verifica-se a mesma correlação positiva nos dois sexos (aumento de número de células-aumento de peso) (Figura 3 e Tabela 4) tendo sido, no entanto, uma diferença mais acentuada nos RN do sexo masculino.

Técnica

Quando se analisaram os dados face à técnica utilizada verificou-se não haver diferenças significativas entre o grupo da FIV (n=46) e ICSI (n=82) (Tabela 5).

DISCUSSÃO

A análise de 128 nascimentos de feto único após PMA mostrou que o número médio de células dos

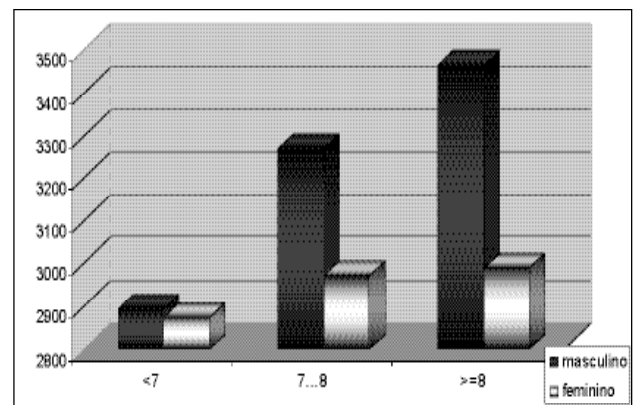


Figura 3

Distribuição do peso à nascença (g) por número de células e sexo dos RN

Tabela 4
Resultados dos ciclos por sexo dos RN nos três grupos

	masculino	feminino
Grupo I		
peso médio (±SD) à nascença (g)	2893,5±895,3	2873,9±515,9
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	5,4±0,9	5,5±1,0
n.º médio (±SD) semanas à nascença	38,5±1,1	39,0±1,0
Grupo II		
peso médio (±SD) à nascença (g)	3270,5±382,9	2971,0±616,1
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	7,7±0,4	7,7±0,4
n.º médio (±SD) semanas à nascença	38,8±1,2	39,1±1,0
Grupo III		
peso médio (±SD) à nascença (g)	3464,4±455,3	2989,8±218,3
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	9,0±0,6	9,1±0,5
n.º médio (±SD) semanas à nascença	39,8±1,0	39,0±0,7

Tabela 5
Resultados dos ciclos consoante a técnica utilizada

	FIV	ICSI
n.º médio (±SD) embriões transferidos	2,1±0,6	2,1±0,7
n.º médio (±SD) células por embrião transferido	6,8±1,5	7,0±1,5
peso médio (±SD) à nascença (g)	2959,6±667,0	3029,3±573,2
n.º médio (±SD) semanas à nascença	39,0±1,2	39,0±1,1

embriões transferidos ao terceiro dia está significativamente associado com o peso à nascença. Esta observação é consistente com a hipótese de que os embriões com taxas de clivagem mais lentas estão associados com o nascimento de crianças com menor peso (17), mas não pareceu associada, nem ao sexo dos RN (apesar dos rapazes terem nascido com peso superior), nem à técnica de PMA utilizada.

Apesar de não parecer haver implicações clínicas pelas diferenças de peso observadas neste estudo, a existência desta associação pode reflectir diferenças biológicas do desenvolvimento, que se podem manifestar mais tardiamente.

A associação entre a qualidade dos embriões com os dados neonatais contou com a impossibilidade de identificar, de um grupo de embriões transferidos, o embrião que implantou e originou o feto. Adicionalmente, uma vez que os embriões transferidos num mesmo ciclo podem variar nas características morfológicas entre si, torna-se impossível associar as características de um embrião em particular com o peso à nascença ou outros dados específicos. Esta limitação é comum a vários estudos que examinam os dados de gravidez das mulheres após PMA, já que normalmente são transferidos mais embriões do que aqueles que implantam. Para analisar o impacto

desta variável, será necessário efectuar um estudo adicional incluindo apenas ciclos em que os embriões transferidos não difiram no número de células nem na morfologia, mas a situação ideal seria analisar apenas os ciclos onde houve a transferência de apenas um embrião.

