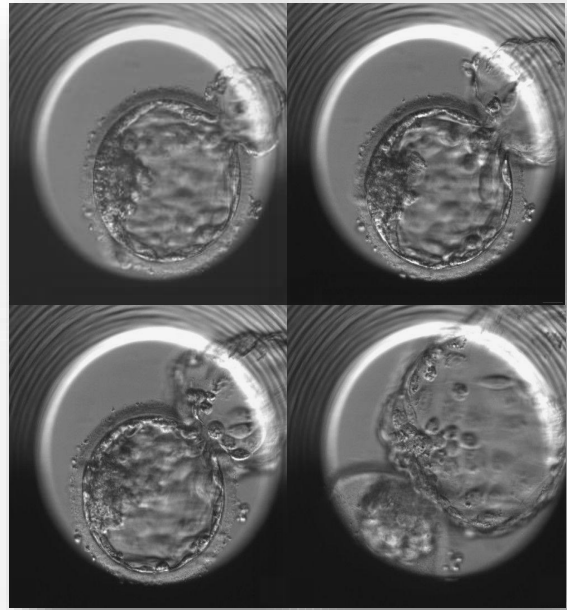


# ***Time-lapse e o uso da morfocinética para a monitorização do desenvolvimento de embriões humanos***

Ana Lúcia Gomes Rodrigues  
Relatório de Mestrado apresentado à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto em  
Biologia Celular e Molecular  
2017

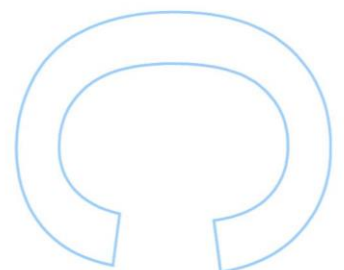
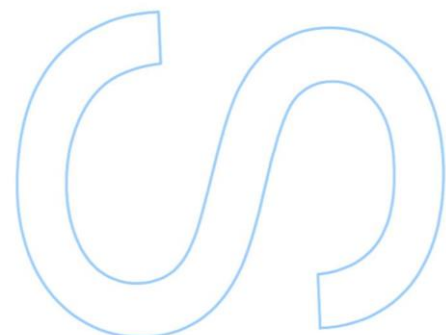
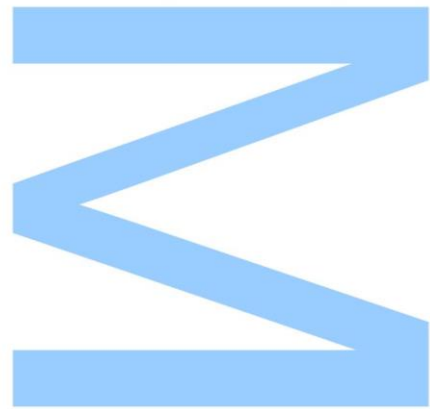




# ***Time-lapse* e o uso da morfocinética para a monitorização do desenvolvimento de embriões humanos**

Ana Lúcia Gomes Rodrigues  
Mestrado em Biologia Celular e Molecular  
Departamento de Biologia  
2017

**Orientador**  
Vasco Manuel Leal Martins de Almeida, Professor Auxiliar  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto



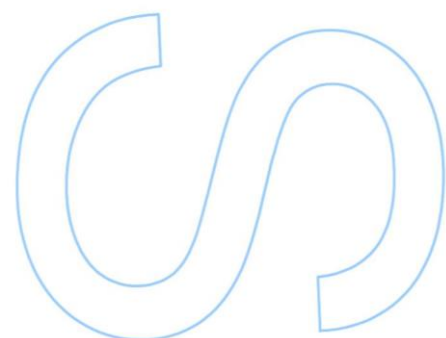
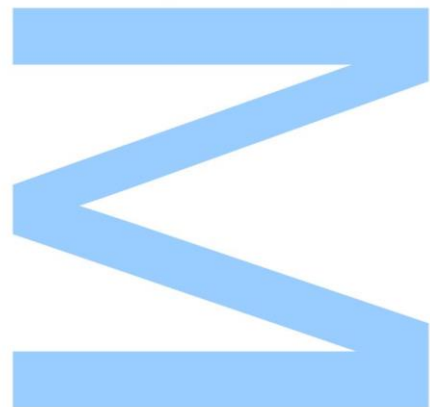




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



# Declaração

Eu, Ana Lúcia Gomes Rodrigues, aluna do mestrado em Biologia Celular e Molecular do ano letivo 2016/2017, declaro que a escrita redigida na presente tese de mestrado foi de autoria própria. Não houve ocorrência de plágio em relação a nenhuma fonte bibliográfica pesquisada e tomei conhecimento das consequências de tal ato.

Porto, \_\_\_\_\_

---

## Agradecimentos

À Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por ter sido a instituição a fornecer todas as bases essenciais para a minha educação e formação em Biologia, fomentado o gosto por esta mesma área científica e por todas as suas vertentes.

À Professora Doutora Maria da Conceição Santos, pela disponibilidade e auxílio ao longo do ano.

Ao centro de estudos de infertilidade e esterilidade (CEIE), por ter dado a oportunidade de integração, recursos e conhecimentos valiosos para a redação desta tese de mestrado.

Ao Professor Doutor Vasco Almeida, por ter sido o primeiro a possibilitar a minha entrada nesta área científica e pela integração, aprendizagem, compreensão, apoio, auxílio e acompanhamento ao longo de todo o ano letivo. Um grande obrigado.

À Doutora Isabel Damião, pela aceitação e por ter permitido a minha formação sob a sua supervisão. Pelos ensinamentos valiosos, ajuda, compreensão e disponibilidade.

À Daniela e à Sara, pela paciência, supervisão, conselhos e ensinamentos fundamentais, o que permitiu que o tempo no estabelecimento CEIE fosse enriquecido e complementado.

À Leonor e à Joana, pelo amparo, ajuda e partilha de vários momentos que marcaram este ano. À Margarida, Anita, Beatriz, Sara e Mafalda, pela grande amizade partilhada ao longo de muitos anos e pelo positivismo e incentivo.

À minha madrinha Maria do Céu, por todos os momentos de descontração e ajuda. À Doutora Sónia, pelo seu acompanhamento assíduo.

Aos meus pais, por terem sido os meus pilares no decurso desta nova experiência e em todas as suas etapas, pela preocupação incessante, paciência e pela ajuda sempre oportuna. Aos meus avós, por garantirem que tudo estava a correr bem. E à minha irmã Filipa, um obrigada por ouvires tanto nas horas de calma como nos momentos de agitação. Pelos conselhos dados e pela força dada a cada dia. À Alice, pelo seu exemplo de boa disposição, carinho e simpatia.

“*O tempo irá explicar*”

Jane Austen, *Persuasion*, 1817

## Resumo

O *time-lapse* constitui um sistema inovador de aquisição diária de imagens embrionárias, em intervalos de tempo definidos, por uma câmara fotográfica e microscópio incorporados no próprio aparelho. Assim, através deste sistema, é possível uma monitorização contínua e ininterrupta e, conseqüentemente, a visualização de imagens de embriões relativas ao desenvolvimento embrionário completo, não só para captar todos os eventos celulares cruciais, mas também para verificar o estado da progressão do embrião. Esta propriedade é, essencialmente, a característica mais marcante do seu uso nesta área da biologia humana, permitindo ultrapassar alguns obstáculos colocados pelo método tradicional, como a observação microscópica exterior à estufa de incubação (o que pode provocar uma variação das condições físico-químicas ótimas de cultura).

A evolução dos sistemas *time-lapse* e a ideia de captar o movimento por imagens estáticas teve contribuições de cientistas, fotógrafos e, essencialmente, visionários cuja curiosidade e investigação foram intermináveis e excepcionais. Eadweard Muybridge e James Comandon foram, provavelmente, os maiores entusiastas na arte da captação de movimento e na microcinematografia, marcando uma era de novas descobertas de visualização e investigação.

Desde o começo da implementação desta ideia na área de embriologia humana, que remonta para o ano de 1997 com o estudo de Payne e colaboradores, foi possível discriminar algumas vantagens da sua aplicação, já que a visualização do processo completo de desenvolvimento, desde a fecundação até ao dia transferência para o útero, permitiu a descoberta de muitos fenómenos adjacentes ao processo inicial de formação da vida humana.

O objetivo primordial deste trabalho monográfico consistiu, assim, na descrição desta tecnologia e do seu papel de monitorização e seguimento embrionário na obtenção e registo de todas as etapas de progressão de cada embrião. Subseqüentemente, a introdução do *time-lapse* num centro de tratamento de infertilidade cria uma nova e inovadora via de avaliação aliada à avaliação morfológica, a morfocinética. Igualmente, esta conciliação de certas características morfológicas, como multinucleação ou fragmentação, com parâmetros morfocinéticos passíveis de serem determinados com o *time-lapse* (como início e duração de etapas de desenvolvimento embrionário) poderão ser usados para determinar a qualidade embrionária para cada casal. Com a implementação deste sistema espera-se, fundamentalmente, que haja uma melhoria de algumas variáveis clínicas importantes e



documentadas, tais como taxas de implantação, transferência viáveis e potencial gravidez. Consequentemente, este facto contribuirá para o aumento expectável das taxas de sucesso dos tratamentos protagonizados de Fertilização *In Vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI) e poderá facilitar a tarefa de escolha e seleção do embrião com melhor qualidade para transferência para o útero da mulher.

Em suma, poder-se-á assistir a uma revolução nas práticas de todas as clínicas de Reprodução Humana Assistida, impulsionando grandemente a adoção desta técnica.

**Palavras-chave:** *Time-lapse*, Reprodução Humana Assistida, FIV, ICSI, monitorização de embriões humanos, desenvolvimento embrionário, morfocinética, parâmetros morfocinéticos, qualidade embrionária, seleção embrionária.

## Abstract

The time-lapse system constitutes an inovating technology that allows a daily and high quality embryo image aquisiton through a specialized integrated camara-microscope system programmed to capture frames in constant and defined time intervals. Consequently, this system offers a continuous and undisturbed embryo monitorization in order to analyse all the essential cellular phases and milestones of embryonic development. This property is probably one of the most excited reasons to apilly this type of technology into the assisted reproductive area because it not only incorporates the incubation and observational system in one piece as well as substitutes the conventional monitorization outsider the incubator (that potencially could cause a great variation of physical and chemical conditions related to the incubation environment).

The evolution of these tecnologies and the inherent idea of showing movement through sequences of static images had inumerous contributions of scientists, photographers and mostly visionnaries whose curiosity and research were endless and exceptional. Eadweard Muybridge and James Comandon were possibly the enthusiasts of the arts of capturing movement and microcinematography, leading to an era that was labelled by the discovery of new paths to observe and investigate.

Since the first implementation of this knowledge in human embryology, with Payne *et al.* in 1997, some of the advantages of time-lapse microscopy were emphasized because the visioning of every single part of embrionic development, from fertilization to transfer, became possible, opening a new path to the discovery of some unseen phenomenon associated with the progression of human life.

Therefore, the main aim of this monographic work was to present a complete description of time-lapse and its role for embryo monitorization and tracking and the registration of every event related to its development. Subsequently, the introduction of a time-lapse system in a clinic of infertility treatment creates a new way to evaluate the progression of an embryo, creating an ally to the conventional morphological evaluation, which is morphokinetics. The assessment of embryo morphology, associated with the evaluation of aspects such as multinucleation, fragmentation, etc., conjugated with the time of occurrence of some biological steps of development can, together, be used to determine embryo quality.

The expetation that this system can lead to the sucessful increase of clinical outcome aspects, such as implantation and pregnancy rates, is rising every day and several publication regarding the use of time-lapse in their own cases have confirmed this fact.

