



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Jessica Cavalcante dos Santos de Paiva

**miRNAs COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DO PROCESSO DE
IMPLANTAÇÃO DO BLASTOCISTO HUMANO: UMA REVISÃO**

Florianópolis
2026

Jessica Cavalcante dos Santos de Paiva

**miRNAs COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DO PROCESSO DE
IMPLANTAÇÃO DO BLASTOCISTO HUMANO: UMA REVISÃO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientadora: Profa. Dra. Evelise Maria Nazari
Coorientadora: Profa. Dra. Yara Costa Netto Muniz

Florianópolis

2026

de Paiva, Jessica Cavalcante dos Santos
miRNAs COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DO PROCESSO DE
IMPLANTAÇÃO DO BLASTOCISTO HUMANO :UMA REVISÃO / Jessica
Cavalcante dos Santos de Paiva ; orientadora, Evelise
Maria Nazari, coorientadora, Yara Costa Netto Muniz, 2026.
67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento,
Florianópolis, 2026.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. microRNA.
3. embrião. 4. nidação. I. Nazari, Evelise Maria. II.
Muniz, Yara Costa Netto . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e do Desenvolvimento. IV. Título.

Jessica Cavalcante dos Santos de Paiva

miRNAs COMO POTENCIAIS BIOMARCADORES DO PROCESSO DE
IMPLANTAÇÃO DO BLASTOCISTO HUMANO: UMA REVISÃO

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 20 de agosto de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.a Dr.a Evelise Maria Nazari
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.a Dr.a Aline Guimarães Pereira
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.a Dr.a Franceli Rodrigues Kulcheski
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Programa De Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.a Dr.a Evelise Maria Nazari
Orientadora

“E se cheguei até aqui, por mais percalços, dores e colapsos, certamente foi por mãos alheias segurarem minhas mãos.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Universidade Federal de Santa Catarina** pelo espaço e estrutura. Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento (PPGBCD)** pela oportunidade de colocar em prática essa pesquisa científica. Pelo apoio do **Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA)** e incentivo dos colegas de laboratório. Ao programa de bolsa da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, por auxiliar na minha estadia em Florianópolis. Agradeço imensamente às minhas queridas mulheres orientadoras, Prof^a. Dr^a. **Evelise Maria Nazari** e Prof^a. Dr^a. **Yara Costa Netto Muniz**. O orgulho maior eu não poderia ter ao ser acompanhada por mulheres exemplares, tão queridas e compreensivas. Agradeço ainda a segunda revisora desta revisão de escopo, bióloga **Maria Anicia Junckes** e ao doutorando do PPGBCD **Bernardo Perin Cintra**, pelo apoio e colaboração na metodologia.

“Previsões estimam que o mundo será habitado por mais de 157 milhões de pessoas derivadas de pelo menos uma tecnologia de reprodução assistida até 2100.”
(Faddy et al., 2018)

RESUMO

Com o aumento da demanda pela reprodução assistida humana, tornou-se essencial o aperfeiçoamento das tecnologias para a seleção de blastocistos com maior potencial de implantação no endométrio. O objetivo deste trabalho foi identificar microRNAs secretados por blastocistos em meios de cultura, que pudessem atuar como biomarcadores preditivos para o processo de implantação no endométrio. O estudo utilizou uma revisão da literatura, elencando pesquisas experimentais humanas com amostras de meios de cultivo que continham miRNAs exocitados de blastocistos provenientes de clínicas de reprodução assistida. A metodologia envolveu a filtragem de artigos por título e resumo, seguida da leitura integral dos trabalhos selecionados e análise das informações elencadas. Os artigos selecionados, resultantes dos critérios de inclusão e exclusão, destacaram que 17 famílias de miRNAs. Destas, 9 famílias foram concordantes em resultado em mais de um artigo, reafirmando os resultados de implantação e não implantação. Foram analisados, na literatura, possíveis alvos e efeitos desses microRNA, sendo possível determinar que o subtipo miR-99a-5p e a família miR-199 se correlacionam à implantação, enquanto as famílias let-7 e miR-515 e o subtipo miR-519d-3p se correlacionam à falha da implantação. A reafirmação dos padrões de expressão dessas 9 famílias de microRNAs como potenciais biomarcadores para o processo de implantação pode contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos não-invasivos de análise de blastocistos para transferência na reprodução assistida e melhorar as taxas de sucesso de implantação.

Palavras-chave: microRNA; embrião; nidação.

ABSTRACT

With the increased demand for assisted human reproduction, it has become essential to improve technologies for selecting blastocysts with greater potential for implantation in the endometrium. The objective of this work was to identify microRNAs secreted by blastocysts in culture media that could act as predictive biomarkers for the implantation process in the endometrium. The study used a literature review, listing human experimental research with culture media samples containing miRNAs exocytosed from blastocysts from assisted reproduction clinics. The methodology involved filtering articles by title and abstract, followed by full reading of the selected works and analysis of the information listed. The selected articles, resulting from the inclusion and exclusion criteria, highlighted 17 miRNA families. Of these, 9 families were concordant in results in more than one article, reaffirming the results of implantation and non-implantation. A review of the literature analyzed potential targets and effects of these microRNAs, determining that the miR-99a-5p subtype and the miR-199 family correlate with implantation, while the let-7 and miR-515 families and the miR-519d-3p subtype correlate with implantation failure. The reaffirmation of the expression patterns of these 9 microRNA families as potential biomarkers for the implantation process may contribute to the development of new non-invasive blastocyst analysis protocols for transfer in assisted reproduction and improve implantation success rates.

Keywords: microRNA; embryo; nidation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem microscópica de um blastocisto (148 μm) e seus componentes no quinto dia de desenvolvimento.

Figura 2. Processo das três fases da implantação embrionária, aposição, adesão e invasão.

Figura 3. Diálogo molecular entre blastocisto, pelas células trofoblásticas, e o epitélio endométrio.

Figura 4. A biogênese do miRNA e os diversos complexos com proteínas que se formam ao longo da maturação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA (RHA)	16
1.2 DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTAÇÃO	18
1.3 A COMUNICAÇÃO MOLECULAR ENTRE BLASTOCISTO- ENDOMÉTRIO	19
1.4 OS MEIOS DE CULTIVO	21
1.5 FASES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	22
1.6 NOVA ERA: TÉCNICAS NÃO-INVASIVAS DE QUALIFICAÇÃO PARA IMPLANTAÇÃO	25
1.7 miRNA.....	26
2. OBJETIVO	30
3. CONTEXTUALIZAÇÃO	31
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	32
5 CONCLUSÃO	52
ANEXO A.....	63
ANEXO B.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Ácido Hialurônico
ASH	Albumina Sérica Humana
BL	Blastocele
cfDNA	do inglês “ <i>circulating cell-free DNA</i> ”, DNA livre circulante
EBOV	do inglês “ <i>Ebolavirus</i> ”, vírus ebola
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
HIV	do inglês “ <i>Human Immunodeficiency Virus</i> ”, vírus da imunodeficiência humana
HPV	do inglês “ <i>Human Papillomavirus</i> ”, papilomavírus humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IST	Infecções Sexualmente Transmissíveis
MCB	Meios de Cultivo de Blastocisto
MCI	Massa Celular Interna ou embrioblasto
MV	Microvesículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
RHA	Reprodução Humana Assistida
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
RISC	do inglês “ <i>RNA-induced silencing complex</i> ”, Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
SBF	Soro Bovino Fetal
SisEmbrio	Sistema Nacional de Produção de Embriões
SUS	Sistema Único de Saúde
TE	Trofoblasto, Trofotoderma, Trofoectoderma,
VE	Vesículas Extracelulares
XIAP	do inglês “ <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> ”, Inibidor Ligado ao X da Proteína de Apoptose
ZIKV	do inglês “ <i>Zika Virus</i> ”, vírus Zika
ZP	Zona Pelúcida

1. INTRODUÇÃO

1.1 REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA (RHA)

Em 2021, estima-se que 55.000.818 homens e 110.089.459 mulheres viviam com infertilidade em todo o mundo. Aproximadamente 1.820,6 casos por 100.000 habitantes (1,8%) para homens e 3.713,2 casos por 100.000 habitantes (3,7%) para mulheres. A infertilidade afetou principalmente mulheres e a faixa etária de 35 a 39 anos (LIANG *et al.*, 2025). No Brasil, as mulheres estão decidindo ter seus primeiros filhos cada vez mais tarde, segundo nova pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2024), o que pode aumentar os números de infertilidade. Em 2024, 55.962 ciclos de reprodução humana assistida (RHA) foram realizados no Brasil, e foram registradas 867 gravidezes clínicas em pacientes maiores de 35 anos, mais que o dobro das gravidezes em pacientes menores de 35 anos (ANVISA, 2024). Em 2021, a fila de espera no SUS para consulta ginecológica para infertilidade era de aproximadamente 400 usuários por mês, e o tempo de espera passava de 200 dias (ENTRINGER *et al.*, 2023).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, 278 mil casais enfrentam infertilidade no Brasil, o que equivale a 15% do total de casais em idade reprodutiva (WHO, 2023). Cerca de 20 a 30% dos casos de infertilidade são devidos à infertilidade masculina, 20 a 35% à infertilidade feminina e 25 a 40% a problemas combinados em ambos os sexos. Em 10 a 20% dos casos, nenhuma causa é encontrada, chamada causa idiopática (MATTEO, 2023). Algumas das principais causas da infertilidade feminina são disfunções hormonais como Síndrome de Ovários Policísticos, obesidade, distúrbios da tireoide e insuficiência ovariana, causas imunológicas, além de alterações anatômicas como miomas, pólipos endometriais, aderências intrauterinas, anomalias uterinas, tubárias e adenomiose. (KANWAL *et al.*, 2022; SALAMA; SMITH, 2023; GU *et al.*, 2024). Fatores tubários e peritoneais são frequentes, geralmente causados por Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). IST causadas por *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma genitalium* são uma causa comum de doença inflamatória pélvica que pode levar à infertilidade por fator tubário (SMOLARCZYK *et al.*, 2021). A infertilidade masculina pode ser multifatorial e causada por anomalias urogenitais, adquiridas ou congênitas, câncer, infecções do trato genital, anomalias genéticas, insuficiência testicular, distúrbios endócrinos, fatores imunológicos e doenças sistêmicas (BHATTACHARYA

et al., 2024; ASSIDI, 2022). Muitos vírus podem ser detectados no sêmen, incluindo aqueles que causam infecções agudas como ZIKV (do inglês “*Zika Virus*”, vírus Zika) e EBOV (do inglês “*Ebolavirus*”, vírus ebola), bem como aqueles que causam infecções crônicas como HPV (do inglês “*Human Papillomavirus*”, papilomavírus humano) e HIV (do inglês “*Human Immunodeficiency Virus*”, vírus da imunodeficiência humana). Esses vírus podem potencialmente afetar a qualidade e a fertilidade do sêmen, incluindo infecção direta de espermatozoides ou células germinativas, interrupção das funções testiculares, indução de inflamação do trato reprodutivo e desencadeamento de respostas imunológicas (GUO *et al.*, 2024). Indivíduos infectados com HPV possuem diminuição da motilidade espermática, maior número de morfologia anormal do esperma e maior índice de fragmentação do DNA em comparação com não infectados (MORENO-SEPULVEDA; RAJMIL, 2021).

As técnicas empregadas à fertilização *in vitro* (FIV) estão evoluindo consideravelmente para acompanhar a crescente procura por tratamentos, que nos últimos 40 anos ajudaram em mais de 8 milhões de nascimentos (DYER *et al.*, 2025). Com o aumento da demanda, se tornou essencial o aperfeiçoamento dos sistemas de cultura de blastocistos. Porém, o desenvolvimento de um método mais assertivo, que prevê o potencial de implantação na seleção de blastocistos, continua sendo uma busca no avanço na tecnologia de RA. Os principais desafios enfrentados pela tecnologia em RHA são continuar a aumentar a possibilidade de atendimento, como a aplicabilidade por meio de mais financiamento social e expandir o atendimento a populações não tradicionais e marginalizadas em todos os países, especialmente países de baixa e média renda, onde o acesso é atualmente limitado (ADAMSON *et al.*, 2023).

Dados apontam que a RHA é praticada em mais de 100 países em todo o mundo (FADDY *et al.*, 2018). Os ciclos de RHA relatados aumentaram de aproximadamente 140 mil em 1991 para mais de 3,2 milhões em 2018. Isso inclui mais de 1 milhão de ciclos relatados pela China em 2018 (ADAMSON *et al.*, 2023). Dados da 13ª edição do relatório do Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio) indicam que a taxa média de sucesso na fecundação (oócitos fecundados com formação de 2 pró núcleos, em relação à oócitos inseminados) na RHA no Brasil é de 76% (ANVISA, 2020).

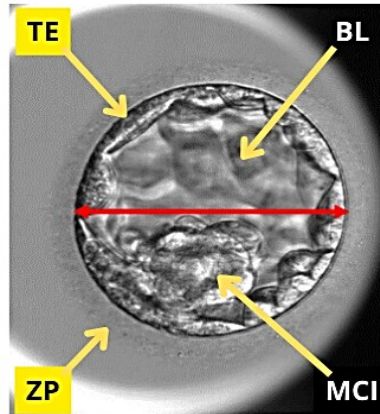
1.2 DESENVOLVIMENTO PRÉ-IMPLANTAÇÃO

Naturalmente, o oócito quando é liberado do ovário é deslocado pelas fímbrias para as tubas uterinas, onde ocorre a fertilização. O desenvolvimento humano começa com a formação do zigoto, que apresenta clivagem para formar o embrião e os tecidos extraembrionários. Até o estágio de 8 células, o desenvolvimento é impulsionado principalmente por fatores herdados do oócito. No entanto, a ativação da transcrição embrionária entre os estágios de 4 e 8 células marca o início da regulação do desenvolvimento pelos genes das próprias células embrionárias e especialização dos destinos celulares. Posteriormente há a compactação dessas células que leva à formação da mórula. Há a organização de células epiteliais polarizadas do trofoblasto, também chamado de trofoectoderma ou trofectoderma (TE), enquanto as células de Massa Celular Interna (MCI) permanecem não polarizadas. Um fluido é produzido pelos blastômeros, iniciando a formação da cavidade blastocele. Nesse momento, **no quinto dia**, o desenvolvimento atinge o estágio inicial de blastocisto. Enquanto o blastocisto se desloca através das tubas uterinas para o útero, ele passa por vários movimentos de colapso e expansão dentro da zona pelúcida (ZP), para enfim o blastocisto eclodir da ZP e estar pronto para implantação, compreendendo cerca de 200 células (figura 1) (GILBERT; BARRESI, 2017). No blastocisto tardio, as células do MCI passam a se diferenciar em células epiblasticas e hipoblasticas. As células epiblasticas são as células pluripotentes que produzem os tecidos embrionários, enquanto as células hipoblasticas dão origem ao endoderma extraembrionário do saco vitelino (COCKERELL *et al.*, 2023).