A análise neste estudo controlou uma série de factores potencialmente influenciáveis nos resultados após PMA (incluindo idade materna, gestações únicas de termo), mas não foi tida em conta a qualidade dos embriões (fragmentação, simetria entre os blastómeros aspecto zona pelúcida, presença de grânulos no espaço peri-vitelino). Em contrapartida o sexo dos RN foi considerado, uma vez que vários estudos mostraram a tendência de haver um predomínio de RN do sexo masculino quando se transferem embriões com taxa de clivagem superior no segundo dia (18-19), enquanto outros estudos não apoiam a ideia de que embriões masculinos se dividem mais rapidamente do que os femininos (20-22). No nosso estudo não observámos qualquer correlação entre o sexo RN e a taxa de clivagem.

Um estudo de Lieberman et al. (17) sugere uma influência da eclosão assistida (EA), uma vez que, quando esta era efectuada, deixava de se notar a associação entre o número de células e o peso à nascença,

principalmente em embriões com menos de 7 células (para embriões com um número de células superior a EA não influenciava o peso das crianças). Estes dados sugerem que embriões com taxa de clivagem inferior podem representar um subgrupo para os quais pode ser benéfico a EA.

O mecanismo pelo qual a EA afecta o desenvolvimento do embrião e o subsequente desenvolvimento fetal não é conhecido, e tanto quanto é do nosso conhecimento, nunca foi detectado. Em princípio a EA é vista como um meio de ultrapassar alguma anomalia da zona pelúcida que, de outra maneira, poderia comprometer a saída do embrião para implantar (23) mas parecer também provocar mudanças intrínsecas no desenvolvimento de embriões com desenvolvimento lento, resultando em RN com maior peso.

As observações apresentadas sugerem que a criação de um buraco na zona pelúcida pode alterar o metabolismo do embrião e/ou facilitar as interacções complexas do embrião com o endométrio durante o processo de implantação.

No entanto, os nossos resultados sugerem que estas alterações não são influenciadas pelo orifício que é criado aquando da ICSI, uma vez que o peso dos RN originados por FIV ou ICSI não apresentou diferenças.

Uma outra situação coloca-se perante os embriões que são sujeitos a **diagnóstico genético pré-implantação** (DGPI). Tanto quanto temos conhecimento não há nenhum estudo que tenha analisado se a extracção de 1-2 células a um embrião de 6 a 8 células ao terceiro dia, poderá influenciar o peso dos RN. Outra preocupação associada ao DGPI prende-se com o recurso ao ácido Tyrode/laser, uma vez que há alguns artigos que referem que poderão ter algum efeito deletérico no desenvolvimento dos embriões. Neste estudo a influência destes factores não se colocou, mas fica a intenção de analisar posteriormente se poderão estar associados a dados neonatais desfavoráveis.

Uma limitação deste estudo prendeu-se com a inexistência do registo de hábitos tabágicos das pacientes, pelo que este factor não foi tido em consideração nesta análise. Os estudos presentes na literatura sobre a influência do tabaco na qualidade embrionária e no sucesso da PMA são contraditórios. No entanto, não acreditamos que diferenças no consumo de tabaco possam explicar estes resultados. Adicionalmente, não foi possível controlar complicações da gravidez tais como hipertensão gestacional, diabetes gestacional e outros factores predicativos de baixo peso dos RN24-25. Apesar de não haver indicações de que estas condições estejam associadas a alterações precoces de crescimento celular, podem representar uma das razões porque os embriões progridem mais lenta-

mente durante o processo pré-implantação, resultando em última análise num peso baixo à nascença. É urgente haver mais investigação para examinar se estes factores, que se sabem influenciar os resultados obstétricos, podem ter interferido nas associações presentes neste estudo.

Em suma, os dados recolhidos neste estudo mostraram que a taxa de clivagem está positivamente correlacionada com o peso à nascença, independentemente da técnica usada e do sexo do RN. Estas observações são significativas porque são raras as demonstrações de ligação entre os dados neonatais e as características embrionárias prévias à implantação. Simultaneamente, esta observação pode não ser exclusiva das crianças nascidas através de PMA, podendo aplicar-se a toda a população, mas logicamente, esses embriões estão inacessíveis para observação e análise.