This documentation could contribute, in a large scale, to the continuous improvement of the very last and difficult task of an assisted reproductive technique, the selection of the best embryo to be transferred to the uterus after performing ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) or IVF (*In Vitro* Fertilization).

In conclusion, time-lapse techniques of image acquisition could impose a novel practise of assisted reproductive techniques leading to the encouragement to apply more often this type of system into more clinics and centres of infertility treatment.

**Keywords:** Time-lapse, Assisted reproduction techniques, IVF, ICSI, embryo monitorization, embryonic development, morphokinetics, morphokinetics parameters, embryo quality, embryo selection

# Índice

Agradecimentos .....	VI
Resumo.....	VIII
Abstract.....	X
Lista de tabelas .....	XV
Lista de figuras.....	XVII
Lista de abreviaturas .....	XXIX
Capítulo I - Infertilidade e sociedade.....	1
1. Infertilidade e causas adjacentes.....	2
Capítulo II - De <i>in vivo</i> para o <i>in vitro</i> .....	5
2. Técnicas de reprodução humana assistida .....	6
2.1. Introdução à ciência da reprodução humana <i>in vitro</i> .....	6
2.2. Procedimentos <i>in vitro</i> na área da ciência da reprodução .....	7
2.2.1. Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV) .....	9
2.2.2. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) .....	9
Capítulo III - <i>Time-lapse</i> e o seu papel na ciência da reprodução.....	11
3. Conceito de <i>time-lapse</i> : do século XIX à atualidade .....	12
3.1. Microcinematografia e a sua importância científica .....	12
3.2. Introdução do conceito de <i>time-lapse</i> na embriologia .....	18
3.2.1. Contextualização histórica do sucesso da FIV antes do <i>time-lapse</i> .....	18
3.2.2. Estudo da embriologia com recurso a técnicas tipo <i>time-lapse</i> .....	20
3.3. Sistemas <i>time-lapse</i> aplicados à ciência da reprodução humana <i>in vitro</i> .....	22
3.3.1. Tipos de sistemas <i>time-lapse</i> existentes.....	25
3.3.2. Geri+ (Genea BIOMEDX) .....	34
3.3.2.1. Estrutura e especificações do Geri+ .....	35
3.3.2.2. Ecrã do utilizador principal .....	36
3.3.2.3. Câmaras de incubação do aparelho Geri+ .....	38
3.3.2.4. Posicionamento do disco Geri+ na câmara de incubação .....	39
3.3.2.5. Acesso a cada câmara de incubação: observação e marcação do estado embrionário .....	39

3.3.2.6. Sistema de alarmes e avisos do Geri+ .....	41
3.3.2.7. Captação e gravação de imagens relativas ao desenvolvimento embrionário humano.....	43
3.3.2.8. Exportação de dados relativos ao desenvolvimento embrionário humano.	46
3.3.2.9. Sistema computacional do sistema Geri+: Geri <i>connect</i> .....	46
3.3.2.10. Geri Assess: componente complementar do Geri+ .....	48
Capítulo IV - Cinética de desenvolvimento embrionário humano .....	52
4. Morfocinética e a sua aplicação na avaliação embrionária .....	53
4.1. Conceito de morfocinética.....	53
4.1.1. Parâmetros morfocinéticos incluídos na avaliação embrionária .....	54
4.1.1.1. Parâmetros morfocinéticos absolutos de desenvolvimento embrionário ...	54
4.1.1.2. Parâmetros morfocinéticos relativos de desenvolvimento embrionário .....	58
4.2. Interpretação da análise de dados obtidos com recurso ao <i>time-lapse</i> .....	62
4.3. <i>Timings</i> de ocorrência de etapas de desenvolvimento embrionário para previsão do desenvolvimento e implantação.....	66
4.3.1. Estudo de Payne e colaboradores, 1997.....	66
4.3.2. Estudo de Lemmen e colaboradores, 2008 .....	67
4.3.3. Estudo de Wong e colaboradores, 2010 .....	68
4.3.4. Estudo de Meseguer e colaboradores, 2011 .....	69
4.3.5. Estudo de Cruz e colaboradores, 2012.....	71
4.3.6. Estudo de Rubio e colaboradores, 2012 .....	73
4.3.7. Estudo de Hlinka e colaboradores, 2012.....	74
4.3.8. Estudo de Dal Canto e colaboradores, 2012 .....	75
4.3.9. Estudo de Chamayou e colaboradores, 2012 .....	76
4.3.10. Estudo de Herrero e colaboradores, 2013.....	77
4.3.11. Estudo de Desai e colaboradores, 2014.....	78
4.3.12. Estudo de VerMilyea e colaboradores, 2014.....	79
4.3.13. Estudo de Rubio e colaboradores, 2014 .....	81
4.3.14. Estudo de Milewski e colaboradores, 2015.....	82
4.3.15. Estudo de Basile e colaboradores, 2015 .....	84
4.3.16. Estudo de Liu e colaboradores, 2015.....	87

4.3.17. Estudo de Goodman e colaboradores, 2016.....	89
4.4. Aplicação da morfocinética à previsão de embriões aneuploides .....	91
4.5. Comparação dos tempos de ocorrência de etapas celulares com recurso à aplicação da morfocinética .....	94
4.6. Avaliação convencional <i>versus</i> avaliação pelo <i>time-lapse</i> .....	98
4.7. <i>Single Embryo Transfer</i> (SET) e a sua relevância na reprodução humana assistida .....	107
Capítulo V - A criação de um Humano .....	108
5. Desenvolvimento embrionário humano .....	109
Conclusão .....	118
Referências bibliográficas .....	120
Anexos .....	137

## Lista de tabelas

**Tabela 1** - Apresentação das características principais dos tipos de sistemas *time-lapse* mencionados, incluindo o número máximo de embriões monitorizados que cada sistema suporta, o tipo de cultura, sendo este individual (apenas um aparelho a suportar vários casos clínicos) ou em grupo (cada unidade suporta um caso clínico de cada vez), o número de planos focais que a câmara possibilita para captação da imagem e a sua frequência e, por fim, o tipo de iluminação que cada sistema *time-lapse* apresenta no que diz respeito ao sistema microscópico incorporado. Adaptado de Best, 2015.

**Tabela 2** - Representação das diferentes opções, disponíveis no momento de introdução de um paciente no sistema Geri+, representativas do tipo de ciclo efetuado. Esta ferramenta é de tal maneira importante que permite uniformizar o tempo inicial de captação de imagem para que todos os *frames* analisados de casos diferentes apresentem tempos de ocorrência referentes ao mesmo ponto inicial, já que diferentes tipologias de ciclos apresentam tempos de iniciação de desenvolvimento distintos (em horas, ICSI corresponde a *Intracytoplasmic Sperm Injection* ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides e FIV a Fertilização *In Vitro*). Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Tabela 3** - Representação dos vários eventos celulares que podem ser selecionados pelo utilizador através do Geri Assess, de modo a demarcar, na avaliação embrionária, as etapas de desenvolvimento mais marcantes e significativas. Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Tabela 4** - Sumarização de todos os parâmetros morfocinéticos absolutos, desde os determinantes dos estados de clivagem (de dois a oito blastómeros) até às etapas de desenvolvimento tardio (desde a iniciação do estado de mórula até à eclosão do blastocisto). Uma breve definição dos mesmos é apresentada na segunda coluna da tabela e todos os parâmetros são definidos em horas após inseminação (ou t0). Adaptado de Ciray *et al.*, 2014 e Meseguer, 2016.

**Tabela 5** - Parâmetros morfocinéticos relativos referentes à duração (em horas) de parâmetros associados à ocorrência dos ciclos celulares, sincronização de estado de clivagem e parâmetros morfocinéticos adicionais que, apesar de não abordados, podem

constar na lista de critérios de avaliação com recurso à morfocinética. Adaptado de Meseguer, 2016.

**Tabela 6** - Parâmetros morfocinéticos e respetivos intervalos de ocorrência, em horas após inseminação (hpi representativo de *hours post-insemination*). tF corresponde ao tempo referente ao primeiro momento de aparecimento dos pronúcleos, enquanto tC corresponde ao último momento de observação de ambas as estruturas (sendo que a sua diferença corresponde à duração do processo de singamia). Os parâmetros morfocinéticos t1 a t8 demonstram os *timings* de ocorrência desde a inseminação até ao estabelecimento de todas estas fases de clivagem e s3 é considerado um parâmetro relativo indicativo da sincronização dos estados de clivagem de cinco a oito blastómeros. Nesta tabela, o tempo médio dos intervalos correspondentes é, igualmente, apresentado, em horas após inseminação. Adaptado de Chamayou *et al.*, 2012.

**Tabela 7** - Sumariação dos *timings* de cada etapa celular consoante os estudos apresentados. hpi representa *hours post-insemination* e h indica o tempo em horas.

**Tabela 8** - Tempos de monitorização (em horas após inseminação) e avaliação embrionárias nas práticas convencionais antes do *time-lapse*. Cada etapa de desenvolvimento é visualizada em tempos específicos após a realização da técnica de RHA. São apresentados, igualmente, os estados celulares expectáveis para cada tempo de visualização. Adaptado de Alpha e ESHRE, 2011.

**Tabela 9** - Adaptação do esquema de Gardner e Schoolcraft (1999) em relação a critérios e sistema de classificação definidos pela Alpha e ESHRE (2011). Adaptado de Alpha e ESHRE, 2011.



## Lista de figuras

**Figura 1** - Representação de um Complexo Cumulus-Oócito (COC), obtido após punção folicular. Esta estrutura corresponde a um folículo ovárico maduro, com o primeiro glóbulo polar visível, rodeado por células adjacentes da coroa radiata. Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012.

**Figura 2** - Representação do fusil fotográfico utilizado por Etienne-Jules Marey na sua arte de fotografia para captar o movimento de animais. O sistema adaptado era composto por daguerreótipo, que permitia a captação dos frames, incorporado numa arma que, ao ser ativada, autorizava a captação de imagens singulares com grande velocidade de através do seu esquema de disparo. Disponível em <http://www.artecapital.net/exposicao-513-valter-ventura-observatorio-de-tangentes>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

**Figura 3** - Representação do primeiro cinematógrafo criado pelos irmãos Lumière, em 1895. Disponível em <http://www.history.com/news/the-lumiere-brothers-pioneers-of-cinema>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

**Figura 4** - Representação do aparelho microcinematográfico de Jean Comandon (na imagem esquerda), usado nos seus estudos em 1910. Cinquenta anos mais tarde, foi registado o momento em que este microcinematógrafo observa uma das suas películas fotográficas (imagem à direita). Adaptado de Lefebvre, 2003.

**Figura 5** - Representação do InCu-View Live™ da marca Sanyo (A) e o BioStation CT da marca Nikon (B). Ambos os aparelhos de incubação apresentam a opção de visualização do movimento celular, em embriões ou células não embrionárias. Adaptado de Sanyo, 2007 (disponível em <http://www.panasonic-biomedical.co.uk>) e de Nikon, 2017 (disponível em <https://www.nikoninstruments.com>). Acedidos a 7 de setembro de 2017.

**Figura 6** - Sistema *time-lapse* Primo Vision™ EVO (A), inserido no seu respetivo local de uma estufa pré-existente. B representa o aparelho digital de microscopia invertida, com uma placa de incubação de embriões já preparada para monitorização e o sistema de controlo computacional agregado ao aparelho de microscopia (C). Imagem A adaptada de Best, 2015. Imagens B e C Disponíveis em <http://www.vitrolife.com/en/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/> e

<http://www.vitrolife.com/sv/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-Analyzer-Software/>. Acedido a 7 setembro de 2017.