Geralmente os protocolos de FIV requerem a aspiração de oócitos em metáfase II, coleta e preparação seminal, a fertilização, o cultivo de zigotos até a fase de blastocisto em meios de cultivo e a transferência dos blastocistos selecionados para o útero, preferencialmente na fase inicial. A escolha dos zigotos é baseada em uma série de elementos, como presença e qualidade de dois pro-núcleos (do espermatozoide e do oócito) no estágio pró-nuclear do zigoto; durante o período de clivagem e formação do blastocisto é avaliado o número de blastômeros, como são chamadas as células nessa fase; porcentagem de fragmentação dos blastômeros; no estágio de blastocisto se verifica o grau de expansão da blastocele e a qualidade da MCI, também chamada de embrioblasto; a qualidade do TE e a possível degeneração

das células e análise de ploidias por testes genéticos (CAPALBO *et al.*, 2016; PIERSON *et al.*, 2023).

Figura 1. Imagem microscópica de um blastocisto e seus componentes no quinto dia de desenvolvimento, antes da eclosão do blastocisto da ZP.



Fonte: adaptado de SCIORIO *et al.* (2021). Legenda: Microfotografia de blastocisto com raio de (148 µm) indicado pela seta vermelha . As setas amarelas indicam BL: blastocelo; MCI: massa celular interna; TE: trofoblasto; ZP: zona pelúcida.

1.3 A COMUNICAÇÃO MOLECULAR ENTRE BLASTOCISTO-ENDOMÉTRIO

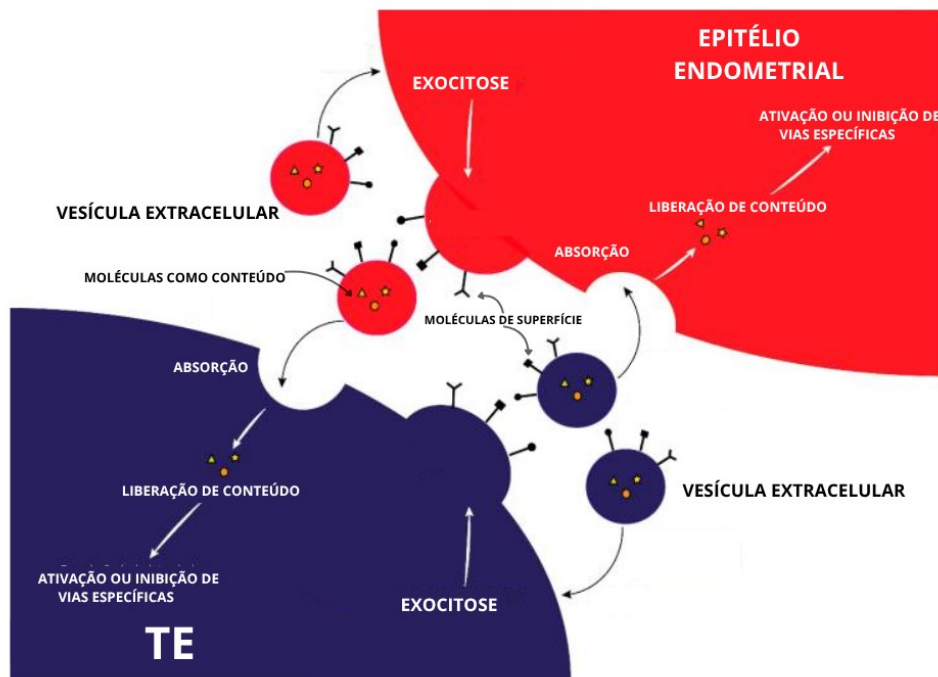
Vesículas extracelulares (VE) são pequenas estruturas ligadas à membrana que são secretadas pela maioria das células e transportam e entregam biomoléculas importantes para outras células (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). O conteúdo de VE pode ser heterogênea, contendo uma combinação variada de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e açúcares, sugerindo que VE funcionam como mensageiras moleculares (YÁÑEZ-MÓ *et al.*, 2015). Os três principais subtipos de VE são microvesículas (MV), exossomos e corpos apoptóticos, que são diferenciados com base em sua biogênese, vias de liberação, tamanho, conteúdo e função (DOYLE; WANG, 2019). MV são vesículas de tamanho de 100 nm a 1 µm e são liberadas do brotamento da membrana plasmática, enquanto os exossomos são muito menores que as MV (40 a 120 nm), e se originam no compartimento endossômico que se incorpora no endossomo inicial ao tardio e nos corpos multivesiculares que são liberados por fusão com a membrana plasmática como exossomos.

Sobre o papel de mensageiro molecular de VE, é sugerido que quando secretadas pelas células epiteliais endometriais maternas, VE são internalizadas por

blastocistos e, interessante, transportam miRNAs que têm importância moduladora de processos biológicos relacionados a eventos de implantação e desenvolvimento embrionário inicial (SEGURA-BENITEZ *et al.*, 2022). O diálogo molecular entre blastocisto e endométrio tem participação de integrinas, enzimas degradadoras de matriz, citocinas e quimosinas, que são produzidas em resposta aos hormônios esteroides ovarianos para permitir a adesão celular, modular a resposta imune local e regular a expressão gênica no blastocisto (Figura 3) (ANDRONICO *et al.*, 2019).

Blastocistos humanos, obtidos a partir de ciclos de FIV, são capazes de secretar exossomos e microvesículas em meio de cultura e foi demonstrado que VE embrionárias são absorvidas por células endometriais (SAADELDIN; OH; LEE, 2015). É proposto que, enquanto o blastocisto está na cavidade uterina antes da implantação, ele empacota miRNAs regulatórios em VE, que posteriormente são absorvidas pelas células endometriais, alterando sua função, e assim preparando-as para a implantação (ASHARY; TIWARI; MODI, 2018).

Figura 3. Diálogo molecular entre blastocisto, pelas células trofoblásticas, e o epitélio endométrio.



Fonte: legendas adaptadas de ANDRONICO *et al.*, (2019).

Legenda: Blastocistos são capazes de secretar VE, como exossomos e microvesículas, que são absorvidas por células endometriais. O inverso também acontece, VE são secretadas pelas células epiteliais endometriais e são internalizadas por blastocistos humanos. VE transportam diversas moléculas, entre elas o miRNA.

1.4 OS MEIOS DE CULTIVO

Na FIV, os blastocistos são desenvolvidos em meios de cultivo que tentam imitar as condições ambientais *in vivo*. Os meios de cultivo são compostos por sais, tampão (bicarbonato de sódio), substratos energéticos, aminoácidos, quelante, antibiótico e indicador de pH. Há a possibilidade de blastocistos serem cultivados em diferentes condições de cultivo, com diferentes macromoléculas e fontes de proteína. Junto a isso, atualmente há uma grande variedade de meios de cultivo disponíveis no mercado. Uma vez que os meios não podem ser patenteados, a exata concentração dos componentes dos meios não é divulgada pelos fabricantes, por segredo comercial (MORBECK *et al.*, 2014; SCIORIO; RINALDO, 2023).

No entanto, é interessante ressaltar que todos os meios de cultivo contêm piruvato, lactato e glicose como substratos energéticos, fontes de carboidratos (GRUBER; KLEIN, 2011). A glicose é precursora para a síntese de inúmeras biomoléculas, como ácidos nucleicos, carboidratos complexos, fosfolipídios, glicoproteínas e lipídios (GRUBER; KLEIN, 2011). Tanto os aminoácidos essenciais quanto os não essenciais favorecem o crescimento da MCI, enquanto os aminoácidos não essenciais promovem a estimulação do TE e a eclosão da ZP (KRISHER; SCHLENKER, 2019). Em substituição ao Soro Bovino Fetal (SBF) utilizado por anos, há a adição de Albumina Sérica Humana (ASH) como fonte de macromoléculas em meios de cultura (SENA-NETTO *et al.*, 2020). A adição minimiza a aderência dos gametas e dos embriões aos consumíveis e estabiliza as membranas citoplasmáticas, fornece uma fonte de nitrogênio, tampão de pH, quelante e ajuda a estabilizar o citoesqueleto das células após a criopreservação (MORBECK, BAUMANN e OGLESBEE, 2017).

Porém, é importante apontar que um estudo comparativo em bovinos indicou que a falta do SBF priva os embriões da exposição a um grande número de proteínas e biomoléculas importantes que seriam encontrados naturalmente nas tubas uterinas e no útero, como miRNAs e lipídios, encontrados no fluido uterino ou como

parte da carga de VE (TRÍBULO *et al.*, 2019; CAÑÓN-BELTRÁN *et al.*, 2021). Estudos demonstram que VE podem ser aditivos promissores para melhorar a eficácia dos meios de cultura (CANÓN-BELTRÁN *et al.*, 2021).

O ácido hialurônico (AH), um composto de aderência, é frequentemente adicionado aos meios de cultura. O AH é naturalmente detectado no fluido uterino. O AH desempenha potencialmente uma função crucial no aumento da adesão dos blastocistos à superfície endometrial, facilitando assim a invasão do TE e a circulação materna para a formação da placenta pelas células maternas e do blastocisto (RASHKI GHALENO *et al.*, 2024). O uso de AH pode diminuir ligeiramente a taxa de aborto espontâneo. Em grupos com baixa chance de gravidez, como idade avançada ou falhas prévias, o uso de AH triplicou a chance de gravidez (HEYMANN *et al.*, 2020).

A concentração de oxigênio no trato reprodutivo feminino de mamíferos varia entre 2 e 8% (NG *et al.*, 2018). Então as práticas atuais para sistemas de cultura recomendam que as incubadoras, que mantêm os oócitos e os blastocistos em desenvolvimento, estejam a 5% de oxigênio (CHEN *et al.*, 2023). Foram explorados os benefícios de suplementar antioxidantes nos meios de cultura, o que reduziu os processos biológicos alterados por genes diferencialmente expressos (TRUONG; HARVEY; GARDNER, 2022).

O óleo de parafina ou o óleo mineral leve serve como um tampão direto entre o meio e o ar, e reduz a evaporação do meio de cultivo, o que pode alterar a osmolaridade (ELDER; VAN DEN BERGH; WOODWARD, 2015). Em contrapartida, tóxicos presentes no petróleo bruto, como hidrocarbonetos insaturados, peróxidos, zinco e outros compostos podem contaminar o óleo (MORBECK; LEONARD, 2012).

Por fim, é ideal que os meios de cultivo tenham a mínima manipulação para evitar inconsistências no crescimento e no potencial de desenvolvimento das células embrionárias no processo da FIV (COY, ROMAR, ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, 2022).

1.5 FASES DA IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA

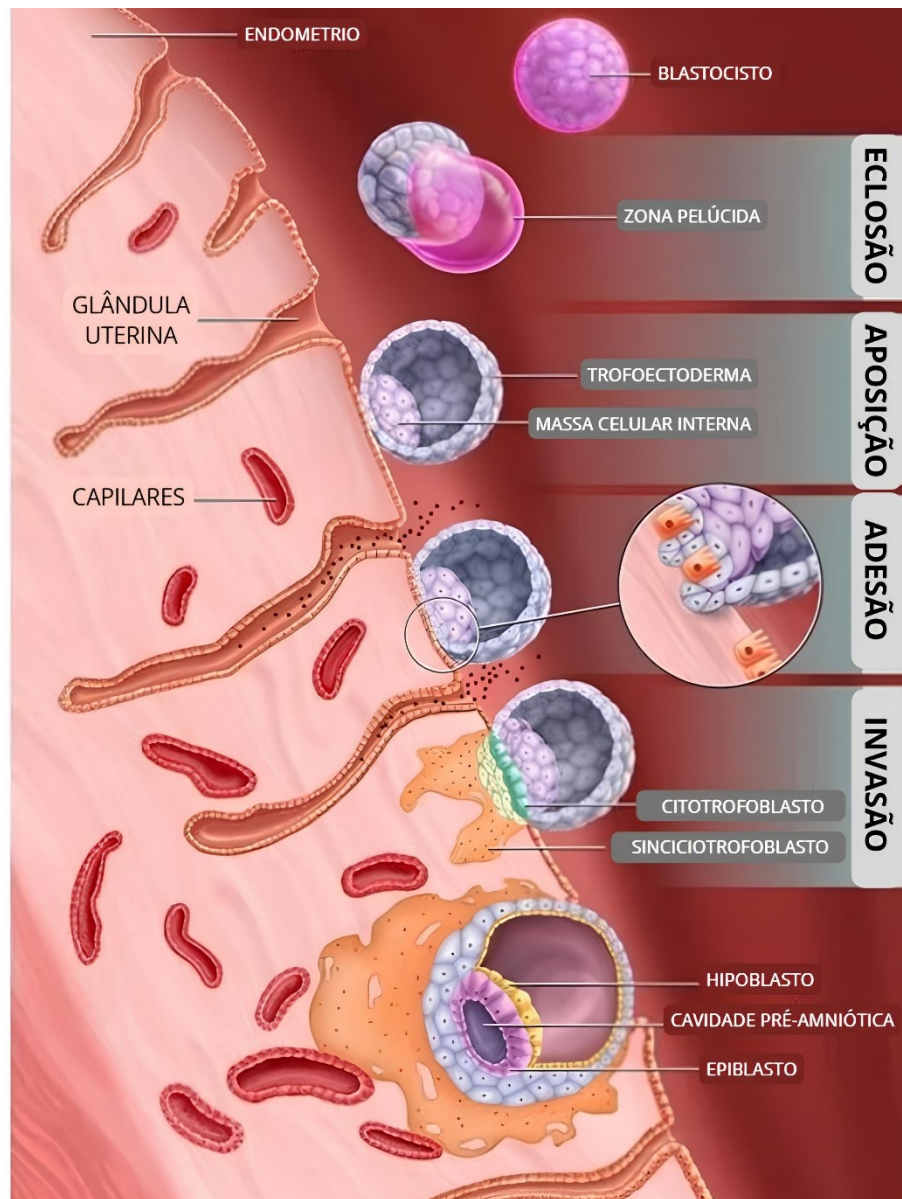
A implantação precisa de comunicação mútua entre o blastocisto e o endométrio, enviando e recebendo sinais, o que envolve fatores genéticos, que devem

ser executados dentro de uma janela temporal (KURIAN; MODI, 2019). O processo de implantação começa com a perda de a zona pelúcida no estágio de blastocisto, conhecida como eclosão, que ocorre entre 5 à 7 dias após a fertilização (figura 2). No próximo estágio, o blastocisto entra em contato com o local de implantação do endométrio, processo denominado de aposição (KIM; KIM, 2017). As células do TE se ligam ao epitélio endometrial receptivo, no processo de adesão, enquanto as células estromais do endométrio ao redor do blastocisto se diferenciam em células decíduais, por meio de um processo conhecido como decidualização (MASSIMIANI *et al.*, 2019). A decidualização é o processo de intensa remodelação tecidual que transforma o endométrio em um tecido dinâmico, a decídua, capaz de acomodar a placenta em rápida expansão no início da gravidez (BORTOLETTO; PRABHU; BAKER, 2022). A decidualização é caracterizada pela diferenciação de fibroblastos endometriais em células decíduais, pela extensa remodelação da matriz extracelular do estroma endometrial e pela angiogênese, formando uma extensa rede de vasos sanguíneos que serve como suprimento nutricional para o embrião e remodelação dos vasos durante a placentação (FAVARO; ABRAHAMSOHN; ZORN, 2014). A adesão celular do blastocisto, TE e células endometriais luminiais epiteliais do útero é mediada por moléculas de adesão celular, como integrinas e caderinas (ACHACHE; REVEL, 2006; SHARMA; KUMAR, 2012).