O mecanismo biológico subjacente a esta associação é desconhecido. Os modelos animais mostram que os embriões cultivados *in vitro* exibem padrões de expressão génica diferente de embriões produzidos *in vivo*. É igualmente desconhecido se a EA está associada com alguma correcção ou modificação da expressão génica dos embriões com menor taxa de clivagem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração da Unidade de Medicina da Reprodução do Hospital da Senhora da Oliveira.

BIBLIOGRAFIA

1. **Stephoe PC, Edwards R.:** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978, 2:366.
2. **Bergh C.:** Single embryo transfer a mini-review. *Hum Reprod* 2005, 20:323-327.
3. **Nyboe-Andersen A, Gianaroli L, Nygren KG.:** Assisted reproductive technology in Europe, 2000. Results from European registers by ESRHE. *Hum Reprod* 2004, 19:490-503.
4. **Alikani M, Cohen J, Tomkin G, et al.:** Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999, 71:836-842.
5. **Ebner T, Yaman C, Moser M, et al.:** Embryo fragmentation *in vitro* and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2001, 76:281-285.
6. **Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, et al.:** Embryo score to predict implantation after *in vitro* fertiliza-

- tion: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995, 10:2427-2431.
7. **Handarson T, Hanson C, Sjorgen A, Lundi K.:** Human embryos with unevenly sized blastomers have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleations. *Hum Reprod* 2001, 16:313-318.
 8. **Boiso I, Viega A, Edwards RG.:** Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod BioMed Online* 2002, 5:328-350.
 9. **De Placido G, Wilding M, Strina I, et al.:** High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002, 17:2402-2409.
 10. **Racowsky C, Combelles CMH, Nureddin A, et al.:** Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online* 2002, 6:76-84.
 11. **Ericson A, Källén B.:** Congenital malformations in infants born after IVF: a population-based study. *Hum Reprod* 2001, 16:504-509.
 12. **Anthony S, Buitendijk SE, Dorrepaal CA, et al.:** Congenital malformation in 4224 children conceived after IVF. *Hum Reprod* 2002, 17:2089-2095.
 13. **Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S.:** The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002, 346:725-730.
 14. **Ludwig M, Katalinic A.:** Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 2002, 5:171-178.
 15. **Ebner T, Yaman C, Moser M, et al.:** Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancies outcome *Fertil Steril* 2001, 76:281-285.
 16. **Scott LA, Smith S.:** The successful use of PN embryo transfers the day following oocyte retrieval *Hum Reprod* 1998, 13:1003-1013.
 17. **Lieberman E, Ginsburg ES, Racowsky C.:** Rate of cell division and weight of neonates following IVF. *Reprod Biomed Online* 2006,12:315-321.
 18. **Pergament E, Fiddler M, Cho N, et al.:** Sexual differentiation and preimplantation cell growth. *Hum Reprod* 1994, 9:1730-1732.
 19. **Tarin JJ, Bernabeu R, Baviera A, et al.:** Sex selection may be inadvertently performed in in-vitro fertilization-embryo transfer programmes *Hum Reprod* 1995, 11:2992-2998.
 20. **Fanchin R, Righini C, Olivennes F, et al.:** Female and male human embryo growth rates are similar before the eight-cell stage. *Am J Obst Gynec* 1998, 178:45-49.
 21. **Ng E, Claman P, Tanphaichitr N, Compitak K, et al.:** Sex ratio of babies is unchanged after transfer of fast- versus slow-cleaving embryos. *J Assist Reprod Genet* 1995, 12:566-568.
 22. **Ng E, Claman P, Leveille MC, et al.:** Sex ratio of babies is unchanged after transfer of fast- versus slow-cleaving embryos. *J. Assist Reprod Genetics* 1998, 15:403-404.
 23. **Edi-Osagie E, Hoper L, Seif M.:** The impact of assisted hatching on live birth rates and outcomes of assisted conception: a systemic review. *Fertil Steril* 2003, 18:1828-1835.
 24. **Cogswell ME, Yip R.:** The influence of fetal and maternal factors on the distribution of birth weight. *Sem Perinat* 1995, 19:222-240.
 25. **Kramer MS, Morin I, Yang H, et al.:** Temporal trends in fetal growth and its determinants. *J Pediatr* 2002, 14:538-542.