**Figura 7** - Sistema *time-lapse* Eeva™ (A) e uma representação da aplicação do Eeva test (B) numa situação de monitorização e avaliação automática, onde é possível observar duas das classificações deste modelo de avaliação, bem como ter acesso ao caso clínico em questão e a variadas informações sobre o mesmo. Imagem A disponível em <http://www.magazine.emerck> e imagem B disponível em <https://www.eevatest.com>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

**Figura 8** - Sistema *time-lapse* EmbryoScope® (A), conjugado com o seu controlo computacional exterior ao aparelho de incubação (B). O EmbryoSlide (C e D), de diâmetro 0,2 mm e 25 µL de volume máximo de meio de cultura, apresenta uma pequena peça na parte final, a seguir aos poços, que permite que o utilizador segure e encaixe o sistema de poços de cultura com a máxima segurança e cuidado (C). Imagem A disponível em <http://www.vitrolife.com>. Imagem B adaptada de Best, 2015. Imagem C e D disponíveis em <http://www.vitrolife.com>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

**Figura 9** - Sistema *time-lapse* EmbryoScope + (A) e o respetivo EmbryoSlide+ (B), com a representação do sistema de identificação de cada casal com o nome e código de barras. Imagens disponíveis em <http://www.vitrolife.com>. Acedido a 10 de setembro de 2017.

**Figura 10** - Sistema *time-lapse* Miri® (A) e representação dos respetivos poços de cultura, Culture Coin (B). Imagem A e B disponíveis em <http://medical.escoglobal.com>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

**Figura 11** - Apresentação do sistema *time-lapse* Geri+ (A). A1 representa uma das seis câmaras de incubação que compõem o sistema, cada uma com o ecrã informativo (A2), ampliado na imagem C. O ecrã interativo (A3) permite que o utilizador manipule todo o sistema de modo a obter informações sobre os casos monitorizados no momento e realizar todas as alterações necessárias, incluindo a verificação das condições de cultura em cada câmara. No ecrã interativo ou *home page* (B), apresentado no ecrã principal do aparelho, é apresentado panorama geral de todos os casos clínicos a serem monitorizado naquele momento (B4) pelo aparelho Geri+ (B5). Cada câmara é representada por uma numeração de um a seis (números referentes B6), relacionada com a ordem das câmaras do Geri+, e, imediatamente por baixo deste número, é possível ter uma visão geral dos poços ocupados em cada câmara e do estado dos embriões cultivados e monitorizados dentro da mesma. Adicionalmente, é possível

saber a duração, após inseminação (em horas), no qual este aparelho regista todos os episódios de desenvolvimento dos embriões monitorizados (B7). No caso de haver alguma alteração das câmaras de incubação, o sistema Geri+ aciona um alarme (B8) com acompanhamento sonoro e visual, tornando-se a câmara em questão na cor vermelho. Se não se tratar de uma situação muito fora do normal, pode surgir apenas uma situação de aviso por parte do sistema, alertando na mesma que alguma modificação ocorreu (B9). O aparelho é sintonizado com a data e hora do dia em questão (B10). O ecrã exclusivo de cada câmara de incubação (C) inclui informações relevantes do paciente, incluindo o seu nome (C11), bem como o seu número de identificação nos registos clínicos (C12), e informação referente às condições atmosféricas da câmara em que a paciente está inserida, incluindo o nível de humidade (C13), a temperatura (C14) e, por fim, o nível de dióxido de carbono (C15). Imagem A disponível em <https://www.professionalsinfertility.com>, acessado a 10 de agosto de 2017, e imagens B e C adaptadas e disponíveis em Genea BIOMEDX.

**Figura 12** - Interface acessada a partir do ecrã principal do sistema de laboratório Geri+, com disponibilidade de várias funções, desde o acesso às condições atmosféricas em cada câmara individual até à opção de extração de dados relativos a um caso desejado de uma câmara à escolha. Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 13** - Representação do interior de uma câmara de incubação do aparelho Geri+ (D). Ao levantar a tampa de cada câmara (D15) observam-se variados compartimentos na mesma, incluindo uma posição que permite a circulação gasosa e de vapor de água (D16), que estabelece a ligação com as entradas de acesso da botijas de gás (nomeadamente CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>), a posição da câmara fotográfica (D17) responsável pela captação de imagens características do desenvolvimento do embrião e, por último, uma posição que permite pousar placas de quatro poços de manutenção embrionária de 35 milímetros (anel interior) e 60 milímetros (anel exterior), representada em D20. Estas últimas posições são extremamente úteis porque possibilitam aos embriologistas uma maneira facilitada e segura de manipulação dos embriões e a sua transferência destas placas de cultura para os discos Geri+ específicos para este aparelho (E). A patilha representada por D18 é utilizada para fixar a posição do disco Geri+ e a saliência na extremidade da posição do disco demarca a posição da extremidade final para colocação correta do mesmo (D19). Os discos Geri+ (ou Geri-DSH-20) são constituídos por três partes fundamentais, incluindo os três poços de lavagem (E21), preenchidos com meio de cultura específico necessário para lavagens de oócitos ou embriões, um poço central (E22) composto por dezasseis micro-poços de alta precisão e transparência com um diâmetro de 430 µm (micrómetros) e profundidade de 400 µm

(F24), e, por fim, a extremidade do disco (E23) que permite que o embriologista manuseie este disco para inserção ou remoção do Geri+. Imagem D disponível em <https://www.good-design.com/entry/geri/>, acedido a 10 de agosto de 2017, e imagens E e F adaptadas de Genea BIOMEDX.

**Figura 14** - Acesso à interface referente a cada câmara de incubação (G). As informações obtidas nesta página vão desde dados associados ao caso clínico de monitorização da câmara em questão (G25), o número da câmara selecionada (G26), a representação de cada embrião inserido nos micro-poços correspondentes (exemplo de um micro-poço ocupado por um embrião em G27) e determinação da temperatura no interior da câmara (G29). Para cada embrião, o sistema dispõe de uma classificação simbólica (H), simples e de fácil compreensão, no qual possibilita que o embriologista marque um micro-poço com os símbolos apresentados. Desta forma, o primeiro símbolo está associado a uma situação de transferência, o que significativa que, naquele caso, o embrião a que este símbolo foi atribuído apresenta uma grande chance de ser selecionado e transferido para o útero. O segundo símbolo refere uma situação de criopreservação, o que indica que este será o destino do embrião marcado com o mesmo. Já o terceiro simboliza uma situação de exclusão do embrião, sendo que o mesmo será descartado e, por isso, não considerado para transferência devido a um desenvolvimento anormal, morfológico ou morfocinético. Por fim, o último símbolo é atribuído pelo utilizador a um micro-poço vazio (sem embriões incubados). Outras opções podem ser acedidas nesta interface incluindo a indicação se aquele caso clínico está a ser avaliado automaticamente pelo *Eeva test* (G28) e a indicação de captação de imagem (G30), bem como o tempo desde a inseminação, a que os embriões estão submetidos (em horas e minutos). Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 15** - Representação de uma situação alarmante ilustrativa um grande aumento de temperatura dentro de uma câmara de incubação (J). Na figura K é possível observar o panorama geral das seis câmaras de incubação, em que duas estão a indicar uma situação de alarme (câmara 1, cor vermelha) e de aviso (câmara 4, cor amarela). Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 16** - Representação simbólica de várias situações referentes a alarmes (A a G) e a avisos (H e I). A e B são referências a alarmes relativos a uma mudança de temperatura, ativado numa situação de subida ou descida de 0,4 °C, e a uma falha ou erro no sistema de aquecimento, respetivamente. Por sua vez, C e D representam, respetivamente, situações de alarme em que há uma variação da concentração de CO<sub>2</sub> e dos níveis de humidade para além dos aceitáveis. A imagem E representa a situação

em que a tampa da câmara de incubação foi deixada aberta pelo utilizador, situação que deve ser de evitar, e F simboliza a ocorrência de alguma falha intrínseca à câmara de incubação, alarmando para uma situação de reparo imediato da mesma câmara. Por fim, H e I correspondem, respetivamente, a avisos de falha de comunicação entre o sistema Geri+ de bancada e o sistema externo computacional, seja na falha de captação de imagem ou a nível do acesso a uma câmara de incubação. Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 17** - Representação da interface apresentada na seleção e ampliação de um determinado micro-poço de uma câmara de incubação. Para além da devida identificação do micro-poço correspondente com o nome da paciente em questão (I31 e 32, respetivamente), uma imagem ampliada do embrião pode ser obtida, de forma a visionar todas as etapas de desenvolvimento do mesmo, tanto pelo manuseio, para a esquerda (retrocessos) ou direita (avanço) da barra temporal indicada com a letra e número I37. O tempo inicial de inseminação é apresentado na barra azul escura do canto inferior esquerdo (I36) e o tempo total de captação de imagem, desde o início da captação de imagens associadas ao desenvolvimento do embrião em questão, é, igualmente, indicado (I35), de modo a que o embriologista acompanhe todos os momentos em pormenor e conheça a etapa de desenvolvimento em que o embrião se encontra em cada momento. Para embriões avaliados pela opção *Eeva test*, o tipo de microscopia correspondente é de campo escuro, pelo que esta opção terá de ser selecionada para estes casos em específico (I34). Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 18** - Representação do sistema e *software* Geri Connect, o sistema computacional externo com ligação ao sistema Geri+ inserido no interior do laboratório de embriologia. Existe uma estreita ligação e troca de dados entre os dois sistemas, de modo que haja a mesma informação de todos os casos contida nestes dois segmentos e que novos dados sejam atualizados em ambos quando introduzidos em cada um. O servidor do Geri Connect apresenta uma capacidade de armazenamento de 5,3 TB (*Terabytes*), de modo a que todas as gravações referentes a todos os pacientes cujos embriões são monitorizados pelo Geri+ sejam registadas e armazenadas. Disponível em <https://www.professionalsinfertility.com>. Acedido a 10 de agosto de 2017.

**Figura 19** - Representação da interface de acesso a cada câmara de incubação e micro-poços correspondentes pelo Geri Connect. Aquando da seleção desta opção em particular, o controlo de toda a captação de imagem do embrião é possível, apresentando, no canto inferior direito, todos os comandos para parar, pôr em pausa, visualizar *frames* antigos ou mais recentes na escala temporal (permitindo a alteração

da frequência de captação de imagem em cinco, dez ou trinta minutos), alterar os planos de focagem, mudar para outros micro-poços e, ainda, exportar dados relativos às imagens do embrião selecionado no momento. Igualmente, a categorização dos embriões com base nos diferentes símbolos (cujo significado está expresso na secção “3.3.2.5. Acesso a cada câmara de incubação: observação e marcação do estado embrionário”) pode ser efetuada, também, com recurso a esta parte integrante. Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 20** - Representação da opção de seleção do sistema de avaliação Eeva *test* disponibilizado pelo Geri+ para casos em que seja necessário fazer o seguimento automático com recurso a esta ferramenta. Adaptado de Genea BIOMEDX.