No processo de implantação há ainda a etapa de invasão, na qual as células trofoblásticas atravessam a membrana basal epitelial endometrial e invadem o estroma endometrial. O processo de implantação permite que as células trofoblásticas invadam e migrem para a decídua (APLIN; RUANE, 2017). No local de implantação, o TE passa a se diferenciar em citotrofoblasto e sua subsequente diferenciação em sinciciotrofoblasto multinucleado. O sinciciotrofoblasto forma uma camada superficial que cobre a superfície das vilosidades placentárias e separa completamente o sangue materno da circulação fetal (LI *et al.*, 2023).

Blastocistos podem criar um ambiente uterino favorável, facilitando a implantação bem-sucedida (BROSENS *et al.*, 2014). No entanto, blastocistos de qualidade abaixo do ideal causam alterações anormais no ambiente endometrial e levam à falha de implantação (XIONG *et al.*, 2024).

Figura 2. Processo das três fases da implantação embrionária, aposição, adesão e invasão.



Fonte: adaptada de OJOSNEGROS *et al.* (2021).

Legenda: A eclusão ocorre na cavidade uterina em preparação para a implantação. Na aposição ocorre o contato com o local de implantação do endométrio. Na adesão, as células trofoblásticas do blastocisto se ligam ao epitélio endometrial receptivo, processo mediado por moléculas de adesão celular, como integrinas e caderinas. No processo de invasão as células trofoblásticas invasivas atravessam a membrana basal epitelial endometrial e invadem o estroma endometrial. As células trofoblásticas passam a se diferenciar em citotrofoblasto e depois em sinciciotrofoblasto multinucleado, que desempenha funções biológicas no âmbito materno-fetal. As células do MCI passam a se diferenciar em células epiblasticas e hipoblasticas. As células epiblasticas produzem os tecidos fetais, enquanto as células hipoblasticas dão origem ao endoderma extraembrionário.

Ao investigar as razões de distúrbios do processo de implantação embrionária, estudos apontam que a decidualização alterada pode ser um fator causal relevante para uma variedade de problemas clínicos envolvendo implantação (HUNKAPILLER *et al.*, 2011; BEZEMER *et al.*, 2020). Observações em tentantes (pessoas que estão buscando a gravidez) que tiveram múltiplas tentativas frustradas de FIV com falha recorrente de implantação, mesmo com blastocistos de boa qualidade sugerem, que em pelo menos alguns casos, é uma consequência clínica de alterações na decidualização (MOUSTAFA; YOUNG, 2020). Há ainda, evidências experimentais e clínicas que sugerem que a decidualização inadequada pode ser responsável por casos de perda gestacional recorrente (LUCAS *et al.*, 2020; PIRTEA *et al.*, 2021). Visto que células estromais endometriais humanas decidualizadas de mulheres com recorrência de perda gestacional não são capazes de discriminar a qualidade do embrião e podem apresentar uma resposta inflamatória prolongada e desordenada, ao contrário do que ocorre com células obtidas de mulheres normalmente férteis (WEIMAR *et al.*, 2012; SALKER *et al.*, 2012).

Evidências sugerem que uma decidualização defeituosa ou desordenada pode ser uma anormalidade comum que acompanha alterações que causam a pré-eclâmpsia (TURCO; MOFFETT, 2019). No mais, outras complicações da gravidez avançada, como a restrição do crescimento fetal, o natimorto sem causas aparentes, a prematuridade, o descolamento prematuro da placenta e a placenta acreta, que ultrapassa o endométrio, invadindo o miométrio, podem ter como causa a falha de um processo de implantação apropriadamente funcional (EROL *et al.*, 2024; TURCO; MOFFETT, 2019; APLÍN *et al.*, 2020; BEZEMER *et al.*, 2020). Pois essa má funcionalidade é capaz de comprometer o suprimento de nutrientes e oxigênio ao feto (hipóxia placentária) e problemas na formação da placenta podem afetar gravemente a formação deste órgão, resultando em insuficiência placentária (BEZEMER *et al.*, 2020).

1.6 NOVA ERA: TÉCNICAS NÃO-INVASIVAS DE QUALIFICAÇÃO PARA IMPLANTAÇÃO

Além da avaliação morfológica convencional, há outros métodos invasivos e não invasivos para seleção de blastocistos, como testes genéticos pré-implantação, morfocinética, proteômica, metabolômica (SALLAM; SALLAM; SALLAM, 2016).

Alguns substratos presentes no meio de cultivo são consumidos pelo blastocisto em formação (individualmente isolados), enquanto outros metabólitos são secretados, sendo potenciais métodos não invasivos de avaliação da qualidade da fase pré-embriônica e seleção de blastocistos (SALLAM; SALLAM; SALLAM, 2016). Estes incluem substratos e produtos do metabolismo de carboidratos, renovação de aminoácidos, medição do fragmento s-HLA-G (Antígeno Leucocitário Humano G solúvel), β HCG (beta gonadotrofina coriônica humana), fragmento de haptoglobina- α -1, leptina, ubiquitina e concentrações de fator de ativação plaquetária, consumo de oxigênio e medição do estresse oxidativo no meio de cultivo (SALLAM; SALLAM; SALLAM, 2016; ANAGNOSTOPOULOU *et al.*, 2022).

Há pesquisas que se concentraram na análise do DNA livre circulante (cfDNA) no estágio de blastocisto, captados na blastocele ou no meio de cultivo de blastocistos (MCB), para determinar o status genético do blastocisto de forma não invasiva, buscando sua aplicação em testes não invasivos para doença monogênica e aneuploidias cromossômicas (KAKOIROU *et al.*, 2022). Foi demonstrado que mais de 96% dos miRNAs presentes nos meios de cultura originam-se do TE e podem ser detectados consistentemente após a formação do blastocisto em condições de cultura de FIV (CAPALBO *et al.*, 2016).

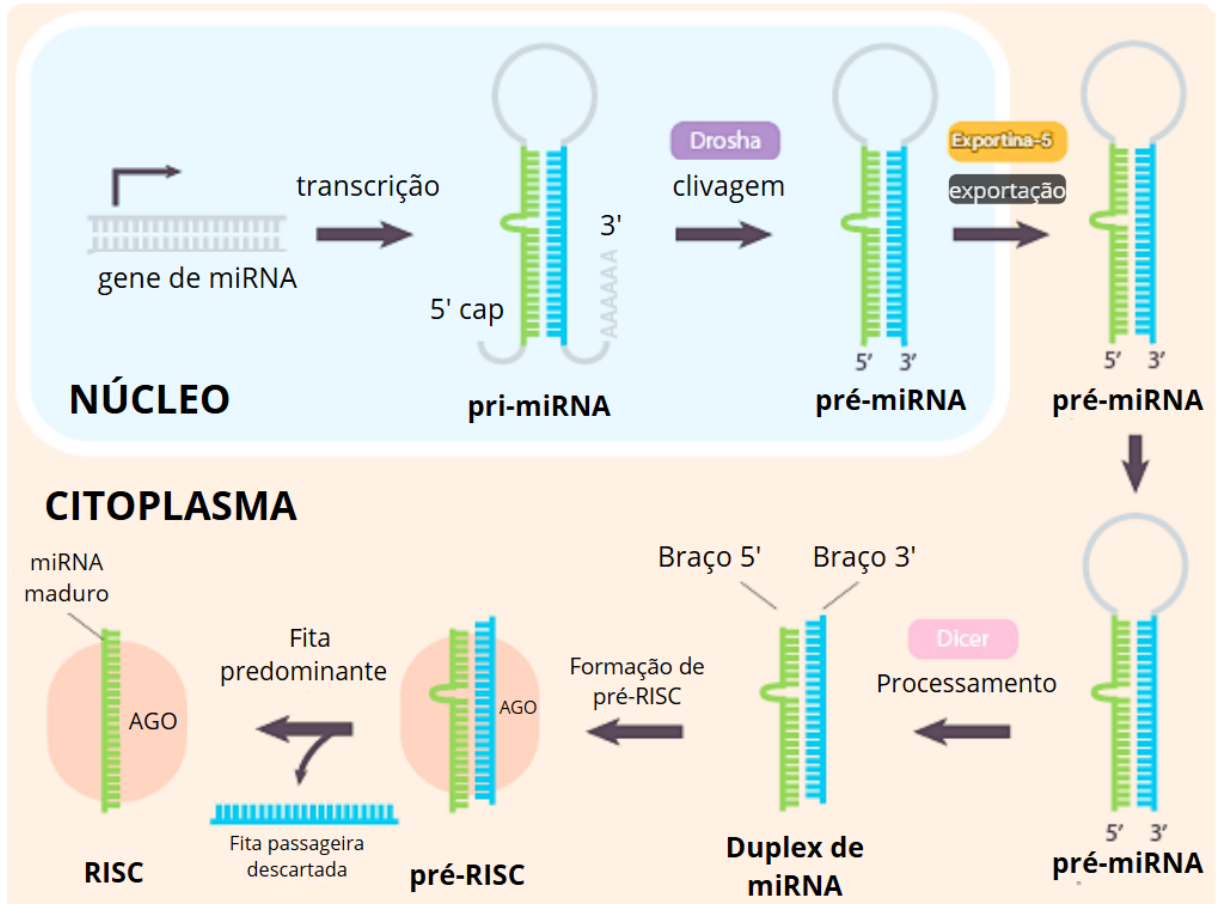
1.7 miRNA

O conhecimento descrito anteriormente, aliado às proposições e descobertas colaboram para a exploração de miRNAs, especialmente na RHA. E para entender o papel dessas moléculas na RHA, é importante destacar os miRNAs são pequenas moléculas de 18 a 24 nucleotídeos de RNA não codificadoras, e atuam para regular a expressão gênica tanto negativamente, por clivagem de mRNAs ou desadenilação. O miRISC, ao se ligar ao mRNA alvo, recruta o complexo desadenilase CCR4-NOT. Este complexo, que contém proteínas como CCR4 e CAF1, encurta a cauda poli(A) do mRNA alvo. A desadenilação é a primeira etapa na degradação do mRNA. Os miRNAs também podem ser agentes da regulação positiva dos genes através da ligação direta ao DNA da região promotora de genes-alvo e recrutamento de modificadores de histonas. Essa ligação pode recrutar ativadores transcricionais ou alterar a estrutura da cromatina para tornar o gene mais acessível

à transcrição. Um exemplo é o miR-617, que se liga ao promotor do DDX27 em células de câncer oral, levando ao aumento da expressão de DDX27 e efeitos subsequentes nas características do câncer (PAUL; SADEK; MAHESAN, 2019; PLACE et al., 2008; WU; FAN; BELASCO, 2006).

Para o processo de silenciamento dos mRNAs, que é a regulação por miRNAs mais abordada em exemplificações, a biogênese dos miRNA, de forma resumida, se inicia com a transcrição de um pri-miRNA, essa molécula possui estrutura em alça, reconhecida pelo complexo de RNase III Drosha e DGCR8 capaz de clivá-la e, posteriormente translocada para o citoplasma pela Exportina 5. Fora do núcleo celular o pré-miRNA sofre um segundo evento de clivagem, mediado pela RNase III Dicer e seu cofator TRBP, formando um pequeno duplex de RNA que é montado em uma proteína argonauta (AGO) (CREUGNY; FENDER; PFEFFER, 2018). Uma das fitas do duplex fica retida e se torna o miRNA maduro, a fita guia (*guide strand*), enquanto a outra, a fita passageira (*passenger strand*) geralmente é degradada (Figura 4) (BARTEL, 2004; YANG et al., 2011). A proteína AGO carregada com um miRNA, forma o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC, do termo em inglês "*RNA-induced silencing complex*"), que desliza no mRNA e ao encontrar uma sequência correspondente se emparelha as bases de forma imperfeita com as regiões 3' não traduzidas (3' UTRs) dos mRNA, de onde geram inibição e desestabilização da tradução do mRNA (CREUGNY; FENDER; PFEFFER, 2018; DUCHAINE; FABIAN, 2019). miRNAs têm sido propostos como biomarcadores não invasivos para diagnósticos clínicos, já que a desregulação dos miRNAs tem sido associada ao desenvolvimento de doenças, incluindo infecções virais, distúrbios do sistema nervoso, distúrbios cardiovasculares, diabetes e câncer (KOSAKA; IGUCHI; OCHIYA, 2010; LAWRIE et al., 2008; YANG et al., 2020).

Figura 4. A biogênese do miRNA e os diversos complexos com proteínas que se formam ao longo da maturação.



Fonte: adaptado de ABM GOOD, (2025).

Legenda: A biogênese dos miRNAs começa com a transcrição do pri-miRNA, que é clivado pela enzima Drosha no núcleo e exportado para o citoplasma pela Exportina 5. No citoplasma, o pré-miRNA é novamente clivado pela enzima Dicer, formando um duplex de fitas de RNA. Uma das fitas é incorporada à proteína AGO, originando o miRNA maduro, enquanto a outra é degradada. O miRNA associado à AGO forma o complexo RISC, que se liga a sequências-alvo de mRNA para inibir sua tradução.

É necessário entender como a nomenclatura dos miRNAs é estabelecida, já que diversas vezes podem ser encontrados distintos miRNAs com pequenas diferenças na nomenclatura, que podem tornar confuso um entendimento. A partir disso, os *loci* genômicos que codificam miRNAs bem como os pre-miRNAs são abreviados usando o prefixo *mir*, para referir-se ao transcrito maduro, deve-se usar a grafia com a letra "R" em maiúsculo, miR. Ambas designações são seguidas de um hífen e um único número de identificação, sendo, portanto, *mir-#* e *miR-#*, respectivamente (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee e Ambros, 2001).

Alguns genes de miRNAs apresentam várias cópias parálogas (que têm origem comum, mas que divergiram entre si) no genoma. Quando tais parálogos originam sequências maduras idênticas, acrescenta-se mais um hífen e mais um número. Dessa forma, as formas maduras são nomeadas, por exemplo, miR-#-1, miR-#-2. Outros genes de miRNAs expressam sequências maduras não-idênticas, mas muito similares (homólogas). Nesse caso, usa-se o mesmo número e adiciona-se uma letra minúscula, sendo assim: mir-#a, mir-#b, enquanto as respectivas formas maduras são miR-#a, miR-#b (GRIFFITHS-JONES et al., 2006; KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019;).

No miRBase (<https://mirbase.org>), a numeração dos miRNAs segue uma ordem sequencial. Por exemplo, se neste momento o mir-9500 é o último da lista dos miRNAs humanos, indica-se que o próximo a ser descoberto deverá ser nomeado como mir-9501. Após a ação da enzima Dicer, forma-se um duplex RNA-RNA. Ambas as fitas do duplex podem se ligar ao RISC e ser funcionais, ainda que uma possa predominar sobre a outra, como visto na figura 3 (BARTEL, 2004; YANG *et al.*, 2011). Assim, passou-se a adotar os sufixos “-5p” ou “-3p” para indicar a extremidade do pré-miRNA da qual se origina a fita. Por exemplo, miR-133a-5p é originado da porção 5’ do pré-miRNA precursor e miR-133a-3p tem origem na porção 3’ do pré-miRNA precursor (NUNES, 2015).

2. OBJETIVO

Neste estudo, o objetivo geral foi identificar, através da análise da literatura científica, os padrões de expressão de miRNAs secretados por blastocistos em meios de cultura provenientes de técnicas de reprodução assistida, e averiguar seus padrões de expressão, bem como, a associação desses padrões ao sucesso ou falha da implantação no endométrio.

3. CONTEXTUALIZAÇÃO

Neste manuscrito, é pretendido fornecer uma revisão abrangente da literatura atual relacionada à possibilidade de aplicação de miRNAs exocitados pelo blastocisto no MCB, como biomarcador do êxito ou fracasso da implantação do blastocisto no endométrio, em meio a tecnologias de RA utilizadas nas clínicas de assistência à fertilização. Estudos relevantes, que em total foram publicados em língua inglesa, foram identificados na literatura recente, usando blocos de palavras-chave em bancos de dados das áreas da saúde e filtrando sua importância pelo método de revisão de escopo. Todas as publicações relevantes até janeiro de 2025 foram avaliadas criticamente e discutidas. Fornecendo assim informações como quais miRNAs são encontrados e quais seus padrões de presença no ambiente de comunicação blastocisto-endométrio. miRNAs vêm sendo cada vez mais investigados em pesquisas experimentais de *coorte*, como é descrito neste presente estudo. As pesquisas que foram apresentadas são relativamente recentes, já que o primeiro artigo que ajudou com seus resultados é de 2014, mas os dados na literatura são bastante promissores e a pesquisa nessa área está avançando rapidamente. Ademais, entende-se que as maiores correlações, com fatores parentais, não puderam ser feitas pela falta de informações nos artigos que não são padronizados. Considerando aspectos culturais, técnicos e jurídicos, miRNAs extracelulares provenientes do blastocisto, mas que estão presentes em material de descarte como o MCB, podem ser sugeridos como valiosos biomarcadores não invasivos para a avaliação da viabilidade do blastocisto e receptividade endometrial.

4 ARTIGO CIENTÍFICO



POTENTIAL miRNAs AS PROGNOSTIC BIOMARKERS FOR HUMAN BLASTOCYST IMPLANTATION: a review

Jessica Cavalcante dos Santos de Paiva^a, Maria Anicia Junckes^a Yara Costa Netto Muniz^a, Evelise Maria Nazari^a

^aDepartment of Cell Biology, Embryology and Genetics, Center for Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

Importance: Molecular communication occurs between the blastocyst and the endometrium during the embryo implantation process. By studying miRNAs from blastocyst culture media associated with implanted and non-implanted blastocysts, researchers aim to identify patterns that could improve the prediction of implantation outcomes without the need for invasive methods.

Objective: We reviewed human experimental studies that used clinical samples from Assisted Human Reproduction procedures and included cohorts with positive or negative pregnancy outcomes. Our goal was to correlate possible miRNA expression patterns that may have contributed to the success or failure of blastocyst implantation in the endometrium and to identify promising biomarkers.

Evidence Review: Of the 3,399 articles initially retrieved from various databases, thirteen met all inclusion criteria after detailed analysis. All studies shared a common methodology involving total miRNA extraction from blastocyst culture media followed by RT-qPCR analysis.

Findings: After screening, eighteen miRNAs families were identified repeatedly. Nine miRNA families appeared in more than one study, reaffirming consistent correlations with implantation outcomes. miR-26, miR-99, and miR-199 were highly expressed in implanted blastocyst groups, whereas let-7, miR-182, miR-372, miR-515, miR-518, and miR-519 were highly expressed in non-implanted blastocysts. We related these findings to their known targets and roles in the endometrium and implantation process as described in the literature.

Conclusion: This review suggests a broad range of miRNAs as promising biomarkers for embryo implantation. The miRNA families most strongly associated with implantation outcomes were miR-199, miR-515, miR-519, and let-7.

Relevance: The validation of effective biomarkers and the development of clinical protocols using miRNAs from blastocyst culture media have great potential to optimize blastocyst selection for transfer in in vitro fertilization and to improve implantation success rates.

Keywords: miRNA, blastocyst, implantation, assisted reproduction.

INTRODUCTION

According to the standard *in vitro* fertilization (IVF) protocol, zygotes are cultivated until the blastocyst stage and the selected blastocysts are transferred to the uterus. The quality of the transferred blastocysts is a factor that contributes to establishing the success of IVF treatment cycles. Among several methods of evaluating blastocysts, there is the classic Gardner classification system, which qualifies three characteristics of blastocyst morphology: expansion of the blastocoele (BL); the amount of cells forming the trophectoderm (TE); and the compaction of the inner cell mass (ICM) (1,2). The expansion status of blastocysts is rated from 1 to 6. 1: to early stage, BL has less than half the blastocyst volume; 2: BL is greater than or equal to half the volume; 3: BL completely fills it; 4: blastocyst is expanded, with thinned zona pellucida; 5: process of hatching (blastocyst is escaping from the zona pellucida), with TE starting to herniate; 6: hatched blastocyst. The ICM and TE are graded A to C. ICM is A: tightly packed with many cells; B: loosely grouped, several cells; C: few cells. TE is A: many cells, tight epithelium; B: fewer cells; C: very few cells, loose epithelium. Blastocyst morphology is expressed as a number plus two letters (e.g., 5AB) (3,4).

To reach successful implantation, the uterus must undergo structural and functional remodeling and become receptive (5). Estrogen and progesterone are the main hormones mediating these changes. In the proliferative (follicular) phase, estrogen increases due to the growth of ovarian follicles, leading to proliferation of the endometrial epithelium, stroma and vascular endothelium (6). In eighty-five percent of all failed conceptions are explained by pre-embryos that fail to implant or are lost shortly after implantation (7). Many subfertility, what generally describes any form of reduced fertility with prolonged time of unwanted non-conception, have been overcome with the use of IVF treatments, although average live birth rates after IVF are still only about 30% per blastocyst transferred (8). This low efficiency is due to the fact that blastocysts do not implant in natural pregnancies and because the physiology of some IVF patients prevents pregnancy, despite repeated transfers of good-quality euploid blastocysts (9). In assisted reproduction, factors such as female age, blastocyst quality and chromosomal composition, endometrial receptivity, the state of the female immune system and the method of blastocyst transfer are also important for the implantation process (10).

The process of implantation of the blastocyst in the uterus consists of three stages: apposition, the phase in which the blastocyst hatches from the zona pellucida and establishes contact with the endometrium. Apposition involves molecules on the surface of the blastocyst and the endometrial epithelium; adhesion, when the trophoblast cells of the blastocyst attach to the receptive endometrial epithelium, this attachment strengthens the adhesion during the attachment phase, and there is an intense exchange of molecules between the blastocyst and the endometrium, which induces the upregulation of endometrial surface receptors and the secretion of signaling molecules and hormones (11); and invasion, which occurs when signaling molecules influence the differentiation of the trophoblast into cytotrophoblast and syncytiotrophoblast layers while invading the stromal endometrium. The inner cell mass then initiates the process of embryonic development, which begins with the differentiation of the hypoblast and epiblast (12).

No technique is widely applied to analyze the molecular signals involved in blastocyst-uterus interaction. Biological markers to predict embryonic and uterine reproductive competence may increase pregnancy rates. Transcriptome and proteome analyses of human blastocysts and their relationship to pregnancy outcomes are progressing (13). Multiple molecules may be involved in cellular communication, thus participating in the regulation of implantation (14,15). Some of these analyses include microRNAs (miRNAs), which are most studied for their presence in body fluids and circulating in the blood, as well as for their secretion by cells in culture (16,17). To act in intercellular communication, miRNAs can be secreted by cells via extracellular vesicles such as exosomes, apoptotic bodies, bound to lipids or complex proteins (17). miRNAs are detected in blastocyst culture media (BCM) derived from human IVF blastocysts and exhibit unique expression profiles associated with chromosomal status and pre-embryonic development (15). The non-invasiveness of BCM analysis and the evidence that blastocyst genetic material can be detected and analyzed from this medium make this IVF waste product an important source for investigations aimed at improving blastocyst selection (18). By studying miRNAs associated with implanted blastocysts and comparing them with blastocysts that did not implant, researchers have sought to identify patterns that can predict implantation outcome (19,20).

In this study we aim to correlate possible miRNAs patterns exocytosed from blastocysts, with evident presence in BCM, that may contribute to the success or failure of blastocyst implantation in the endometrium, and thus indicate promising biomarkers, through human experimental studies with clinical samples from AHR procedures that comprised a cohort with positive or negative pregnancy results.

MATERIALS AND METHODS

Search

A preliminary search of the National Library of Medicine (PubMed) was performed to establish sentinel articles that could support possible answers to the scoping review question. Four articles compared miRNAs patterns in discarded BCM from implanted versus non-implanted blastocysts, indicated by the results of pregnancy confirmation tests (19,21,22,23). Second, acronyms and their respective synonyms were formulated in MeSH and the ideal databases were chosen for the present research. This step was necessary to ensure that the keywords could be found in all databases. Finally, the following search strategy (builder) was used in PubMed (table 1), and builders were constructed with the same terms in the databases EMBASE (Periódicos Capes), Lilacs, Medline, Scielo, Scopus (Periódicos Capes), Google Scholar, Web of Science (Periódicos Capes) until January 30, 2025.

Table 1

Database	Builder
PubMed	"Blastocyst"[MeSH Terms] OR "Blastocysts"[All Fields] OR "Embryo, Preimplantation"[All Fields] OR "Embryos, Preimplantation"[All Fields] OR "Preimplantation Embryo"[All Fields] OR "Preimplantation Embryos"[All Fields] AND "Implantation"[MeSH Terms] OR "Embryo Implantation"[All Fields] OR "Embryo Implantations"[All Fields] OR "Implantation, Embryo"[All Fields] OR "Implantations, Embryo"[All Fields] OR "Implantation, Blastocyst"[All Fields] OR "Blastocyst Implantations"[All Fields] OR "Implantations, Blastocyst"[All Fields] OR "Blastocyst Implantation"[All Fields] OR "Ovum Implantation"[All Fields] OR "Implantation, Ovum"[All Fields] OR "Implantations, Ovum"[All Fields] OR "Ovum Implantations"[All Fields] OR "Nidation"[All Fields] OR "Nidations"[All Fields] OR "Decidual Cell Reaction"[All Fields] OR "Decidual Cell Reactions"[All Fields] AND "MicroRNA"[MeSH Terms] OR "MicroRNAs"[All Fields] OR "miRNAs"[All Fields] OR "Micro RNA"[All Fields] OR "RNA, Micro"[All Fields] OR "miRNA"[All Fields] OR "Primary MicroRNA"[All Fields] OR "MicroRNA, Primary"[All Fields] OR "Primary miRNA"[All Fields] OR "miRNA, Primary"[All Fields] OR "pri-miRNA"[All Fields] OR "pri miRNA"[All Fields] OR "RNA, Small Temporal"[All Fields] OR "Temporal RNA, Small"[All Fields] OR "stRNA"[All Fields] OR "Small Temporal RNA"[All Fields] OR "pre-miRNA"[All Fields] OR "pre miRNA"[All Fields]
814 results	
30/01/2025	

Search Key Building Block Example.