**Figura 21** - Parâmetros morfocinéticos e suas respetivas alocações nas diversas etapas de desenvolvimento embrionário, desde t0 (tempo de iniciação da inseminação para FIV e tempo intermédio para ICSI) até ao momento de formação do blastocisto após inseminação (tB). Pnf representa *pronuclear (PN) fading (f)* ou desaparecimento pronuclear. t2 a t8 correspondem a parâmetros morfocinéticos indicadores do tempo decorrido desde a inseminação até ao estabelecimento do estado de duas a oito células embrionárias. Os primeiro, segundo e terceiro ciclos celulares embrionários (ECC1, 2 e 3, sendo que ECC significa *Embryonic Cell Cycle*) incluem o primeiro ciclo celular (cc1), o segundo ciclo celular, subdividido em duas partes (cc2a, culminando no embrião com três células embrionárias e cc2b, terminando o embrião com quatro células embrionárias), cuja duração total pode ser determinada pela diferença entre t4 e t2, e, por fim, o terceiro ciclo celular, subdividido em quatro eventos de mitose (cc3a a cc3d, sendo que o embrião progride para fases de cinco a oito células embrionárias). A duração deste último parâmetro relativo pode ser determinada pela diferença entre t8 e t4. tM representa o parâmetro morfocinético correspondente ao tempo decorrido desde t0 até ao estabelecimento do estado de mórula (M representa *morula* ou mórula). tSB e TB são parâmetros representativos do estado de blastocisto, em que tSB corresponde ao tempo decorrido desde t0 até ao momento de começo da blastulação (SB significa *Star Blastulation*) e até à formação terminada e expansão total do blastocisto (tB, em que B representa *blastocyst*). Os parâmetros relativos s2 e s3 correspondem a parâmetros de sincronização de divisões celulares e do padrão de clivagem, respetivamente (s significa *synchronization* ou sincronização). s2 é determinado pela diferença entre t4 e t3 e s3 pela diferença entre t8 e t5. Adaptado de Campbell, 2015a.

**Figura 22** - Esquema de atribuição da classificação de embriões com base no *outcome* de implantação (KID). KID representa *Known Implantation Data*, que tanto pode obter uma classificação positiva (*Positive*) como negativa (*Negative*). Assim, na situação de confirmação de uma gravidez, um nascimento vivo (*live birth*) reflete uma atribuição KID+ aquele embrião, contudo, na verificação de um aborto (*Pregnancy loss*), a categorização passa de positiva para negativa. O número de embriões transferidos, quer seja por transferência simples (*Single ET*) quer seja por transferência dupla (*Double ET*), deverá ser contabilizado para a verificação da proporção de embriões KID + e KID-. Outras situações divergentes podem, igualmente, ser contabilizadas, na ausência de resultados assertivos (*No data*, por exemplo, em situações de falha de implantação, *implantation lost*). Adaptado de Campbell, 2015a.

**Figura 23**- Modelo hierárquico, proposto por Meseguer *et al.* (2011), composto por dez categorias principais de modo a classificar os embriões de acordo com o seu potencial de implantação. O parâmetro morfocinético t5 corresponde ao tempo ocorrido desde a inseminação até à finalização do estado embrionário de cinco blastómeros e, por sua vez, s2 e cc2 correspondem ao tempo de sincronização das divisões mitóticas entre o estado de duas e de quatro blastómeros e a duração do segundo ciclo celular, respetivamente. Segundo este modelo, um embrião é considerado A+ se, primeiramente, tiver morfologia ótima e ausência de parâmetros de exclusão (como blastómeros desiguais no estado de duas células, clivagem direta e multinucleação no estado de quatro células). Caso respeite esses primeiros critérios, a primeira etapa da classificação corresponde a um t5 dentro dos limites considerados ótimos (entre 48,8 e 56,5 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Caso cumpra este requisito é verificado, de seguida, se s2 se inclui nos *timings* perfeitos (duração inferior a 0,76 horas (h)). Por sua vez, a última etapa de classificação é a verificação de que cc2 tem uma duração aceitável (inferior a 11,9 horas). Contrariamente, uma classificação D- representa um embrião com morfologia aceitável e sem parâmetros de exclusão, embora t5, s2 e cc2 estejam fora dos limites aceitáveis. Os embriões E são descartados devido a conterem elementos que permitem a sua exclusão e, por fim, embriões com morfologia não adequada são automática e imediatamente classificados na categoria F. Adaptado de Mesgauer *et al.*, 2011.

**Figura 24** - Representação dos limites temporais ótimos para os parâmetros apresentados t2, t3, t5, cc2 e s2, comparando categoriais de blastocistos com qualidade distinta (B- *Blastocyst* ou blastocisto, GMB- *Good Morphology Blastocyst* ou blastocistos de alta qualidade). Os números apresentados em cima das colunas correspondem às percentagens de blastocistos enblogados em cada categoria e os números contidos nas

colunas correspondem ao número total de blastocistos nas mesmas. Os asteriscos representam a verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos. Adaptado de Cruz *et al.* (2012).

**Figura 25** - Resultados obtidos relativos à taxa de implantação nas três categorias propostas do Eeva *test*, apresentando diferenças significativas entre os grupos respetivos (Alto *versus* médio,  $P < 0,0001$ ; Médio *versus* Baixo,  $P = 0,0004$ ). Os números entre parêntesis correspondem ao número de embriões integrados em cada categoria deste sistema de avaliação em relação ao número total considerado e a proporção em percentagem é, igualmente, referida. Adaptado de VerMilyea *et al.*, 2014.

**Figura 26**- Representação da variação dos parâmetros morfocinéticos t2, t3, t4, t5, cc2 e s2 entre grupos embrionários implantados e não implantados. É notória a diferença entre estes dois grupos, relevando que, para o segundo, a variação dos intervalos de tempo de ocorrência é maior e mais difusa relativamente aos do primeiro grupo. Tempo apresentado em horas (h). t2 a t5 correspondem a parâmetros morfocinéticos indicativos do tempo decorrido desde a inseminação até ao estabelecimento dos estados de dois, três, quatro e cinco blastómeros e os parâmetros relativos cc2 e s2 correspondem, respetivamente, à duração do segundo ciclo celular e ao tempo de sincronização das divisões mitóticas do estado de dois ao estado de quatro blastómeros. As barras pretas correspondem aos intervalos de tempo de parâmetros morfocinéticos obtidos em embriões com fracas potencialidades de desenvolvimento e as barras brancas representam a situação inversa, embriões cujo desenvolvimento culminou na formação de um blastocisto. Adaptado de Milewski *et al.*, 2015.

**Figura 27**- Modelo proposto por Basile e colaboradores em 2015. O modelo está dividido em dez categorias principais, de A a F, de acordo com os parâmetros t3 (tempo decorrido desde t0 até ao estado de três blastómeros), duração de cc2 (segundo ciclo celular) e t5 (tempo decorrido desde t0 até ao estado de cinco blastómeros). O primeiro parâmetro, e mencionado como o mais significativo, t3 (entre 34 a 40 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação), corresponde ao primeiro critério morfocinético a ser considerado se o embrião apresentar uma morfologia aceitável e ausência de critérios de exclusão. Assim, se os embriões testados apresentarem o parâmetro t3 dentro dos limites aceitáveis, o próximo passo é a análise da duração do segundo ciclo celular (cc2). Por sua vez, se os limites temporais de cc2 ocorrerem entre as 9 e 12 horas (h), então é atribuída ao embrião a categoria A. As categorias A+ e A serão, posteriormente, atribuídas consoante os embriões apresentarem limites temporais de t5 dentro ou fora da gama aceitável, respetivamente.



Contrariamente, se os embriões não evidenciarem um valor de cc2 nos limites de tempo referidos, então os embriões nesta situação enquadram-se na categoria B. Mais uma vez, o parâmetro t5 irá decidir se é atribuída uma classificação B+ (dentro dos limites indicados) ou B (fora dos limites indicados) aos embriões em avaliação. No entanto, se determinados embriões apresentam t3 com limites variáveis da situação normal, restam duas classificações possíveis: C, se a duração de cc2 estiver dentro dos limites aceitáveis ou D se ocorrer precisamente o contrário. Mais uma vez, t5 irá decidir entre a atribuição das classificações C+ ou D+ (se entre 45 a 55 hpi) e C ou D (se fora do limite de tempo 45 a 55 hpi). As duas últimas categorias, E e F, são as que ditam que o embrião não pode ser considerado de qualidade aceitável, já que a classificação E indica que podem ter ocorrido situações de clivagem direta, desigualdade de tamanho de blastómeros ou multinucleação, enquanto F infere que a prévia visualização do embrião indica uma morfologia não aceitável. Adaptado de Basile *et al.*, 2015.

**Figura 28-** Representação gradual do processo de clivagem direta, consistindo no fenómeno correspondente à passagem de um blastómero (primeiro *frame*) diretamente para três blastómeros (último *frame*). A sequência de imagens foi captada pelo EmbryoScope® às 30,9 hpi, 31,7 hpi, 32,5 hpi e 33,4 hpi, respetivamente (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Bellisford e Carter, 2015.

**Figura 29 -** Representação do processo de clivagem reversa, consistindo no fenómeno correspondente a uma regressão no processo de desenvolvimento embrionário contínuo e padronizado. É possível verificar, por esta sequência de imagens, que um embrião com blastómeros já individualizados regrediu no desenvolvimento apresentando, no final (último *frame*) um número de blastómeros distinto e inferior relativamente à primeira imagem. A sequência de imagens foi captada pelo EmbryoScope® às 56,2 hpi, 58,2 hpi, 59,5 hpi e 61,2 hpi, respetivamente (hpi- *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Hulme, 2015.

**Figura 30 -** Representação de uma imagem captada pelo aparelho *time-lapse* EmbryoScope®, onde é possível visualizar, claramente, um embrião no estado de dois blastómeros binucleado (presença de dois núcleos em ambos os blastómeros). Adaptado de Shearer, 2015.

**Figura 31 -** Representação de um embrião com a presença de agregados de retículo endoplasmático liso no citoplasma embrionário, evidenciando a presença de uma estrutura com aspeto distinto e granuloso do restante citoplasma (na parte média e do lado direito da imagem apresentada). A fotografia deste embrião foi captada às 30,6 hpi

pelo EmbryoScope® (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Drezet, 2015.

**Figura 32** - Representação de uma sequência de imagens captadas pelo EmbryoScope® correspondentes ao início da fase de blastulação e a evolução da fragmentação ao longo desta etapa, com aparecimento inicial ainda na etapa de mórula. Os tempos de ocorrência correspondentes são 63,9 horas, 73,8 hpi, 81,6 hpi, 94,9 hpi, 96,2 hpi, 101, 5 hpi, 102,7 hpi e, por último, 109,9 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). É possível observar, para este caso em específico, a situação descrita anteriormente de diminuição da fragmentação, desde o estado de mórula até ao estabelecimento do estado de blastocisto. Adaptado de Montgomery, 2015a.

**Figura 33** - Representação de uma sequência de imagens capturadas pelo EmbryoScope® evidenciando a evolução da presença de vacúolos ao longo do desenvolvimento do embrião nas fases iniciais de progressão embrionária. Às 20 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação) é possível observar a existência de vários vacúolos com tamanhos distintos, sendo que, cerca de duas horas depois (22,8 hpi) verifica-se a permanência inquestionável dos mesmos, embora com menor tamanho. No estado de dois blastómeros (29 hpi), os vacúolos persistem e continuam a evidenciar a sua presença, aparentemente, até ao estado de oito blastómeros, às 65,9 hpi. Adaptado de Smith, 2015.

**Figura 34** - Representação do processo de extrusão do segundo glóbulo polar após finalização da segunda divisão meiótica induzida pela ocorrência da fertilização. No espaço de duas horas o oócito, constituído pelo primeiro glóbulo polar resultante da primeira divisão meiótica (a), passa de uma situação de paragem na segunda divisão meiótica (em prófase I) para a sua finalização, resultando num oócito com dois glóbulos polares (B). O par de imagens sequenciais foi captado pelo EmbryoScope®, em dois momentos distintos, às 0,4 hpi e 2,4 hpi (em que hpi corresponde a *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Lynch e Regueira, 2015.

**Figura 35-** Ilustração do processo de aparecimento dos dois pronúcleos, feminino e masculino, após a ocorrência de fertilização. A extrusão do segundo glóbulo polar já ocorreu, igualmente, devido a este último processo. A sequência representada resultou da compilação de imagens captadas pelo EmbryoScope® em vários momentos do desenvolvimento embrionário (respetivamente às 8,2 hpi, 12,5 hpi, 22,5 hpi e 28, 5 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Kellam e Murphy, 2015.