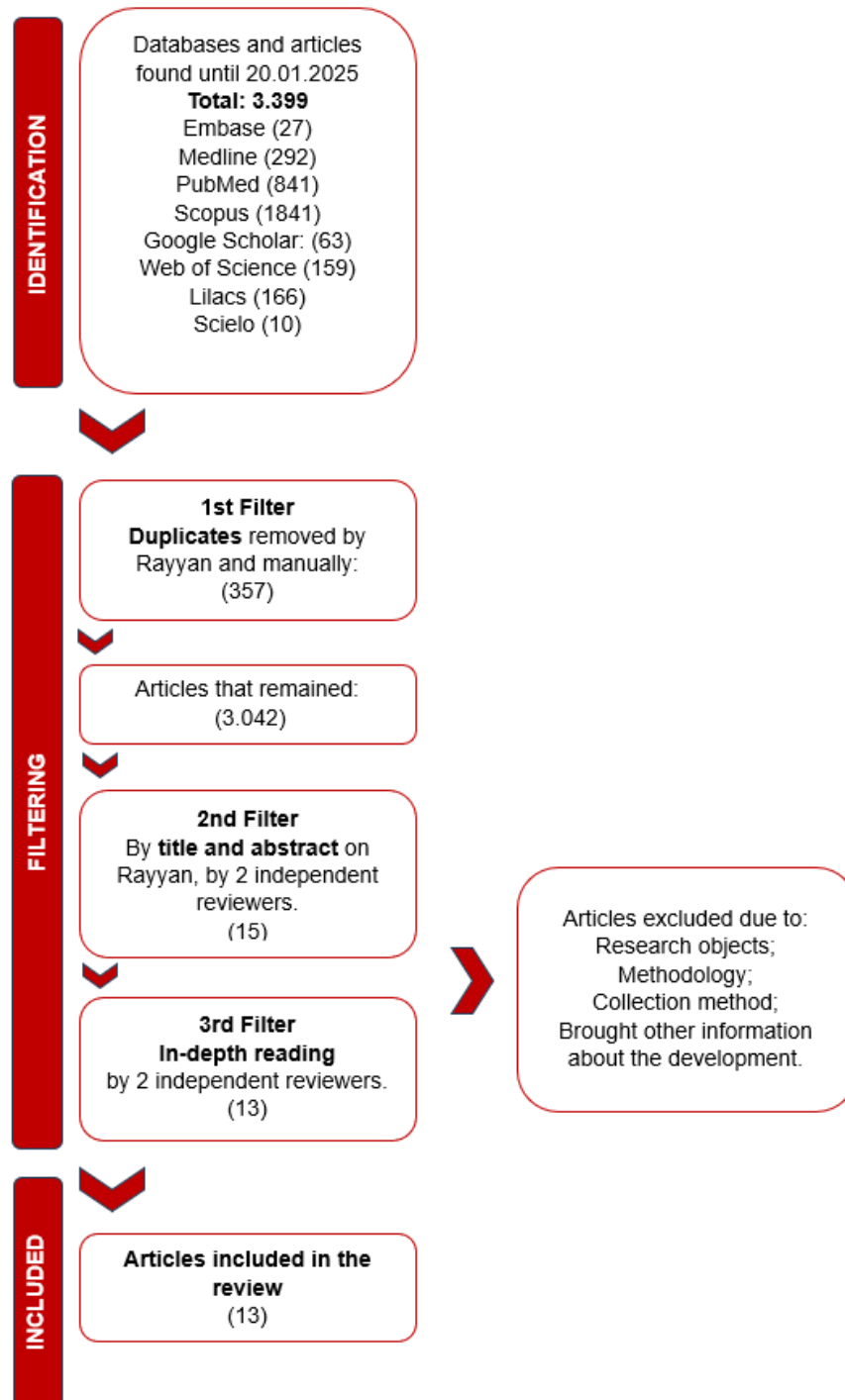
Evidence source selection and eligibility criteria

Original research articles published between January 2014 and January 2025 were included in this review because the earliest article found in the databases on miRNAs released by blastocysts related to implantation outcomes was published in 2014 (22). All available titles and abstracts were independently screened for eligibility in the review by two reviewers (J.C.S.P. and M.A.J.) using Rayyan (<https://rayyan.ai>). Any discrepancies were resolved by in-depth reading, discussion, and subsequent consensus. Selected publications were screened in full text by one reviewer (J.C.S.P.) and assessed for relevance and congruence with the aim and research question of this review.

The presence of sentinel articles was checked in the total of 3,399 articles collected from all databases. The selection of articles went through 3 filtering steps. The first filter was the manual exclusion of duplicates using the Rayyan program. The second filter was the inclusion or exclusion by title and abstract, to verify that the topic of this research was being related. The third filter was an in-depth reading of the articles to verify whether they provided results for the question of this present research.

Specific reasons why the articles did not pass the screening, for not listing evidence for the search for this research: diverse research objects such as research with embryonic and endometrial extracellular microvesicles; endometrial genes; conceptus stage (here referring to the blastocyst already implanted). Articles that did not have the methodology sought in this research: review; secondary study; research on animals; cell line method. Articles that did not collect miRNAs from BCM: endometrial miRNA; oocyte miRNAs; sperm miRNAs; blastocyst lysis; miscellaneous collection (not BCM). Articles that explored other miRNAs information collected as quality of pre-embryonic development. In the end, 13 articles passed all filtering and were included in the scoping review (figure 1).

Figure 1



Flowchart of the selection and screening process of included articles. Of the 15 articles to be analyzed in full, 2 did not provide evidence for the search for miRNAs exocytosed by the blastocyst in the culture medium that were related to the embryonic implantation process. Regarding those excluded in the final phase, an analysis was performed comparing culture media of blastocysts considered to be of high and low quality due to morphological and fragmentation characteristics. Implantation and pregnancy results were not included. In the other, the morphokinetic differences of the blastocyst and other information correlated with viable and non-viable blastocysts were evaluated, without discussing implantation.

Data mapping process

A form was developed (Supplementary materials) by the reviewing investigator to assess the contributions of the studies according to the objectives, blastocyst information, infertility factors and age of the trying to conceive (TTC) individuals, BCM used, methodologies employed, reported results and considerations.

RESULTS

All the included studies used in their methodologies the total extraction of miRNAs from MCB and subsequent RT-qPCR process. With the results, a variety of analyses of inclusion and exclusion were applied. From the included articles 17 miRNA families appeared repeatedly: let-7, miR-16, miR-19, miR-24, miR-26, miR-30, miR-99, miR-182, miR-191, miR-199, miR-320, miR-515, miR-517, miR-518, miR-519, miR-371, miR-372. Among them, 8 miRNAs families have controversial results, that is, in some articles they appear upregulated in BCM of blastocysts that implanted (table 2), in other research they are upregulated in BCM of blastocysts that did not implant, or even downregulated in BCM of blastocysts that implanted (table 3).

Table 2

FAMILY	miRNAs UPREGULATED IN IMPLANTED GROUP	REF.	miRNAs UPREGULATED IN NOT IMPLANTED GROUP	REF.
miR-16	miR-16-5p	18	miR-16-5p	26
miR-19	miR-19b-3p	18	miR-19a-3p	18
miR-24	miR-24-2-5p	19	miR-24-1-5p	24
miR-30	miR-30c	21	miR-30e-5p	26
miR-191	miR-191-5p	24	miR-191	22
miR-320	miR-320a	25	miR-320a	26
			miR-320b	26
miR-371	miR-371a-5p	18	miR-371a-5p	19
			miR-371a-3p	18
miR-517	miR-517a-3p	18	miR-517c-3p	18

miRNA families that appear upregulated in both groups of BCM of implanted and non-implanted blastocysts. Article 22 does not describe the miR-191 subtype.

The 9 most promising miRNAs families founded are: miR-26, miR-99; miR-199; let-7; miR-182; miR-372; miR-515; miR-518; miR-519. Among these families,

the miRNAs subtypes that appear in more than one research related to equal implantation results are miR-99a-5p, upregulated in positive results (18,27), miR-518a-3p upregulated in negative results (18,19) and miR-519d-3p, upregulated in negative results (18,30), as we can see in Table 3.

Table 3

FAMILY	CONCORDANT miRNAs WITH POSITIVE IMPLANTATION	REF.	FAMILY	CONCORDANT miRNAs WITH NEGATIVE IMPLANTATION	REF.
miR-26	miR-26b-3p	19	let-7	let-7b-3p	19
	miR-26b-5p	19		let-7c-5	26
miR-99	miR-99a-5p	18	miR-182	miR-182-5p	18
	miR-99a-5p	27		miR-182-3p	19
miR-199	miR-199a-3p	27	miR-372	miR-372	19
	miR-199b-3p	27		miR-372	22
	miR-199a-5p	27		miR-372-3p	30
			miR-515	miR-515-3p	18
				miR-515-5p	19
			miR-518	miR-518a-3p	18
				miR-518a-3p	19
				miR-518c-3p	19
			miR-519	miR-519d-3p	18
				miR-519d-3p	30

Subtypes of the same miRNA families showing expression patterns observed more than once and with concordant consequences on implantation success or failure. Articles 19 and 22 did not specify the miR-372 subtypes. Discordant subtypes were found, these are: miR-26b-5p and miR-29b downregulated in positive group (28,29). miR-518f-5p and miR-372-3p upregulated in positive group (18).

Some miRNAs appeared in relatively unusual situations, compared with the others showed in the results of the articles used in this review. In one of the filtered articles, miR-634 was the only finding and correlated with the outcome of samples of successful blastocyst implantation (31). In only one other article was miR-142-3p found to have a significant increase in expression in a group of non-implantation blastocysts (23). Cuman et al. draw attention to miR-661, as being the miRNAs with the highest

expression in the group of non-implantation blastocysts, but this miRNA did not appear in the discussions of other studies (19). Distinctly, miR-26b-5p is upregulated in the implantation-positive group (19), but also downregulated in another study with the other group of implantation-positive samples (28). One miRNA that did not make it to the final list of these promising biomarkers is miR-223, which is upregulated in groups of samples that were positive for implantation (29). However, it was not included in the final list, as miR-223-3p and miR-223-5p were both characterized with high expression in culture media of embryos with poor morphological and fragmentation quality (32). In addition to the result being controversial, embryo quality was an exclusion criterion, as it did not specifically respond to our search.

Further findings obtained in these articles that reached the end of the screening are the sample discrepancy (BCM) analyzed, where we found from 5 to 162 samples. The number of miRNAs identified and discussed in the analysis of the studies, which range from 1 to 41 (Supplementary material). Maternal age was not disclosed by most studies. Not all studies reported parental factors due to the search for reproductive assistance, but maternal factors were presented, such as tubal, ovulation, subfertility and female infertility, perimenopause, poorly described male factors and idiopathic causes. Interestingly, the articles present different methods for confirming pregnancies, and these confirmations subjectively imply the result of the implantation, which is not necessarily correlated since there is the clinical picture of recurrent implantation failure, which does not reach sufficient development to be reported as pregnancy loss. Among the 13 studies included, 5 did not report which implantation confirmation method they used and 1 study considered implantation confirmation only in the count of pregnancies that resulted in birth. Furthermore, culture media such as Continuous single culture media (Irvine Scientific), G-2 PLUS (Vitrolife) and SAGE 1-Step (Origio) were the media used in the samples that brought the most promising results (table 4).

Table 4

# of blastocysts	# miRNA	Parental factor	Pregnancy	BCM	References
60	29	-	live birth	Non-sequential, Continuous single culture media (Irvine Scientific)	18
8	41	tubal, ovulation, male aetiology	pregnancy carried to term >36w	-	19
5	7	-	cardiac activity beyond 20w	Sequential, Quinn's Advantage Blastocyst Medium (Cooper Surgical) + HSA	21
28	3	-	-	Sequential, IVC-Three (In VitroCare) + HSA	22
36	1	-	-	Non-sequential, Global® (LifeGlobal)	23
50	2	infertile females	ultrasound at 14d	Sequential, G-1 PLUS (Vitrolife)	24
96	1	premenopause	-	Sequential, Quinn's advantage blastocyst medium (Cooper Surgical) + HSA	25
60	8	-	fetal heart-beat at \geq 8w	Non-sequential, SAGE 1-Step (Origio)	26
8	6	-	ultrasound after 7w	Sequential, G-2 PLUS (Vitrolife)	27
30	2	-	-	Sequential, G-2 PLUS (Vitrolife)	28
50	4	idiopathic infertility	ultrasound and fetal heart-beat at \geq 7w	Non-sequential, SAGE 1-Step (Origio)	29
162	2	tubal obstruction and/or male factors	fetal heart-beat at \geq 8w	Sequential, G-2 PLUS (Vitrolife)	30
56	1	subfertile females	-	Non-sequential, Continuous Single Culture® Medium (Irvine Scientific)	31

Differences found in the cohort studies of the selected articles of the review, showing discrepancies in samples and miRNAs analyzed, lack of parental information and standardization in BCM used.

DISCUSSION

After investigation and filtering of evidence, it became clear that since the work of Rosenbluth et al. (22), studies investigating the importance of miRNAs as possible promising biomarkers are still rare. It is noticeable that various sample information, inclusion and exclusion criteria, as well as methodologies and conclusions are diverse and often conflicting. It is interesting to point out that not all studies reported relevant information that could be correlated with miRNAs patterns, such as the age of the TTC patients or infertility factors. The characteristics of the blastocyst alone are not a guarantee of pregnancy; it is necessary to be aware of the parental factors of infertility that led the TTC to seek assisted reproduction. TTC individuals with compromised endometrial receptivity, whether due to a medical condition or low progesterone levels, are important to consider in reproduction laboratories.

The confirmation of implantation was established in several ways in the studies selected for this research. It is important to standardize, since bringing a pregnancy to term requires several factors, and clearly, not only the characteristics of the blastocyst or its expression patterns are sufficient to be responsible or related. Confirmation of implantation itself, when the beginning of development of the embryo and extra-embryonic membranes is verified, should ideally be confirmed by the Human Chorionic Gonadotropin (beta-HCG, or β -hCG) test 14 days after the blastocyst transfer. During pregnancy, hCG is produced mainly by syncytiotrophoblast cells. The release of hCG into the maternal circulation begins with implantation of the blastocyst and approximately 20% is excreted in the urine (33).

Blastocysts can be cultured under different culture conditions, with different macromolecules and protein sources. There are a variety of culture media available on the market. This diversity of parameters can affect the quality of embryonic development. Since the media cannot be patented, the exact concentration of the media components is not disclosed by the manufacturers, due to trade secrecy (34). However, Continuous single culture media (Irvine Scientific, USA) and SAGE 1-Step (Origio), and the sequential medium G2-PLUS (Vitrolife, Gothenburg, Sweden), were the culture media that correlated with the most relevant results sought in this research. It is interesting to note that in two studies, the laboratories used Human Serum Albumin

(HSA) supplementation to replace the Fetal Bovine Serum (FBS) used for years. HSA, or even FBS, is a source of macromolecules in culture media (35). Supplementation, among other benefits, stabilizes cytoplasmic membranes, provides a source of nitrogen, pH buffer, and helps stabilize the cytoskeleton of cells after cryopreservation during heating (36,37). In the articles that had more promising results on miRNAs patterns, we observed the non-use of this supplementation (18,19,26,27,29,30).

Despite miR-223 did not make the final list, it was found upregulated in samples from pregnancy-positive groups, a previous study in mice reported that miR-223 decreases the gene expression of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) which maintains cell growth and when its levels fall the cells differentiate, thus there is the formation of pinopods, which are a formation of uterine protrusions in the endometrium that are associated with a type of secretory mechanism to nourish the blastocyst at the time of implantation, and affects the implantation process (38,39,40).