**Figura 36-** Representação da evolução gradual do processo de desaparecimento pronuclear ou singamia, no qual se verifica a fusão dos dois pronúcleos, feminino e masculino. O embrião econtra-se, aquando da finalização deste fenómeno, em preparação para as sucessivas divisões celulares que se seguem. As fotografias foram obtidas pelo EmbryoScope®, representando quatro momentos sucessivos, incluindo a aproximação dos pronúcleos na zona equatorial do zigoto (às 25,9 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação), o começo da fusão dos dois pronúcleos (às 26 hpi) e, por fim, as etapas finais de finalização da singamia e preparação para a primeira divisão mitótica (às 26,5 hpi e 26,7 hpi). Adaptado de Kellam e Murphy, 2015.

**Figura 37 -** Sequência de imagens que traduz o contínuo desenvolvimento de um embrião, obtido por ICSI, em fase de clivagem, obtidas pelo EmbryoScope®. As letras A a E representam, respetivamente, as diferentes fases de clivagem, correspondendo a um embrião com dois, quatro, cinco, seis, sete e oito blastómeros. Por ordem cronológica, os parâmetros morfocinéticos correspondentes a cada fase são t2 de 26,5 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação), t4 de 41,3 hpi, t5 de 53,1 hpi, t6 de 55,3 hpi, t7 de 57,1 hpi e, por fim, t8 de 60,9 hpi. Adaptado de Campbell, 2015b.

**Figura 38-** Representação do processo de compactação, associado aos parâmetros morfocinéticos de começo deste fenómeno celular (com tSC, em que SC corresponde a *start of blastulation*, de 60,9 hpi, em que hpi corresponde a *hours post-insemination* ou horas após inseminação) e estabelecimento do estado de mórula (com tM, em que M representa *Morula* ou mórula, de 86,9 hpi). As imagens foram obtidas a partir de uma sequência cinematográfica obtida pelo EmbryoScope®. Adaptado de Campbell, 2015b.

**Figura 39-** Representação sequencial da etapa inicial de blastulação, representativa da transição celular de mórula para blastocisto. É possível observar, gradualmente, o começo da diferenciação das camadas que constituem o blastocisto, trofoectoderme e massa celular interna e da expansão da cavidade blastocística. As imagens sequenciais foram captadas pelo EmbryoScope®, com começo às 91,7 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação) e terminação às 107,0 hpi. Adaptado de Montgomery, 2015b.

**Figura 40-** Representação sequencial do processo de destacamento do blastocisto da zona pelúcida e sua posterior eclosão. Todas as imagens, desde a ruptura da zona pelúcida até ao começo da saída do blastocisto pela pressão exercida pela constante expansão da sua cavidade e da saída completa, foram obtidas através do sistema *time-*

*lapse* EmbryoScope® num intervalo de tempo entre as 122,9 hpi e as 140,6 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Kellam, 2015.

**Figura 41-** Compilação das imagens anteriores com a finalidade de criar a ilusão da evolução temporal e ininterrupta do desenvolvimento embrionário, desde o processo de fertilização até à eclosão do blastocisto. Todas as imagens foram adquiridas e adaptadas de Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, Nova Iorque: CRC Press.

**Figura 42-** Esquema proposto por Gardner e Schoolcraft (1999) para a avaliação da qualidade de blastocistos com base em três critérios principais: grau de expansão (categorias 1 a 4), características da massa celular interna (categorias de A a C) e da trofoectoderme (categorias de A a C). A classificação 4AA corresponde à categorização de excelência de qualidade para a classificação de um blastocisto.

## Lista de abreviaturas

**ASRM** - *American Society for Reproductive Medicine*

**cc1 ou ECC1** - primeiro ciclo celular (cc- *cell cycle*) ou ciclo celular do embrião (ECC- *embryonic cell cycle*)

**cc2 ou ECC2** - segundo ciclo celular (cc- *cell cycle*) ou ciclo celular do embrião (ECC- *embryonic cell cycle*)

**cc3 ou ECC3** - terceiro ciclo celular (cc- *cell cycle*) ou ciclo celular do embrião (ECC- *embryonic cell cycle*)

**CEIE** - Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade

**CMOS** - *Complementary Metal Oxide Semiconductor*

**CO<sub>2</sub>** - fórmula química da molécula de dióxido de carbono

**COC**- *Cumulus-Oocyte Complexes* ou complexos cumulus-oócito

**dB** - Duração (em horas) da fase de blastulação (B- *blastulation* ou blastulação). Correspondente ao intervalo de tempo entre o início e o fim da blastulação (tB-tSB)

**dcom** - Duração (em horas) da etapa de compactação (com- *compaction* ou compactação). Correspondente ao intervalo de tempo entre o início e fim da compactação (tM-tSC)

**dexp** - Duração (em horas) da fase de expansão do blastocisto (exp- *expansion* ou expansão). Corresponde ao intervalo de tempo entre o fim da blastulação e o início da eclosão (tHN-tB).

**DGPI** - Diagnóstico Genético Pré-Implantação

**Eeva™** - *Early Embryo Viability Assessment*

**ESHRE** - *European Society of Human Reproduction and Embryology*

**et al.** - do latim *et alii*, referente a outros

**FDA** - *Food and Drugs Administration*

**FISH** - *Fluorescence In Situ Hybridization*

**FIV** - Fertilização *In Vitro*

**Geri**® - Genea Embryo Review Incubator

**GnRH** - *Gonadotropin-Releasing Hormone* ou fator libertador de gonadotrofinas

**hCG** - *human Chorionic Gonadotropin* ou Gonadotrofina coriónica humana

**HEPA** - *High Efficiency Particulate Air*

**hpi** - *hours post-insemination* ou horas pós-inseminação

**ICSI** - *Intracytoplasmic Sperm Injection* ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides

**KID** - *Known Implantation Data* ou dados de embriões com implantação conhecida. KID+ representa o grupo de embriões com implantação confirmada e KID- o grupo de embriões que, contrariamente, são conhecidos como não implantados

**LED** - *Light Emitting Diode*

**MCI** - Massa Celular Interna

**MEA** - *Mouse Embryo Assay*

**nm** - unidade de comprimento de onda de radiação em nanómetros

**O<sub>2</sub>** - fórmula química da molécula de oxigénio

**°C** – Graus celsius, indicador de temperatura

**OR** - *Odd ratio*, indicador de probabilidade de um acontecimento

**P2** - termo igualmente usado para referência ao segundo ciclo celular (cc2)

**P3** - termo igualmente usado para referência a sincronização de divisões celulares entre o estado de duas e quatro blastómeros (s2)

**PZD** - *Partial Zona Dissection*

**RCT** - *Randomized Control Trial*

**RHA** - Reprodução Humana Assistida

**ROS** - *Reactive Oxygen Species* ou radicais livres de oxigénio

**rRNA** - RNA ribossomal

**s2** - parâmetro de sincronização (s de *synchronization*) de divisão mitótica entre o estado de dois e quarto blastómeros

**s3** - parâmetro de sincronização (s *synchronization*) do padrão de clivagem referente a divisões mitóticas do terceiro ciclo celular, do estado de cinco a oito blastómeros

**SET** - *Single Embryo Transfer*

**SUZI** - Subzonal Insemination

**t0** - tempo (em horas) inicial de inseminação no caso de FIV e, no caso de ICSI, referente a um tempo intermédio desde o começo até à fase de injeção

**t2** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao estado de um embrião com dois blastómeros (zigoto)

**t3** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao estado de um embrião com três blastómeros

**t4** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao estado de um embrião com quatro blastómeros

**t5** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao estado de um embrião com cinco blastómeros

**t8** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao estado de um embrião com oito blastómeros (a entrar em compactação)

**TB** - *terabytes*

**tB ou tByz** - Tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao estado de formação completa de blastocisto (B- *blastocyst* ou blastocisto). tByz corresponde à mesma etapa, considerando “y” como a morfologia da massa celular interna e “z” como a morfologia da trofoectoderme

**TE** - Trofoectoderme

**tEB ou tEyz** - Tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até ao início da expansão do blastocisto (EB- *expansion of blastocyst* ou expansão do blastocisto). tEyz corresponde à fase de desenvolvimento, considerando “y” como a morfologia da massa celular interna e “z” como a morfologia da trofoectoderme

**tHDyz** - Tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até à fase de eclosão completa do blastocisto da zona pelúcida (H- *hatching* ou eclosão). “y” simboliza a morfologia da massa celular interna e “z” a morfologia da trofoectoderme

**tHNyz** - Tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até a uma fase intermédia entre o fim da expansão e o início da eclosão do blastocisto da zona pelúcida (H- *Herniation*). “y” simboliza a morfologia da massa celular interna e “z” a morfologia da trofoectoderme

**tM** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até à fase de estabelecimento de mórula (M- *Morula* ou mórula)

**tPB2** - momento de extrusão do segundo glóbulo polar (PB- *polar body* ou glóbulo polar)

**tPN** - momento de verificação da ocorrência da fertilização

**tPNa** - tempo (em horas) desde a inseminação até ao aparecimento de dois pronúcleos, feminino e masculino (PNa- *pronuclear appearance* ou aparecimento dos pronúcleos)

**tPNf** - tempo (horas) desde a inseminação até ao desaparecimento dos pronúcleos e fusão do material genético dos mesmos ou singamia (PNf- *pronuclear fading* ou desaparecimento dos pronúcleos)

**tSB** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até à fase de início da blastulação (SB- *start of blastulation* ou começo da blastulação)

**tSC** - tempo decorrido (em horas) desde a inseminação até à fase inicial da compactação (SC- *start compaction* ou começo da compactação)

**tZ** - momento de classificação do estado dos pronúcleos

**Valor P** - indicador de um resultado de teste estatístico, com valor de significância de  $P < 0,05$

**VHS** - *Video Home System*

™ - símbolo para marca comercial não registada

® - símbolo para marca comercial registada

μL - unidade de volume em microlitros

μm - unidade de distância em micrómetros



# Capítulo I

## Infertilidade e sociedade

“(...) aparentemente, o papel da paternidade parece ser um grande objetivo para muitos homens e mulheres. (...) a fertilidade é assumida como um direito humano básico e a paternidade como um marco necessário de desenvolvimento”

# 1. Infertilidade e causas adjacentes

A capacidade de gerar um descendente parece ser um dos objetivos de vida de muito casais, não só para constituir uma família, mas também para preencher a tendência biológica de procriar e de ser considerados como indivíduos adultos e férteis na sociedade (Daniluk, 1986). Contrariamente, um casal que seja privado desta prioridade pode vir a enfrentar vários problemas sociais, económicos, psicológicos e mesmo de saúde, visto que, entre outros fatores de risco, esta incapacidade pode causar a privação de proteção aquando do momento de ato sexual (Polis *et al.*, 2017).

Atualmente, a infertilidade é uma patologia mundial que afeta milhares de casais em todo o mundo e na reflete-se na incapacidade de conceção após um ano de relações sexuais desprotegidas (WHO, 2016) ocorrentes no período fértil feminino (Evers, 2002 em Gnoth *et al.*, 2005). A expansão deste tipo patológico é de larga escala, havendo a estimativa que cerca de 60 a 80 milhões de casais poderão ser afetados por esta patologia<sup>1</sup> (Rutstein e Shah, 2004 em Kumar e Singh, 2016). Por sua vez, estima-se igualmente, que a sua incidência ao longo das várias regiões do globo é variável e difusa, tendo sido registado, em 2009, que o continente africano suporta um maior número de casais a sofrer desta patologia, fruto de uma elevada transmissão de doenças sexualmente transmissíveis (Roupa *et al.*, 2009).

Assim, na verificação de um problema de infertilidade, todos os fatores do casal, incluindo o seu estilo de vida, frequência do ato sexual, ocupação, historial de doenças, entre outros, devem ser considerados para a avaliação médica da patologia, de modo a identificar a origem da dificuldade de conceção.

Causas distintas podem ser apontadas como a origem da impossibilidade de gerar descendentes, tanto em mulheres como em homens. A idade continua a ser um fator determinante na fertilidade de uma mulher, visto que, assiste-se a um decréscimo da reserva ovárica e a um aumento da incidência de anormalidades genéticas (Gnoth *et al.*, 2005 e Baird *et al.*, 2005 em Roupa *et al.*, 2009). Estão reportados fatores de contribuição negativa para a conceção, tais como incapacidade de conceção e maior risco de abortamento, associados, igualmente, ao envelhecimento da mulher. Contudo a infertilidade entre mulheres pode ter origem em diversos pontos, desde o fator uterino, associado a causas ocorrentes a nível do útero, fator tubar, associado a patologias a nível das trompas de Falópio e até ao fator ovulatório, representativo de 25 % dos casos de infertilidade (ASRM, 2012).

---

<sup>1</sup> Segundo a diretiva número 9 da Organização Mundial de Saúde, 2004.

No caso do fator uterino, vários fatores podem estar associados a este tipo de problema, incluindo problemas anatómicos (como fibromiomas uterinos ou anormalidades na cavidade uterina, ASRM, 2012), tecido cicatricial ou a presença de pólipos que podem dificultar a passagem dos gâmetas masculinos em direção às trompas de Falópio (CEIE, 2016). O estudo publicado por Roupa e colaboradores, em 2009, aponta para uma incidência de cerca de 20% para infertilidade causada por outro fator extremamente importante na mulher, o padrão e frequência de ciclos menstruais (Roupa *et al.*, 2009). Adicionalmente, a endometriose, correspondente à presença de tecido tipo endometrial fora do seu sítio de origem (Bullei *et al.*, 2010), constitui um sério problema associado a esta categoria de infertilidade (ASRM, 2012) originando situações anatómicas indesejáveis que podem comprometer a capacidade de concepção, como a presença de tecido cicatricial ou adesões (Bullei *et al.*, 2010).

Relativamente ao fator tubar, associado a uma obstrução ou dano nas trompas de Falópio, é representativo de cerca de 35 % dos casos de infertilidade feminina (ASRM, 2012) e a sua deteção pode ser protagonizada por testes de diagnóstico específicos com seguimento ecográfico, como a histerosalpinografia (La Fianza *et al.*, 2014). Para além de problemas anatómicos, a ocupação das mulheres constitui, igualmente, um fator a ser considerado na avaliação de infertilidade, de modo que o estilo de vida pode influenciar grandemente a capacidade de um casal gerar um filho (Roupa *et al.*, 2009).

No caso masculino, a infertilidade pode englobar problemas anatómicos, como a criptorquidia, uma patologia em que os testículos não descem da cavidade abdominal e não se alojam no escroto na época do nascimento (Toppari *et al.*, 2014), prejudicando a produção de espermatozóides, causas genéticas associadas, por exemplo, a microdeleções no cromossoma Y e aberrações cromossomais (Stouffs *et al.*, 2014) ou o abuso de drogas ou consumo de tabaco, entre outros. Pensa-se que o consumo do tabaco causa situações de infertilidade, principalmente, pela produção de radicais livres de oxigénio (ROS, *Reactive Oxygen Species* ou radicais livres de oxigénio) que aumentam os níveis de stress oxidativo e podem causar, para além deste desequilíbrio, danos estruturais e consequentes mutações no DNA dos gâmetas masculinos (ASRM, 2004). Estas situações podem comprometer a morfologia destas estruturas celulares, bem como a sua capacidade de cumprir a sua tarefa no sistema reprodutor feminino, causando, desta forma, a impossibilidade da criação de um embrião.

Outro tipo de infertilidade, a infertilidade idiopática, corresponde a um tipo de patologia cuja causa não é totalmente conhecida e representa cerca de 10% dos casos de infertilidade (ASRM, 2012). De uma maneira geral, tanto mulheres como homens podem sofrer deste tipo de infertilidade, podendo haver evidências de problemas a nível da qualidade dos gâmetas femininos ou problemas funcionais no caso dos gâmetas

masculinos, como a possibilidade da existência de anormalidades genéticas (ASRM, 2012). A presença de ROS, tanto no caso feminino como no caso masculino, sendo que as consequências da presença de certos compostos oxidantes e a falta de equilíbrio entre os níveis oxidantes e antioxidantes nas células pode provocar, em último caso, situações de comprometimento do desenvolvimento do embrião ou mesmo abortos espontâneos (Agarwal, 2005).

Deste modo, todos os casais devem ser aconselhados devidamente depois da deteção do fator que contribui para a infertilidade do mesmo e uma das soluções para atingir a conceção é a aplicação de técnicas de reprodução humana assistida (Karande *et al.*, 1999 em Gnoth *et al.*, 2005).

## Capítulo II

### De *in vivo* para o *in vitro*

“O início da FIV foi um evento inspirador. Lesley Brown e o seu marido John (...) falharam na concepção natural durante nove anos de casamento (...). Um ginecologista do hospital Oldham general, em Manchester, Reino Unido, avisou-a para tentar uma nova técnica experimental (...). Com o nascimento de Louise Brown, o mundo celebrou o início de uma nova era nas tecnologias de reprodução humana assistida”

Kamel, R. M. (2013). Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *Journal of reproduction and infertility*, 14 (3), p.96.

## 2. Técnicas de reprodução humana assistida

Face aos problemas de infertilidade ocorrentes desde cedo na história do Homem, a ciência tentou desbravar esta patologia global, unindo várias áreas da saúde, como medicina e biologia. Consequentemente, as técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA) surgiram, permitindo revolucionar o processo reprodutivo natural como o conhecemos e, em última instância, a conceção de um descendente. Assim, a RHA pode ser definida como o conjunto de metodologias que admitem a conceção num casal considerado infértil de forma artificial e programada, de modo a atingir, em última instância, uma gravidez viável (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009).

### 2.1. Introdução à ciência da reprodução humana *in vitro*

Os estudos pioneiros de investigação na área da reprodução não foram efetuados, de todo, em humanos, devido a uma grande complexidade de visualização dos processos reprodutivos e de desenvolvimento *in vivo*, mas também *in vitro*. Face ao desconhecimento elevado na área humana, outros seres vivos, como os anfíbios e ouriços-do-mar, eram escolhidos como material biológico de estudo, já que todos os processos de fertilização e desenvolvimento embrionário eram claramente visíveis, não havendo a necessidade de grandes e sofisticados aparelhos para tal tarefa (Bavister, 2002). A crescente evolução das técnicas de microscopia, assim como a perceção da necessidade da existência de meios de cultura apropriados para a incubação dos embriões permitiram que fossem, primordialmente, visualizados os processos mais básicos na espécie humana, como a penetração do espermatozoide na membrana do ócito (Bavister, 2002).

O primeiro nascimento vivo registado e resultante de um processo de RHA ocorreu nos anos 70 e a sua realização foi impulsionada devido a uma patologia feminina grave do casal, um bloqueio tubal bilateral (Kamel, 2013). O culminar do uso destas técnicas, neste caso, resultou no nascimento de Louise Brown, a primeira “bebé proveta”. Este acontecimento fenomenal integra-se na história da medicina da reprodução como um impulso fundamental para esta área da ciência e este nascimento de um bebé saudável, feito com conceção artificial, promoveu não só o aperfeiçoamento do próprio procedimento que o criou como também o incremento do sucesso da sua realização (Kamel, 2013). Inúmeros foram os nascimentos que se seguiram nos anos 80 e as descobertas feitas por muitos nomes da história da reprodução assistida, como Alan

Handyside na introdução da biopsia celular para o diagnóstico pré-implantação (Kamel, 2013).

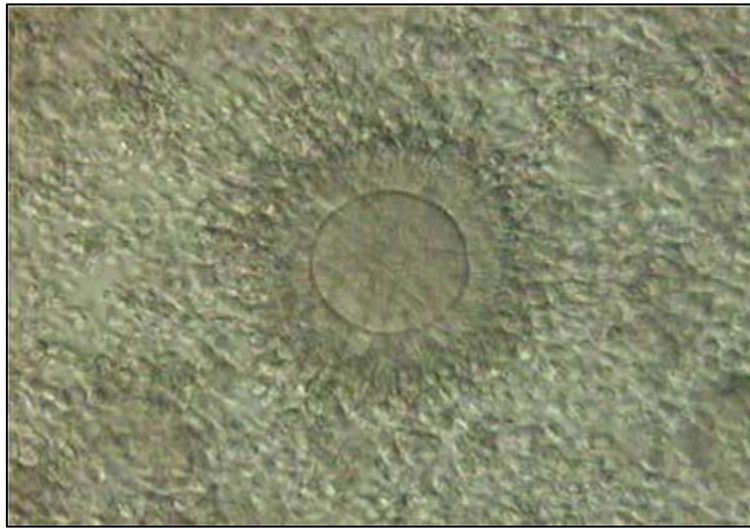
Segundo estimativas documentadas por alguns autores é possível verificar um incremento no número de ciclos protagonizados ao longo dos anos, de modo que, em 2006, foram já documentados cerca de dois milhões de nascimentos de bebés criados por técnicas de RHA em todo o mundo, e, considerando apenas os EUA, o número de ciclos de FIV ou ICSI protagonizados atingiu a marca dos 100 000 (Kovacs, 2014).

Existem três técnicas de reprodução assistida atualmente protagonizadas nas clínicas e centros de tratamento para infertilidade, incluindo a inseminação artificial, fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *Intracytoplasmic Sperm Injection*). No entanto, apenas as duas últimas técnicas serão abordadas devido a serem as únicas que englobam todo o processo de estimulação hormonal para recolha dos oócitos e posterior cultura embrionária em condições específicas. Os seguintes segmentos permitem, precisamente, dar a conhecer a importância da concretização destas técnicas para o tratamento de casais inférteis.

## 2.2. Procedimentos *in vitro* na área da ciência da reprodução

Antes da tomada de decisão de qual técnica tem de ser protagonizada para um determinado caso é necessário conhecer os problemas que causam a infertilidade e saber todo o historial do casal em questão, incluindo as suas ocupações, idade, práticas sexuais, presença de doenças transmissíveis, entre outros assuntos abordados pelo médico especialista. Independentemente da causa de infertilidade ser masculina ou feminina, se se tratar realmente da incapacidade de conceção, tanto a técnica de FIV como de ICSI incluem, como mencionado, um processo inicial de estimulação ovárica, que permite o desenvolvimento de mais do que um folículo maduro ou de Graaf, consistindo na administração de análogos de GnRH (*Gonadotropin Releasing Hormone* ou fator libertador de gonadotrofinas, agonista ou antagonistas) (Hugues e Cédrin-Durnerin, 2009) e de hCG (*human Chorionic Gonadotropin* ou gonadotrofina coriônica humana), para o último caso 36 horas antes do dia de punção folicular para completar a maturação (Desai *et al.*, 2014). Através da punção folicular, são recolhidos, no ovário, os folículos maduros resultantes da estimulação, apresentando-se na forma de

complexos cumulus-oócito (Cumulus-Oocyte Complexes, COC<sup>2</sup>), ilustrados na figura 1 (Rienzi *et al.*, 2012).



**Figura 12-** Representação de um Complexo Cumulus-Oócito (COC), obtido após punção folicular. Esta estrutura corresponde a um folículo ovárico maduro, com o primeiro glóbulo polar visível, rodeado por células adjacentes da coroa radiata. Adaptado de Rienzi *et al.*, 2012.