This review showed that miR-26b-5p was found upregulated in group of implanted blastocysts, but also founded downregulated in positive implanted group (19,28). miR-26a-5p is a homologue that was related to inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA), which promotes angiogenesis and consequently trophoblast invasion (46). The relation between the miR-99 family and the embryonic implantation process has not yet been described, but downregulation of miR-99a-5p and miR-99b-5p has been correlated with several targets, such as Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1R), and Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (FGFR3), which consequently inhibited cell migration, proliferation, and invasion processes (45).

Regarding miR-199 family, mmu-miR-199a-5p was observed to silence the self-renewal of mouse embryonic stem cells (41). Compared to an in vivo fertilized group, downregulated miR-199a-5p in IVF blastocysts was responsible for the lower developmental potential and subsequent viability (42). ssc-miR-199a-5p is suggested to have a crucial role for implantation when investigating the miRNAome of the endometrium of pregnant and non-pregnant groups in pigs (43). mmu-miR-199a is differentially expressed in the uterus of mice during implantation, inhibiting the

expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2), a local inflammation mediator that has increased expression during menstruation (44).

let-7 is commonly associated with endometrial receptivity. Integrin- β 3, a known implantation-related molecule, has been shown to be a target of let-7a, and forced expression in mouse blastocysts decreased the number of implantations (52). Integrins are transmembrane glycoproteins present in the plasma membrane, playing key roles in signaling, maintenance of epithelial polarity, and progression of placental cytotrophoblast development. Indeed, these proteins are some of the best characterized biomarkers of uterine receptivity, and their roles in implantation have been extensively reviewed (53).

Upregulation of miR-182-5p, miR-182-5p, correlated with the upregulation of Regulator of calcineurin 1 (RCAN1) weaken the inhibitory effect on cell proliferation, migration, invasion, and cell cycle progression (51). miR-372 family, upregulated in 3 of the 4 studies in non-implanted blastocyst samples, is part of the miR-371-373 family. These miRNAs are also expressed in undifferentiated cells and placenta, thus possibly involved in the establishment and progression of a pregnancy (50). miR-515-5p suppresses trophoblast cell invasion and proliferation in patients with preeclampsia by affecting the expression of X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), leading to reduced epithelial-mesenchymal transition (49). miR-518a-3p was not found in studies that relate targets in endometrium. miR-519d-3p is a suppressor of trophoblast cell invasion and migration (47,48), which demonstrates the importance of this miRNA being upregulated in BCM of non-implanted blastocysts.

CONCLUSION

In this review, which used cohort studies with MCB samples from AR clinics in several countries, it was possible to correlate 9 miRNAs families with successful or unsuccessful blastocyst implantation outcomes, and these families are considered promising biomarkers. The understanding of how miRNAs patterns affect implantation is being elucidated with an increasing number of studies in this area. Relating the results, given that they were identified at least twice and their targets and effects have already been described in the literature, the miRNA families most corresponding to the implantation results were the miR-99a-5p subtype, the miR-199

family, the miR-515 family, the miR-519d-3p subtype, and the let-7 family. Therefore, a future study focused on the promising miRNAs found in this review is justified, in order to confirm the correlations of these specific miRNAs patterns with the implantation outcomes showed here. The use of effective biomarkers and the development of protocols using miRNAs of BCM for use in clinical practice have great potential to optimize the selection of blastocysts for transfer in IVF and improve implantation success rates.

CRedit Authorship Contribution Statement

Jessica Cavalcante dos Santos de Paiva contributed to the conceptualization, methodology, investigation, and writing. Maria Anicia Junckes contributed to the methodology, review, and data curation. Yara Costa Netto Muniz contributed to the conceptualization, supervision, validation, and administration of the project. Evelise Maria Nazari contributed to the conceptualization, acquisition of funding, supervision, validation, and administration of the project.

Declaration of Interests

J.C.S.P. reports support from a scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). Has nothing to disclose. M.A.J. has nothing to disclose. Y.C.N.M. has nothing to disclose. E.M.N. has nothing to disclose.

References

1. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Janson R, Mortimer D, editors. *Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond*. Carnforth: Parthenon Press; 1999. p. 378-88.
2. Rocha JC, Passalia F, Matos FD, Maserati MP Jr, Alves MF, Almeida TG, et al. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: how far we are from the gold standard? *JBRA Assist Reprod*. 2016;20(3):150-8.
3. Wirleitner B, Schuff M, Stecher A, Murtinger M, Vanderzwalmen P. Pregnancy and birth outcomes following fresh or vitrified embryo transfer according to blastocyst

- morphology and expansion stage, and culturing strategy for delayed development. *Hum Reprod.* 2016;31(8):1685-95.
4. Pierson HE, Invik J, Meriano J, Pierson RA. A novel system for rapid conversion of Gardner embryo grades to linear scale numeric variables. *Reprod Biomed Online.* 2023;46:808-18.
 5. Kim SM, Kim JS. A review of mechanisms of implantation. *Dev Reprod.* 2017;21(4):351-9.
 6. Cha J, Sun X, Dey SK. Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med.* 2012;18(12):1754-67.
 7. Kolte AM, Bernardi LA, Christiansen OB, Quenby S, Farquharson RG, Goddijn M, et al. Terminology for pregnancy loss prior to viability: a consensus statement from the ESHRE early pregnancy special interest group. *Hum Reprod.* 2015;30(3):495–8.
 8. Pandian Z, Gibreel A, Bhattacharya S. In vitro fertilisation for unexplained subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;(11):CD003357.
 9. Coughlan C, Ledger W, Wang Q, Liu F, Demirel A, Gurgan T, et al. Recurrent implantation failure: definition and management. *Reprod Biomed Online.* 2014;28(1):14-38.
 10. Fragouli E, Mantzouratou A. Endometrial receptivity: miRNAs signing in? *Fertil Steril.* 2021;116:78-9.
 11. Kurian NK, Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36(2):189-98.
 12. Ojosnegros S, Seriola A, Godeau AL, Veiga A. Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. *Hum Reprod Update.* 2021;27(3):501-30.
 13. Hernández-Vargas P, Muñoz M, Domínguez F. Identifying biomarkers for predicting successful embryo implantation: applying single to multi-omics to improve reproductive outcomes. *Hum Reprod Update.* 2020;26:264-301.

14. Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev.* 2004;25:341-73.
15. Liang J, Wang S, Wang Z. Role of microRNAs in embryo implantation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15:1-11.
16. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci.* 2010;101:2087-92.
17. Paul ABM, Sadek ST, Mahesan AM. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. *J Assist Reprod Genet.* 2019;36:179-87.
18. Cimadomo D, Rienzi L, Giancani A, Alviggi E, Dusi L, Canipari R, et al. Definition and validation of a custom protocol to detect miRNAs in the spent media after blastocyst culture: searching for biomarkers of implantation. *Hum Reprod.* 2019;34:1746-61.
19. Cuman C, Sinderena MV, Gantierc MP, Rainczuka R, Sorbya K, Rombautsb L, et al. Human blastocyst secreted microRNA regulate endometrial epithelial cell adhesion. *EBioMedicine.* 2015;2:1528-35.
20. Zhou W, Dimitriadis E. Secreted microRNA to predict embryo implantation outcome: from research to clinical diagnostic application. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:1-10.
21. Capalbo A, Ubaldi FM, Cimadomo D, Noli L, Khalaf Y, Farcomeni A, et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. *Fertil Steril.* 2016;105(1):225-35.e1-3.
22. Rosenbluth EM, Shelton DN, Wells LM, Sparks AET, Voorhis BJV. Human embryos secrete microRNAs into culture media—a potential biomarker for implantation. *Fertil Steril.* 2014;101:1493-500.
23. Borges E Jr, Setti AS, Braga DP, Geraldo MV, Figueira RC, Iaconelli A Jr. miR-142-3p as a biomarker of blastocyst implantation failure: a pilot study. *JBRA Assist Reprod.* 2016;20(4):200-5.

24. Acuña-González RJ, Olvera-Valencia M, López-Canales JS, Hernández-Campos ME, Velasco I, Segura NA, et al. MiR-191-5p is upregulated in culture media of implanted human embryo on day fifth of development. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021;19:109.
25. Berkhout RP, Keijser R, Repping S, Lambalk CB, Afink GB, Mastenbroek S, et al. High-quality human preimplantation embryos stimulate endometrial stromal cell migration via secretion of microRNA hsa-miR-320a. *Hum Reprod.* 2020;35(8):1797-807.
26. Kamijo S, Hamatani T, Sasaki H, Yagi S, Sugiura-Ogasawara M. MicroRNAs secreted by human preimplantation embryos and IVF outcome. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022;20:130.
27. Wang S, Chen L, Zhu Y, Jiang W. Characterization of microRNAs in spent culture medium associated with human embryo quality and development. *Ann Transl Med.* 2021;9:1648.
28. Fang F, Li Z, Yu J, Long Y, Zhao Q, Ding X, et al. MicroRNAs secreted by human embryos could be potential biomarkers for clinical outcomes of assisted reproductive technology. *J Adv Res.* 2021;31:25-34.
29. Eivazi S, Tanhaye Kalate Sabz F, Amiri S, Zandieh Z, Bakhtiyari M, Rashidi M, et al. MiRNAs secreted by human blastocysts could be potential gene expression regulators during implantation. *Mol Biol Rep.* 2023;50(2):1375-83.
30. Wang X, Miao S, Lu L, Yuan J, Pan S, Wu X. miR-519d-3p released by human blastocysts negatively regulates endometrial epithelial cell adhesion by targeting HIF1 α . *Int J Mol Med.* 2022;50:123-37.
31. Abu-Halima M, Häusler S, Backes C, Keller A, Meese E, Merscher MB, et al. Micro-ribonucleic acids and extracellular vesicles repertoire in the spent culture media is altered in women undergoing in vitro fertilization. *Sci Rep.* 2017;7:13525.

32. Xiong Y, Shi L, Zhang M, Zheng L, Liu J, Wei H, et al. Differential expression of tsRNAs and miRNAs in embryo culture medium: potential impact on embryo implantation. *J Assist Reprod Genet.* 2024;41:781-93.
33. Larraín D, Caradeux J. β -Human chorionic gonadotropin dynamics in early gestational events: a practical and updated reappraisal. *Obstet Gynecol Int.* 2024;2024:8351132.
34. Sciorio R, Rinaudo P. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. *J Assist Reprod Genet.* 2023;40:2591–607.
35. Sena-Netto SB, Sprícigo JFW, Leme LO, Guimarães ALS, Caixeta FMC, Dode MAN, et al. The replacement of fetal bovine serum with bovine serum albumin during oocyte maturation and embryo culture does not improve blastocyst quality after slow freezing cryopreservation. *Biopreserv Biobank.* 2020;18(3):171–9.
36. Gardner DK. Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics. *Reprod Fertil Dev.* 2007;20:9–18.
37. Morbeck DE, Baumann NA, Oglesbee D. Composition of single-step media used for human embryo culture. *Fertil Steril.* 2017;107(4):1055–60.e1.
38. Nicola NA, Babon JJ. Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(5):533–44.
39. Dong X, Sui C, Huang K, Wang L, Hu D, Xiong T, et al. MicroRNA-223-3p suppresses leukemia inhibitory factor expression and pinopodes formation during embryo implantation in mice. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):1155–63.
40. Quinn KE, Matson BC, Wetendorf M, Caron KM. Pinopodes: recent advancements, current perspectives, and future directions. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;501:110644.
41. Wang Y, Melton C, Li YP, Shenoy A, Zhang XX, Subramanyam D, et al. miR-294/miR-302 promotes proliferation, suppresses G1-S restriction point, and inhibits ESC differentiation through separable mechanisms. *Cell Rep.* 2013;4(1):99–109.

42. Tan K, Wang X, Zhang Z, Miao K, Yu Y, An L, et al. Downregulation of miR-199a-5p disrupts the developmental potential of in vitro-fertilized mouse blastocysts. *Biol Reprod.* 2016;95(3):54.
43. Li W, Xi Y, Xue S, Wang Y, Wu L, Liu H, et al. Sequence analysis of microRNAs during pre-implantation between Meishan and Yorkshire pigs. *Gene.* 2018;646:20–7.
44. Zhao X, Hao H, Du W, Zhu H. Effect of vitrification on the microRNA transcriptome in mouse blastocysts. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123451.
45. Wang Y, Huang D, Li M, Yang M. MicroRNA-99 family in cancer: molecular mechanisms for clinical applications. *PeerJ.* 2025;13:e19188.
46. Li C, Li Y, Lu Y, Niu Z, Zhao H, Peng Y, Li M. miR-26 family and its target genes in tumorigenesis and development. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021;157:103124.
47. Xie L, Mouillet JF, Chu T, Parks WT, Sadovsky E, Knöfler M, et al. C19MC microRNAs regulate the migration of human trophoblasts. *Endocrinology.* 2014;155(12):4975–85.
48. Ding J, Huang F, Wu G, Han T, Xu F, Weng D, et al. miR-519d-3p suppresses invasion and migration of trophoblast cells via targeting MMP-2. *PLoS One.* 2015;10(3):e0120321.
49. Nunode M, Hayashi M, Nagayasu Y, Sawada M, Nakamura M, Sano T, et al. miR-515-5p suppresses trophoblast cell invasion and proliferation through XIAP regulation in preeclampsia. *Mol Cell Endocrinol.* 2023;559:111779.
50. Morales-Prieto DM, Ospina-Prieto S, Chaiwangyen W, Schoenleben M, Markert UR. Pregnancy-associated miRNA-clusters. *J Reprod Immunol.* 2013;97(1):51-61.
51. Zheng J, Wu D, Wang L, Qu F, Cheng D, Liu X. mir-182-5p regulates cell growth of liver cancer via targeting RCAN1. *Gastroenterol Res Pract.* 2021;2021:6691305.
52. Liu WM, Pang RT, Cheong AW, Ng EH, Lao K, Lee KF, et al. Involvement of microRNA lethal-7a in the regulation of embryo implantation in mice. *PLoS One.* 2012;7(5):e37039.

53. Chen G, Xin A, Liu Y, Shi C, Chen J, Tang X, et al. Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ are biomarkers of uterine condition for embryo transfer. *J Transl Med.* 2016;14(1):303.