Este corresponde, assim, ao procedimento primordial destes dois tipos de técnicas, passando à sua realização propriamente dita (abordada nas secções 2.2.1. e 2.2.2.) e a uma etapa crucial de incubação e monitorização e avaliação morfológica diária, constituindo a transferência de embriões ou blastocistos a última e derradeira etapa destes procedimentos.

---

<sup>2</sup> Estes complexos celulares constituem o oócito rodeado por células da coroa radiata (células das camadas de teca e células da granulosa). O oócito, nesta fase, encontra-se parado em metáfase II e com um glóbulo polar no espaço perivitelino. Devroey e Steirteghem, 2004.



### 2.2.1. Fertilização *In Vitro* (FIV)

Essencialmente, a FIV consiste na promoção artificial da fecundação do oócito através do contacto deste com os espermatozóides (ASRM, 2015). A sua utilização é transversal para casos de infertilidade feminina ou masculina ou para causas idiopáticas (ASRM, 2015). Desta forma, o oócito previamente recolhido por punção folicular é inseminado com um volume de espermatozóides dependente dos seus parâmetros de qualidade, incluindo o número de espermatozóides móveis. Segundo Devroey e Steirteghem (2004), para aplicação com sucesso desta técnica, deverão haver mais de 500 000 espermatozóides móveis progressivos, de modo a que se verifique com mais probabilidade a ocorrência de fecundação (Devroey e Steirteghem, 2004).

### 2.2.2. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI)

Em 1992, uma variação à técnica de FIV foi criada, de modo a atingir um patamar de combate a casos de infertilidade masculina, especialmente no que diz respeito a aspetos relacionados com a composição, estrutura e morfologia dos gâmetas deste sexo (Stephens *et al.*, 2013). Desta forma, em 1992, surgiu no mundo da procriação a conhecida técnica de ICSI, que consiste na deposição de um espermatozóide (devidamente selecionado com base na sua morfologia) no citoplasma do oócito através da perfuração da sua zona pelúcida e membrana citoplasmática (Gilbert e Ringer, 2003), o mais afastado possível da posição do primeiro glóbulo polar. Desta forma, assiste-se à ascensão de uma técnica que permitia, contrariamente à primeira técnica, a seleção prévia dos gâmetas masculinos que iriam fertilizar o oócito, aumentando as probabilidades de obtenção de um embrião.

Várias técnicas antecederam este procedimento inovador, tais como PZD (*partial zona dissection*) ou SUZI (*subzonal insemination*), apresentando um fundamento semelhante à técnica referida, de uma abertura na zona pelúcida para entrada do espermatozóide ou injeção do gâmeta masculino no espaço perivitelino do oócito, respetivamente (Devroey e Steirteghem, 2004).

Igualmente, a realização de ICSI implica que o folículo retirado por punção folicular tenha que ser desnudado, mecânica ou enzimaticamente, para retirar as células circundantes do mesmo. Desta forma, o folículo resultante apenas inclui o oócito e a camada da zona pelúcida. Assim, após este procedimento, e depois do tratamento espermático para separação dos espermatozoides com maior potencial de mobilidade

e penetração, um sistema de microinjetores e pipetas especializadas de injeção permite que este procedimento de ICSI seja realizado.

A técnica de ICSI poderá ser aplicada para casos de infertilidade em ambos os sexos, desde casos masculinos de baixa motilidade de espermatozoides (menos de 500 000 espermatozoides progressivos segundo Devroey e Steirteghem, 2004) ou obtenção de espermatozoides por técnicas de aspiração direta testicular ou do epidídimo, até para casos de infertilidade feminina, na situação de um baixo número de oócitos retirados por punção folicular (Palermo *et al.*, 2009) ou quando um ciclo de FIV não foi bem sucedido no casal em questão (ASRM, 2015). Está registada uma taxa de sucesso desta técnica para diversos casos de infertilidade, correspondendo a 65 a 75 % (ASRM, 2015) dos ciclos de ICSI protagonizados em casais inférteis.

O mesmo conceito da ICSI convencional poderá ser empregado na realização de diagnóstico pré-implantação, em casais com suspeita de anormalidades genéticas.

A realização de ambas as técnicas descritas é sucedida pelo armazenamento de oócitos fecundados em estufas, com condições ideais e divididas por seções correspondentes a cada casal, para serem sujeitos a monitorização detalhada de alguns parâmetros morfológicos inferidos pela observação microscópica do embrião em horários específicos, a partir do dia da inseminação.

## Capítulo III

### *Time-lapse* e o seu papel na ciência da reprodução

“Estas imagens estáticas dos processos dinâmicos de crescimento e mudança limitam, necessariamente, a informação disponível para o observador e alguns processos vivos e de curta duração podem ser perdidos completamente. Adicionalmente, a natureza gradual de mudança na morfologia celular pode ocultar alguns processos, que se tornam óbvios quando condensados num filme coerente”

Payne, D.; Flaherty, S. P.; Barry, M. F.; Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction*, 12 (3), p. 532.

### 3. Conceito de *time-lapse*: do século XIX à atualidade

Após a realização de técnicas como FIV ou ICSI, os embriões obtidos são incubados e submetidos a diárias e precisas visualizações microscópicas, de modo a determinar a evolução do seu progresso. Normalmente, a técnica convencional de observação dita que os embriões devem ser observados pontualmente, sob um microscópio ótico invertido, para determinar aspetos associados à sua morfologia e desenvolvimento (Alpha e ESHRE, 2011).

Trata-se, desta forma, da tentativa de visualizar um processo contínuo sob o ponto de vista estático e, antes dos laboratórios e técnicas modernas, muitos cientistas tiveram a ambição de investigar, descobrir, hipotetizar e inovar o modo como a embriologia humana era abordada. Desde os primórdios destas experiências até à atualidade, assiste-se a uma crescente e revolucionária evolução de ideologias e experiências nesta área ainda em crescimento. Assim, do microscópio invertido, que apenas permite visualizações embrionárias estáticas assiste-se à ascensão de assistir ao desenvolvimento do embrionário de forma contínua e “em movimento”.

Assim, o objetivo deste capítulo centra-se na apresentação da história das ideologias primordiais do movimento aliado à ciência e das primeiras tentativas de observar aspetos celulares associados à embriologia humana.

#### 3.1. Microcinematografia e a sua importância científica

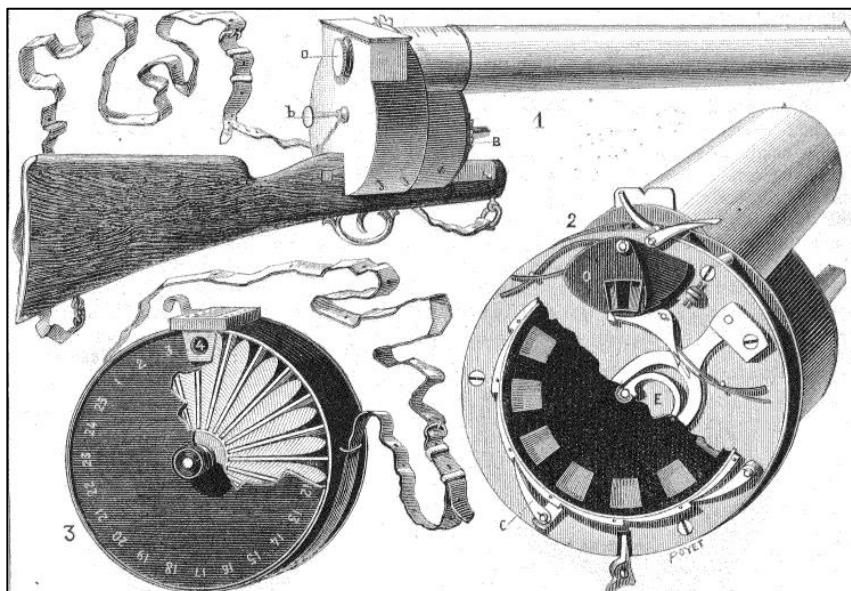
A aliança entre a ciência e os primórdios da captação fotográfica de movimento remonta para o século XIX, tempo este em que Eadweard Muybridge apresentou o seu trabalho de fotografia usando animais e humanos como referência. Através da colocação precisa de várias câmaras fotográficas (24 a 36 no total a uma distância de, aproximadamente, 36 metros) e a da captação de imagem por intervalos de tempo extremamente curtos, Muybridge conseguiu obter imagens estáticas de várias fases do movimento de um cavalo a caminhar que, depois de todos os *frames* tratados, foram colocados numa sequência lógica de modo a fazer um “vídeo” do movimento completo deste mamífero<sup>3</sup> (Lanska, 2016). Como mencionado, não só fotografias de animais fizeram parte da sua coleção, mas também o trabalho desenvolvido com Francis Xavier

---

<sup>3</sup> A sua obra está apresentada na publicação *Animal locomotion: an electron-photography investigation of consecutive phases of animal movements*.

Dercum, em 1884, na captação do movimento de humanos que sofriam de vários distúrbios neurológicos que afetavam as suas capacidades locomotoras deixou uma grande marca no seu trabalho como fotógrafo (Lanska, 2001; Lanska, 2013, Landska, 2015; Lanska e Renda, 2004 em Lanska, 2016).

Mais tarde, outros nomes puderam continuar com o desenvolvimento desta ideologia inovadora e, de certo modo, revolucionária. Etienne-Jules Marey foi, igualmente, um grande nome na ciência da cinematografia e na inovação cinematográfica que, assim como Muybridge, interessava-se no movimento e na sua captação. Para além desta área, Murey efetuou grandes avanços na medicina de cardiologia, fruto da sua formação em fisiologia cardiovascular, criando o primeiro aparelho polígrafo conhecido (Muybridge, 1887 em Silverman, 1996). Adicionalmente, os seus contributos para a cinematografia foram extremamente bem registados, já que este entusiasta cooperou, grandemente, na descoberta da cronofotografia e na cinematografia com base no movimento, introduzindo o conceito de que uma sequência de imagens estáticas, quando misturadas e colocadas nas mesmas posições, eram percecionadas como a realização de uma acção movimentada e em tempo real. A invenção deste autor, em 1881, que o elevou a um lugar de prestígio no contexto da produção fotográfica, consistiu num método tão simples como adaptar a uma arma um sistema de captação tipo daguerreótipo, permitindo a captação de imagens a alta velocidade, intitulado-se este aparelho de fusil fotográfico (Michaelis, 1966, figura 2).



**Figura 2-** Representação do fusil fotográfico utilizado por Etienne-Jules Marey na sua arte de fotografia para captar o movimento de animais. O sistema adaptado era composto por daguerreótipo, que permitia a captação dos *frames*, incorporado numa arma que, ao ser ativada, autorizava a captação de imagens singulares com grande velocidade de através do seu esquema de disparo. Disponível em <http://www.artecapital.net/exposicao-513-valter-ventura-observatorio-de-tangentes>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

Assim, este sistema novo, progressista e singular, permitiu concretizar o propósito que Murey tinha em vista, captar o movimento de uma ave durante o seu voo. Desta forma, esta ideologia liderou a captação de um total de sessenta imagens por segundo (Silverman, 1996) que mostraram, claramente e de modo sequencial, todo o movimento do que estava a ser visualizado pelo olho humano. Possivelmente, esta invenção, que permitia a captação e projeção de imagens, contribuiu, fortemente, para a realização de trabalhos futuros, desenvolvidos tanto na área da medicina como na ciência biológica.