5 CONCLUSÃO

Nesta revisão, que utilizou estudos de *coorte* com amostras de células germinativas de clínicas de fertilização in vitro em diversos países, foi possível correlacionar 9 famílias de miRNAs com resultados de implantação de blastocistos blastocisto, sendo estas, miR-26; miR-99; miR-199, altamente expressos em grupos de blastocistos implantados. let-7; miR-182; miR-372; miR-515; miR-518; miR-519 altamente expressos em blastocistos não implantados. mRNAs envolvidos nos processos moleculares da implantação são conhecidos alvos moleculares dessas famílias de miRNAs. A compreensão de quais padrões de miRNAs se correlacionam com o processo da implantação está sendo elucidada cada vez mais na literatura científica. Relacionando os resultados, visto que foram identificados pelo menos duas vezes e seus alvos e efeitos já foram descritos na literatura, as famílias de miRNAs que mais corresponderam aos resultados de implantação foram o subtipo miR-99a-5p e a família miR-199; e de não-implantação, a família let-7, a família miR-515 e o subtipo miR-519d-3p. É interessante que um futuro estudo experimental com amostras de MCB, os miRNAs promissores encontrados nesta revisão sejam investigados e que esses padrões e correlações com a implantação sejam reafirmados. A utilização de biomarcadores eficazes e o desenvolvimento de protocolos utilizando miRNAs do MCB para uso na prática clínica tem potencial para otimizar a seleção de blastocistos para transferência na FIV e melhorar as taxas de sucesso de implantação.

REFERÊNCIAS

- ABM GOOD. miRNA – microRNA introduction. [S.l.]: ABM Good, [s.d.]. Disponível em: <https://info.abmgood.com/miRNA-microRNA-introduction>. Acesso em: 23 jun. 2025.
- ACHACHE, H.; REVEL, A. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 6, p. 731–746, 2006. DOI: 10.1093/humupd/dml004.
- ADAMSON, G. D.; ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; DYER, S. Global fertility care with assisted reproductive technology. **Fertility and Sterility**, v. 120, n. 3, p. 473-482, 2023. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2023.01.013
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **SisEmbrio – Sistema Nacional de Produção de Embriões**. Publicado em: 25 jul. 2022. Atualizado em: 8 maio 2024.
- ANAGNOSTOPOULOU, C. *et al.* Oocyte quality and embryo selection strategies: a review for the embryologists, by the embryologists. **Panminerva Medica**, v. 64, n. 2, p. 171–184, 2022. DOI: 10.23736/S0031-0808.22.04680-8
- ANDRONICO, F. *et al.* Extracellular vesicles in human oogenesis and implantation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2162, 2019. DOI: 10.3390/ijms20092162
- APLIN, J. D.; RUANE, P. T. Embryo–epithelium interactions during implantation at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 130, n. 1, p. 15–22, 2017. DOI: 10.1242/jcs.188777
- ASHARY, N.; TIWARI, A.; MODI, D. Embryo implantation: war in times of love. **Endocrinology**, v. 159, n. 2, p. 1188–1198, 2018. DOI: 10.1210/en.2017-03082.
- ASSIDI, M. Infertility in men: advances towards a comprehensive and integrative strategy for precision theranostics. **Cells**, v. 11, 2022. DOI: 10.3390/cells11101711
- BARTEL, P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5

BEZEMER, D. *et al.* Trophoblast differentiation, invasion and associated pregnancy disorders: mechanisms and potential therapeutic targets. **Nutrients**, v. 15, n. 3, 2023. DOI: 10.3390/nu15030755

BHATTACHARYA, I.; SHARMA, S.; MAJUMDAR, S. Etiology of male infertility: an update. **Reproductive Sciences**, v. 31, p. 942–965, 2024. DOI: 10.1007/s43032-023-01401-x

BORTOLETTO, P.; PRABHU, M.; BAKER, V. Association between programmed frozen embryo transfer and hypertensive disorders of pregnancy. **Fertility and Sterility**, v. 118, p. 839–848, 2022. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2022.07.025

BROSENS, J. J. *et al.* Uterine selection of human embryos at implantation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 3894, 2014. DOI: 10.1038/srep03894.

CAÑÓN-BELTRÁN, K. *et al.* Isolation, characterization, and microRNA analysis of extracellular vesicles from bovine oviduct and uterine fluids. **Methods in Molecular Biology**, v. 2273, p. 219–238, 2021. DOI: 10.1007/978-1-0716-1246-0_16

CAPALBO, A. *et al.* MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophectoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 1, p. 225–235.e3, 2016. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.014

CHEN, L. *et al.* Oxygen concentration from days 1 to 3 after insemination affects the embryo culture quality, cumulative live birth rate, and perinatal outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 40, n. 11, p. 2609–2618, 2023. DOI: 10.1007/s10815-023-02943-4

COCKERELL, A. *et al.* Modelos biofísicos da embriogênese inicial de mamíferos. **Relatórios de Células-Tronco**, v. 18, n. 1, p. 26–46, 2023. DOI: 10.1016/j.stemcr.2022.11.021

COY, P.; ROMAR, R.; ROMERO-AGUIRREGOMECA, J. The embryo culture media in the era of epigenetics: is it time to go back to nature? **Animal Reproduction**, v. 19, n. 1, 2022. DOI: 10.1590/1984-3143-AR2021-0132

CREUGNY, A.; FENDER, A.; PFEFFER, S. Regulation of primary microRNA processing. **FEBS Letters**, v. 592, n. 12, p. 1980–1996, 2018. DOI: 10.1002/1873-3468.13067

DOYLE, M.; WANG, Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. **Cells**, v. 8, n. 7, p. 727, 2019. DOI: 10.3390/cells8070727

DUCHAINED, T.; FABIAN, M. Insights mecanicistas sobre silenciamento de genes mediados por microRNA. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 3, p. a032771, 2019. DOI: 10.1101/cshperspect.a032771

DYER, S. *et al.* International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies world report: assisted reproductive technology, 2019. **Fertility and Sterility**, [S. l.], 11 jun. 2025. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2025.06.003.

EE, C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 862–864, 2001. DOI: 10.1126/science.1065329

ELDER, K.; VAN DEN BERGH, M.; WOODWARD, B. Troubleshooting and problem solving in the IVF laboratory. **Cambridge: Cambridge University Press**, 2015.

ENTRINGER, P. *et al.* Análise de custo de um centro de reprodução humana assistida no Sistema Único de Saúde. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 33, 2023. DOI: 10.1590/S0103-7331202333080

EROL, M. *et al.* Placenta Accreta Spectrum (PAS): diagnosis, clinical presentation, therapeutic approaches, and clinical outcomes. *Medicina* v. 60, p. 1180, 2024. DOI: 10.3390/medicina60071180

EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY (ESHRE). Is it time for andrology and endocrinology professionals in assisted reproduction centers? **Andrology and Endocrinology Assisted Reproduction Centers**, 2024.

FADDY, J.; GOSDEN, D.; GOSDEN, G. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 36, n. 4, p. 455-458, 2018. DOI: 10.1016/j.rbmo.2018.01.006

FRAGOULI, E.; MANTZOURATOU, A. Endometrial receptivity: miRNAs signing in? **Fertility and Sterility**, v. 116, n. 1, p. 78–79, 2021. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.05.070

FAVARO, R.; ABRAHAMSOHN, P.; ZORN, M. Decidualization and endometrial extracellular matrix remodeling. In: CROY, B.; YAMADA, A.; DeMAYO, F.; ADAMSON, S. **The guide to investigation of mouse pregnancy**. San Diego: Academic Press, 2014. p. 125–142. DOI: 10.1016/B978-0-12-394445-0.00011-4

GILBERT, F.; BARRESI, F. **Biologia do desenvolvimento**. 11. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

GRIFFITHS-JONES, S. *et al.* miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Research**, v. 34, suppl. 1, p. 140–144, 2006. DOI: 10.1093/nar/gkj112

GRUBER, I.; KLEIN, M. Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? **Journal of the Turkish-German Gynecological Association**, v. 12, n. 2, p. 110–117, jun. 2011. DOI: 10.5152/jtgga.2011.25.

GU, R.; WU, T.; FU, J.; SUN, J.; SUN, X. Advances in the genetic etiology of female infertility. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 41, n. 12, p. 3261–3286, 2024. DOI: 10.1007/s10815-024-03248-w

GUO, Y., *et al.* Correlation between viral infections in male semen and infertility: a literature review. **Virology Journal**, v. 21, 2024. DOI: 10.1186/s12985-024-02431-w

HEYMANN, D. *et al.* Hyaluronic acid in embryo transfer media for assisted reproductive technologies. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 9, n. 9, 2020. DOI: 10.1002/14651858.CD007421.pub4

HUNKAPILLER, M. *et al.* A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. **Development**, v. 138, p. 2987–2998, 2011. DOI: 10.1242/dev.066589

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Projeções da população: Brasil e unidades da federação: estimativas e projeções: notas metodológicas**. 01/2024. Rio de Janeiro: IBGE, 2024.

KAKOUROU, G. *et al.* An update on non-invasive approaches for genetic testing of the preimplantation embryo. **Current Genomics**, v. 23, n. 5, p. 337–352, 2022. DOI: 10.2174/1389202923666220927111158

KANWAL, I.; SHAHID, M.; BACHA, R. Sonographic evaluation of various causes of female infertility: a literature review. **Journal of Diagnostic Medical Sonography**, v. 38, n. 2, p. 155–159, 2022. DOI: 10.1177/87564793211052023

KIM, M.; KIM, S. A review of mechanisms of implantation. **Development & Reproduction**, v. 21, n. 4, p. 351–359, 2017. DOI: 10.12717/DR.2017.21.4.351

KOSAKA, N.; IGUCHI, H.; OCHIYA, T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis, prognosis, and therapeutics. **Cancer Science**, v. 101, n. 10, p. 2087–2092, 2010. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 1, p. 155-162, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1141

KRISHER, L.; SCHLENKER, H. Amino acids and the early mammalian embryo: origin, fate, function and life-long legacy. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 18, p. 9874, 2019. DOI: 10.3390/ijerph18189874

KURIAN, K.; MODI, D. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36, n. 2, p. 189–198, 2019. DOI: 10.1007/s10815-018-1343-x

LAGOS-QUINTANA, M. *et al.* Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 853–858, 2001. DOI: 10.1126/science.1064921

LAWRIE, H. *et al.* Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **British Journal of Cancer**, v. 99, n. 10, p. 1666–1670, 2008. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604671

LI, X. *et al.* Uma revisão abrangente dos modelos de fusão de trofoblastos humanos: desenvolvimentos e desafios recentes. **Cell Death Discovery**, v. 9, p. 372, 2023. DOI: 10.1038/s41420-023-01670-0

LIANG, Y. *et al.* Global, regional, and national prevalence and trends of infertility among individuals of reproductive age (15-49 years) from 1990 to 2021, with projections to 2040. **Human Reproduction**, v. 40, n. 3, p. 529–544, 2025. DOI: 10.1093/humrep/deae292

LUCAS, S. *et al.* Cellular senescence in the decidua during the peri-implantation window: a role in recurrent pregnancy loss? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 223, n. 2, p. 260.e1–260, 2020. DOI: 10.1016/j.ajog.2020.02.028

MASSIMIANI, M. *et al.* Molecular Signaling Regulating Endometrium–Blastocyst Crosstalk. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 23, 2019. DOI: 10.3390/ijms21010023.

MATTEO, M. Assisted Reproductive Technology. In: BETTOCCHI, C., Busetto, G.M., CARRIERI, G., CORMIO, L. **Practical Clinical Andrology**. Springer, Cham. 2023. DOI: 10.1007/978-3-031-11701-5_18

MORBECK, E. *et al.* Composition of commercial media used for human embryo culture. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 3, p. 759-766, 2014. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2014.05.043

MORBECK, E.; BAUMANN, A.; OGLESBEE, D. Composition of single-step media used for human embryo culture. **Fertility and Sterility**, v. 107, n. 4, p. 1055–1060, 2017. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.01.007

MORBECK, E.; LEONARD, H. Culture systems: mineral oil overlay. In: SMITH, G.; SWAIN, J.; POOL, T. (Ed.). **Embryo culture: methods and protocols. methods in molecular biology**, v. 912. Totowa: Humana Press, 2012. p. 325–331. DOI: 10.1007/978-1-61779-971-6_18

MORENO-SEPULVEDA, J.; RAJMIL, O. Seminal human papillomavirus infection and reproduction: a systematic review and meta-analysis. **Andrology**, v. 9, p. 478–502. 2021. DOI: doi.org/10.1111/andr.12948

MOUSTAFA, S.; YOUNG, L. Diagnostic and therapeutic options in recurrent implantation failure. **F1000Research**, v. 9, 2020. DOI: 10.12688/f1000research.22403.1

NG, B. *et al.* In vivo oxygen, temperature and pH dynamics in the female reproductive tract and their importance in human conception: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v. 24, n. 1, p. 15–34, 2018. DOI: 10.1093/humupd/dmx028

NUNES, F. Nomenclatura de microRNAs. In: PEREIRA, C. (org.). **Introdução ao mundo dos microRNAs**. São Carlos-SP: SBG - Editora Cubo, 2015. 1. ed. cap. 4, p. 89-94. ISBN 978-85-89265-21-8

OJOSNEGROS, S. *et al.* Embryo implantation in the laboratory: an update on current techniques. **Human Reproduction Update**, v. 27, n. 3, p. 501–530, 2021. DOI: 10.1093/humupd/dmaa054

PAUL, M.; SADEK, T.; MAHESAN, M. The role of microRNAs in human embryo implantation: a review. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36, n. 2, p. 179–187, 2019

PIERSON, E. *et al.* A novel system for rapid conversion of Gardner embryo grades to linear scale numeric variables. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 46, n. 5, p. 808–818, 2023. DOI: 10.1016/j.rbmo.2023.01.008

PIRTEA, L. *et al.* Differential expression of tsRNAs and miRNAs in embryo culture medium: potential impact on embryo implantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 41, p. 781–793, 2024. DOI: 10.1007/s10815-024-03034-8

PLACE, F. *et al.* MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 5, p. 1608–1613, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0707594105

RASHKI GHALENO, L. *et al.* Exploring the role of hyaluronic acid in reproductive biology and beyond: applications in assisted reproduction and tissue engineering. **Advanced Biology** (Weinheim), v. 8, n. 6, 2024. DOI: 10.1002/adbi.202300621

SAAEELDIN, M.; OH, J.; LEE, C. Embryonic–maternal cross-talk via exosomes: potential implications. **Stem Cells and Cloning: Advances and Applications**, v. 8, p. 103–107, 2015. DOI: 10.2147/SCCAA.S84991

SALAMA, Y.; SMITH, J. Endocrine factors associated with infertility in women: an updated review. **Journal of Reproductive Endocrinology**, v. 27, n. 2, p. 123–139, 2023.

SALKER, S. *et al.* Disordered IL-33/ST2 activation in decidualizing stromal cells prolongs uterine receptivity in women with recurrent pregnancy loss. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052252

SALLAM, N.; SALLAM, H.; SALLAM, H. Non-invasive methods for embryo selection. **Facts, Views & Vision in ObGyn**, v. 8, n. 2, p. 87–100, 2016.

SCIORIO, R. *et al.* Clinical pregnancy is significantly associated with the blastocyst width and area: a time-lapse study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 38, p. 847–855, 2021. DOI: 10.1007/s10815-021-02071-x

SCIORIO, R.; RINAUDO, P. Culture conditions in the IVF laboratory: state of the ART and possible new directions. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2023. DOI: 10.1007/s10815-023-02934-5

SEGURA-BENÍTEZ, M. *et al.* Human blastocysts uptake extracellular vesicles secreted by endometrial cells containing miRNAs related to implantation. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 38, n. 8, p. 1547–1559, 2023. DOI: 10.1093/humrep/dead138

SENA-NETTO, B. *et al.* The replacement of fetal bovine serum with bovine serum albumin during oocyte maturation and embryo culture does not improve blastocyst quality after slow freezing cryopreservation. **Biopreservation and Biobanking**, v. 18, n. 3, p. 171–179, 2020. DOI: 10.1089/bio.2019.0059

SHARMA, A.; KUMAR, P. Understanding implantation window, a crucial phenomenon. **Journal of Human Reproductive Sciences**, v. 5, n. 1, p. 2–6, 2012. DOI: 10.4103/0974-1208.97777.

SMOLARCZYK, K. *et al.* The impact of selected bacterial sexually transmitted diseases on pregnancy and female fertility. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 2170, 2021. DOI: 10.3390/ijms22042170

TRÍBULO, P. *et al.* Changes in the uterine metabolome of the cow during the first 7 days after estrus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 1, p. 75–87, 2019. DOI: 10.1002/mrd.23082

TURCO, Y.; MOFFETT, A. Development of the human placenta. **Development**, v. 146, n. 22, 2019. DOI: 10.1242/dev.156232

WEIMAR, C. *et al.* Endometrial stromal cells of women with recurrent miscarriage fail to discriminate between high- and low-quality human embryos. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, p. 862–873, 2012. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.08.002

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Infertility prevalence estimates, 1990–2021**. Geneva: World Health Organization, 2023.

WU, L.; FAN, J.; BELASCO, G. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4034–4039, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0510928103

XIONG, Y. *et al.* Differential expression of tsRNAs and miRNAs in embryo culture medium: potential impact on embryo implantation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 41, p. 781–793, 2024. DOI: 10.1007/s10815-024-03034-8

YÁÑEZ-MÓ, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 4, art. 27066, 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.27066.

YANG, S. *et al.* Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA species. **RNA**, v. 17, n. 2, p. 312–326, 2011. DOI: 10.1261/rna.2537911.

YANG, Z. *et al.* Non-exosomal and exosomal circulatory microRNAs: which are more valid as biomarkers? **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1500, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.01500

ANEXO A

Dados suplementares: lista de miRNAs totais encontrados nos artigos da revisão.

Total of miRNA detected	Number of upregulated miRNAs	Upregulated miRNA	Number of downregulated miRNAs	Downregulated miRNA	References
198	12	miR-19b-3p miR-193b-3p miR-517a-3p miR-99a-5p miR-525-3p miR-503-5p miR-518f-5p miR-548c-5p miR-16-5p miR-371a-5p miR-372-3p miR-192-5p	17	miR940 miR-1972 miR-519d-3p miR-125b-5p miR-25-3p miR-367-3p miR-515-3p miR-423-5p miR-182-5p miR-663a miR-518a-3p miR-19a-3p miR-302a-3p miR-378a-3p miR-517c-3p miR-371a-3p miR-373-3p	18
41	19	miR-23a-3p miR-570-3p miR-485-3p miR-572 miR-26b-5p miR-150-5p miR-744-5p miR-874 miR-24-2-5p miR-300 miR-619 miR-208a miR-612 miR-26b-3p miR-632 miR-362-3p miR-543 miR-380-5p miR-638	22	miR-661-5p miR-372 miR-374b-3p miR-518c-3p miR-126-3p miR-361-5p miR-29b-2-5p miR-516b-5p miR-371a-5p miR-518a-3 miR-149-5p miR-571 miR-943 miR-937-3p miR-761 miR-106b-3p miR-182-3p miR-624 miR-515-5p let-7b-3p miR-577 miR-1912	19
61	7	miR-220 miR-146b-3p miR-512-3p miR-34c miR-375 miR-20a miR-30c	NI	NI	21

Total of miRNA detected	Number of upregulated miRNAs	Upregulated miRNA	Number of downregulated miRNAs	Downregulated miRNA	References
10	NI	NI	3	miR-191 miR-645 miR-372	22
4	NI	NI	1	miR-142-3p	23
4	1	miR-191-5p	1	miR-24-1-5p	24
53	1	miR-320a	NI	NI	25
48	1	miR-181a-5	7	miR-16-5p miR-30e-5p miR-320a miR-320b miR-509-3p miR-99b-5p let-7c-5	26
26	6	miR-483-5p* miR-199a-3p miR-199b-3p miR-199a-5p miR-379-5p* miR-432-5p miR-99a-5p	NI	NI	27
237	2	miR-26b-5p* miR-21-5p*	NI	NI	28
NI	4	miR-195* miR-29b* miR-145* miR-223	NI	NI	29
6	NI	NI	2	miR-372-3p miR-519d-3p	30
621	1	miR-634	NI	NI	31

Legenda: miRNA indicados por asterisco são miRNA descritos nos artigos com padrão de baixa expressão. A sigla NI significa “not informed”, não informado, em artigos que não apontam determinados padrões de miRNA.

ANEXO B

Dados suplementares: informações de materiais e métodos dos artigos da revisão.

PARENTS INFORMATION	CONFIRMATION OF IMPLANTATION	BLASTOCYST QUALITY	NUMBER OF BLASTOCYSTS	COLLECT	ANALYSIS	SCM INFO	CONTROL	MATERNAL AGE	REF.
NI	Live birth.	AA according to Gardner and Schoolcraft, 1999.	Phase 1: 60; Phase 2: 221	Exiqon whole human miRNome protocol; purification: TaqMan miRNA. Anti-miRNA Bead Capture (ABC) Purification Kit (ThermoFisher Scientific);	Whole miRNoma qPCR	Continuous single culture media (Irvine Scientific, USA)	Whole miRNome qPCR: Blanc media were run in parallel to identify false positive amplifications intrinsic to the two protocols.	NI	18
Tubal defect, ovulation defect, male aetiology; fertilised by ICSI only.	Clinical pregnancy carried to term >36 weeks.	NI	8	RNA total of the spend culture media.	miRCURY RNA Biofluids isolation Kit (Exiqon, Denmark). RT-qPCR (miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR system).	NI	Control culture media (not exposed to an embryo)	≤38	19
NI	Fetus with cardiac activity beyond 20 weeks of gestation.	Expanded blastocysts of good quality (Gardner scale) and without signs of degenerating cells.	5	TaqMan miRNA Anti-miRNA Bead Capture (ABC) Purification Kit (Applied Biosystems)	Isolation by miRCURY RNA Isolation Kit for Biofluids (EXIQON). Retrotranscription miR-CURY LNA Universal RT individual microRNA assays protocol; Via7 instrument (Applied Biosystems); Whole-genome RT-qPCR based miRNA profiling.	Quinn's Advantage Blastocyst Medium (Cooper Surgical) with 5% Quinn's Advantage Human Serum Albumin (Cooper Surgical).	no-template control of real-time (RT) and qPCR were also included in the analysis, and also a blank culture media sample never exposed to embryo culture.	NI	21
The information was not released due to restrictions imposed by the institutional review board protocol.	NI	≥1CM B(Jansen and Mortimer). Good genomic composition (without mosaicism).	28	RNA total of the spend culture media.	RT-qPCR	Sequencial, IVC-Three (In VitroCare), 20% SPS.	Blank media control drops.	NI	22
Patients undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a private university-affiliated IVF center, collected between January/2015 and November/2015.	NI	>4BC (Gardner scale)	36	RNA total of the spend culture media.	cDNA Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA); RNA spike-in: C. elegans miR-39. Taqman miRNA Assays (Life Technologies); RT-qPCR SDS software (Life Technologies); cDNA: miRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies); RT-qPCR TaqMan® MiRNA Assay system (Life Technologies).	Non-sequential (Global®, LifeGlobal)	NI	NI	23

Fifty female patients who received a diagnosis of infertility and requested in vitro fertilization (IVF). The inclusion criteria were ≤ 37 years of age, regular menstrual cycles, normal uterine cavity confirmed by hysteroscopy, the absence of intrauterine adhesion or inflammation, a normal ovarian reserve, a normal ovarian response to the stimulation protocols, and no use of exogenous hormone (estradiol/progesterone) during the endometrial cycle. The exclusion criterion was the failure of the woman to undergo an ultrasound scan within 4 weeks after a positive pregnancy test. Non-inclusion criteria were endometrial cancer or hyperplasia, endometriosis, and having a male partner with infertility.	Fourteen days after embryo transfer, ultrasound was employed to examine the possibility of successful implantation, evidenced by the development of the embryonic sac.	Type I, II, or III quality on the third day of embryonic development.*	50	RNA total, SCM, d5	RT-PCR, optical density.	G-1 PLUS culture medium (Vitrolife Sweden AB, Sweden).	NI	≤ 37	24
Biopsies were performed on hysterectomy specimens from patients that received surgery for spotting due to a niche in a cesarean section scar (n2). Patients were premenopausal, were 35 and 39 years of age, had a history of proven fertility and at least one live birth, and received no hormonal treatment 3 months prior to surgery.	NI	Day 1-4. High morphological quality (≥ 8 blastomeres and fragmentation $\leq 20\%$), low morphological quality (≤ 7 blastomeres and fragmentation $\geq 20\%$) n46 each group.	96	d4; Total RNA (miRCURY RNA isolation kit—Biofluids 300112, Exiqon, Denmark);	Expression of miRNAs; Ready-to-Use Human panel lpl PCR, using ExiLent SYBRV Green master mix (339322, Qiagen, Hilden, Germany); Amplification reactions were performed in a LightCycler 480 Real-Time PCR System (05015243001, Roche, Basel, Switzerland); Amplification curves were analyzed using LC software (04994884001, Roche, Basel, Switzerland).	Sage medium (Quinn's advantage blastocyst medium, Cooper Surgical, USA) supplemented with 5% HSA.	Empty medium droplets, in which no embryo was grown but that otherwise underwent the same procedures, from the same dishes were used as controls.	35 to 37	25
ICSI realized between May 2016 and April 2019. Patients having undergone conventional in vitro fertilization (IVF) were excluded to avoid contamination of granulosa cells, as were patients with structural and tissue abnormalities or infectious etiologies in the uterus and adnexa.	Fetal heartbeat at ≥ 8 weeks.	≥ 3 BB (Gardner scale).	60	RNA total of the spend culture media.	sequencing of miRNA (TruSeq® Small RNA Sample Prep Kit - Illumina) RT-qPCR (TaqMan Advanced miRNA Kit - ThermoFisher).	Non-sequential, SAGE 1-Step (Origio).	culture medium only (negative control qPCR: <i>C. elegans</i> -derived miRNA as a control gene.	≤ 41	26
NI	Gestational sac with fetal heartbeat was revealed by ultrasound examination after 7 weeks of pregnancy.	Number of blastomeres, fragmentation rate and symmetry (CALPHA/ESHRE) ≥ 4 BB (Gardner scale).	8	RNA total of the spend culture media.	miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Germany).	Sequential, G2-PLUSTm (Vitrolife, Gothenburg, Sweden).	NI	NI	27

NI	NI	"blastocyst scoring system**.	30	A high-throughput miRNA sequencing method was applied to detect the miRNA profiles in the human embryo culture media.	After bioinformatics analysis and screening of differentially expressed miRNAs, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay.	Sequencial, G-2 PLUS (Vitrolife, Göteborg, Sweden).	Blank samples, namely water and culture media never exposed to embryo culture.	NI	28
Patients with unexplained infertility.	Clinical pregnancy is defined by the presence of a heartbeat on ultrasound between the 7th and 8th week of gestation.	Reach d5.	50	RNA total of the spend culture media.	RT-qPCR	Non-sequencial, SAGE 1-Step (Origio)	NI	NI	29
Age <38 years, and infertility due to tubal obstruction and/or male factors. Patients with recurrent miscarriage; repeated implantation failure; endometriosis; polycystic ovary syndrome; hydrosalpinx; chronic endometritis; immune diseases, such as antiphospholipid syndrome and systemic lupus erythematosus; and thrombophilia were excluded. Cycles with two blastocysts transferred at once were included if the blastocysts had the same pregnancy outcomes.	Blastocysts that were implanted and those that were not implanted, according to whether a positive fetal heartbeat was observed beyond 8 weeks of gestation.	≥4BC (Gardner scale).	162	RNA total of the spend culture media.	miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen GmbH) RT-qPCR (miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter kit Guangzhou RiboBio Co., Ltd.).	Sequencial, G-2 PLUS (Vitrolife, Göteborg, Sweden);	cel-miR-39.	<38	30
Subfertile females underwent single-embryo transfer cycle.	NI	Embryos that displayed two pronuclei and completed the first division.	56	RNA total, SCM, d3 and d5.	Microarray, RT-qPCR.	25 µL, Continuous Single Culture® Medium (CSCM) (Irvine Scientific – USA).	Two negative controls were cultured in the same conditions but without embryos i.e. media that were not exposed. miRNA isolation: The <i>Caenorhabditis elegans</i> (C. elegans) miR-39 mimic was added to each isolation as an internal spike-in control (Qiagen, Germany).	NI	31

Legenda: O grupo de controle corrige a presença de miRNAs de origem não específica, incluindo aqueles derivados da albumina sérica no meio de cultura. Asterisco indica a falta de referência e detalhes sobre a forma de avaliação usada para avaliar os blastocistos. A sigla NI significa “not informed”, não informado, em artigos que não apontam determinadas informações.