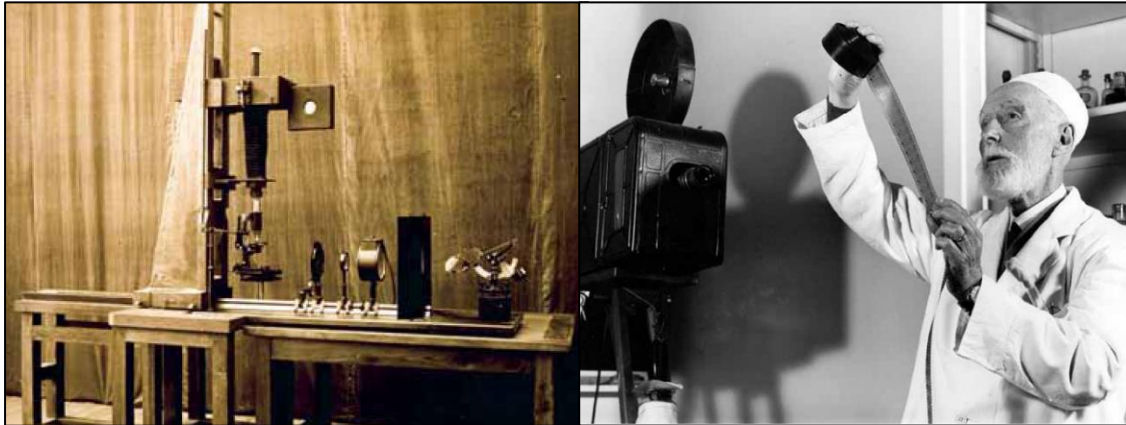
A introdução desta ideia fomentou a pesquisa e procura de métodos de projeção de fenómenos captados fotograficamente e, assim, surge, gradualmente, o aparelho que veio mudar toda a indústria cinematográfica: a criação do cinematógrafo pelos irmãos Lumière (figura 3), no século XIX, em 1895 (Bonah e Laukötter, 2009). As experiências para a criação deste aparelho começaram um ano antes e culminaram num sistema rudimentar que estava programado para projetar um “filme” acelerando a passagem de imagens estáticas (16 imagens por segundo) colocadas numa sequência lógica (Pruitt, 2014). O sucesso deste aparelho foi de tal forma grandioso que deste aparelho foram criados filmes reais, com a primeira publicação em Paris, no *Grand Cafe*, nesse mesmo ano (Pruitt, 2014).



**Figura 3-** Representação do primeiro cinematógrafo criado pelos irmãos Lumière, em 1895. Disponível em <http://www.history.com/news/the-lumiere-brothers-pioneers-of-cinema>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

Com todos estes avanços notórios na cinematografia e com a descoberta do primeiro cinematógrafo, a microcinematografia, ou seja, a observação cinematográfica através da utilização de um microscópio, surgiu como uma força potente na área da visualização científica. Nesta altura, várias figuras icónicas na ciência, como Robert Hooke e Antony van Leeuwenhoek, tinham descoberto maneiras de, microscopicamente, observar organismos invisíveis a olho nu, através de sistemas microscópicos rudimentares desenvolvidos ao longo do tempo (Frischknecht, 2009). As várias contribuições feitas por Alphonse Laveran (1880), por George Miller Sternberg ou por Dimitry Ivanovski (1892) na observação de microorganismos, incluindo a bactéria causadora da malária (*Bacillus malariae*) ou estudos com vírus, impulsionaram cada vez mais a introdução da ideia de observar o movimento destes organismos, evidenciando que estes não são estáticos e apresentam mudanças morfológicas e fisiológicas no seu desenvolvimento (Frischknecht, 2009). Consequentemente, a ideia da microcinematografia foi implementada, consistindo no mesmo fundamento da captação de movimento apresentado por Muybridge ou Marey. Para além da evolução tecnológica, os cientistas começaram a aprofundar a ideia da observação ao microscópio por intervalos de tempo curtos e equivalentes. Com base neste princípio, toda a observação de processos celulares duradouros e impercetíveis até esta altura tornou-se mais fácil e simples, já que as imagens captadas podiam ser colocadas lado-a-lado, de acordo com uma sequência lógica, e podiam ser projetadas por sistemas especializados daquele tempo a uma velocidade significativamente maior (Landecker, 2006).

Consequentemente, em 1910, Jean Comandon, um biólogo francês, revolucionou a visualização de microorganismos, através do uso de um ultra-microscópio, demonstrando que as atividades biológica e fisiológica dos seres vivos deste reino poderiam ser inspecionadas e as imagens sequenciais resultantes usadas para fins de investigação científica ou até mesmo para ensino (Frischknecht *et al.*, 2009). Desta forma, o seu trabalho com bactérias causadoras da doença de sífilis, *Treponema pallidum*, usando como material biológico o sangue de pacientes infetados, mostrou a toda a comunidade a interação destes organismos com os glóbulos brancos presentes no sangue e o movimento destas bactérias no mesmo fluido (Breithaupt, 2002). Para fazer estes filmes, Jean Comandon obteve a contribuição de um cinematógrafo francês e dono de uma companhia cinematográfica Charles Pathé, que forneceu o seu conhecimento de cinematografia para tornar esta tarefa exequível (Breithaupt, 2002). Assim, criando um sistema conjugado entre um microscópio convencional e uma câmara fotográfica (figura 4), Comandon não se distinguiu apenas pela sua ideia, mas também pela sua excelente e visionária execução (Lefebvre, 2003).



**Figura 4-** Representação do aparelho microcinematográfico de Jean Comandon (na imagem esquerda), usado nos seus estudos, em 1910. Cinquenta anos mais tarde, foi registado o momento em que este microcinematógrafo observa uma das suas películas fotográficas (imagem à direita). Adaptado de Lefebvre, 2003.

Esta “máquina” trouxe uma nova compreensão para o mundo da ciência, relevando o facto de ser possível observar organismos vivos em detrimento a organismos mortos que eram fixados em lâminas e observados microscopicamente. A frase icónica do trabalho deste grande microfotógrafo pode reduzir-se a estas palavras descritas na publicação de Lefebvre (2003):

*“On a réussi la cinématographie de l’invisible”*

Estas palavras mostram, assim, que Comandon e todos os seus ajudantes conseguiram atingir um marco na ciência da visualização de células, revolucionando mentes, revirando métodos, criando peças de arte e partilhando “o movimento” de outros seres vivos com a sociedade.

Pode-se constatar, conseqüentemente, que a cinematografia e a investigação científica começaram a aliar-se precisamente nesta altura, criando um novo conceito e método de observação microscópica. A descoberta de Comandon surpreendeu e inspirou toda a sociedade daquele tempo, impulsionando as descobertas científicas para um novo caminho, o da vida<sup>4</sup>. Quatro anos após este estudo excepcional, Jean Comandon expandiu os temas em que este modo de estudo de dinâmicas celulares poderia ser utilizado, aplicando, mais uma vez, a cinematografia no estudo e investigação associado a divisões celulares e a dinâmica dos cromossomas no interior

---

<sup>4</sup> A notícia da sua descoberta foi documentada no tão conhecido e conceituado jornal americano “The New York Times”, a 31 de outubro de 1909 com o título “Microbes caught in action. Moving Pictures of Them a Great Aid In Medical Research”.



da célula, alegando a ideia da existência de outras estruturas como “*entidades vivas*” (Landecker, 2009), para além dos seres vivos.

Aparentemente, só quatro anos após o estudo de Comandon surgiu o primeiro aparelho comercial de microcinematografia e, como expetável, a crescente progressão e melhoramento deste aparelho acompanharam a evolução do microscópio e da tecnologia associada (Landecker, 2009).

A partir do estudo de Comandon, a ideia de melhoramento desta técnica de visualização cresceu de uma forma imensurável durante os anos que se seguiram, verificando-se uma enorme mudança de perspetiva em relação à importância deste tipo de “filmes” após a ocorrência da segunda guerra mundial, em 1945 (Gouyon, 2016). Nos anos 60, a divisão entre cientistas e cineastas começou a ser evidente, havendo uma separação clara do trabalho de um cientista e do poder argumentativo e de imagem de indivíduos ligados a esta arte (Gouyon, 2016).

Nesta mesma altura ocorreu a ascensão de outro fenómeno inovador, digno de um prémio Nobel na área de química, que permitiu revolucionar, mais uma vez, toda a ciência de visualização celular. Assim, em 1960, Osamu Shimomura isolou a proteína fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*) de *Aequorea victoria*, uma espécie de medusa (Landecker, 2012) que, quando incorporada num determinado segmento genético por técnicas de engenharia genética, possibilita a marcação fluorescente de uma determinada estrutura celular. Esta descoberta abriu muitas oportunidades para a marcação de estruturas celulares, com recurso a proteínas fluorescentes ou sondas, permitindo que fossem desenvolvidos métodos para observar a estrutura ou função de um componente celular ou até o movimento migratório de certas estruturas (Sutton *et al.*, 2008).

Segundo Landecker (2009), a aliança entre a microscopia e fotografia ou filmografia foi de máxima importância para os avanços na biologia, especialmente para áreas focadas na estrutura e movimento de componentes celulares, sendo que o primeiro aparelho microcinematográfico verdadeiro apareceu vários anos após as grandes descobertas de Comandon e de outros cientistas que acreditaram nesta fabulosa técnica de visualização.

Mesmo no século seguinte (século XX) é certo que a cinematografia enfatizou a relação que o filme tinha com a ciência, influenciando cada indivíduo com a imagem e movimento e com os seus fins educativos, evidenciando uma nova ideia e era da tecnologia (Bonah e Laukötter, 2009).

## 3.2. Introdução do conceito de *time-lapse* na embriologia

O sucesso das técnicas de reprodução humana assistida, especialmente na realização da técnica de FIV, não pode ser dissociado do contexto desta secção, visto que muitos foram os cientistas e biólogos da ciência da reprodução que possibilitaram o acesso a uma nuvem de conhecimento extraordinariamente grande sobre variados assuntos desta área, quer em termos de condições de incubação quer sobre a mecânica envolvida na realização de um procedimento.

### 3.2.1. Contextualização histórica do sucesso da FIV antes do *time-lapse*

As primeiras tentativas de realizar esta excelente técnica de reprodução assistida com sucesso ocorreram, não em humanos, mas em outros seres vivos, como hamster (género *Mesocricetus*) ou porquinhos da índia (género *Cavia*), e, especialmente, em coelhos (género *Oryctolagus*), experiências estas que remontam para meados do século XIX (Bavister, 2002).

Usufruindo destes modelos na área da embriologia, entre 1887 e meados do século XX, foram investigados e publicados vários estudos sobre tentativas de sucesso da realização da técnica de fertilização *in vitro* em espécies de mamíferos (Schenk em 1887 ou Alerbt Brachet, em 1913).

Estes modelos contribuíram, em larga escala, para que muitos investigadores e embriologistas chegassem a conclusões excepcionais para que todo o processo de FIV fosse percebido de um ponto de vista celular. Pincus e Enzmann tiveram grandes contribuições para o sucesso da técnica de FIV, tanto em espécies animais como nos humanos. Através das suas comprovações em oócitos de coelho que os mesmos poderiam, *in vitro*, efetuar o seu desenvolvimento e gerar uma gravidez numa progenitora, estes cientistas mostraram, em 1935, que oócitos recolhidos de humanos poderiam continuar a segunda divisão meiótica até metáfase II e revolucionaram, igualmente, a utilização de alguns componentes nos meios de cultura usados para a incubação dos gâmetas humanos, como a adição de soros específicos (Biggers, 2012). Através da colaboração de muitos biólogos, como Arthur Hertig (Biggers, 2012), Rock e Menkin foram os principais responsáveis pelo primeiro ensaio de FIV com sucesso em oócitos humanos, e este estudo poderá ter sido revolucionário para a introdução desta prática nesta mesma espécie. Estes autores conseguiram visualizar, através da utilização de meios de cultura rudimentares e da sua substituição ao longo da clivagem do embrião e pela fixação de finas secções de material biológico em lâminas obtidas por

um microscópio de dissecação (ampliação de x35), o desenvolvimento dos embriões após fertilização, apresentando características quantitativas e qualitativas de cada etapa de embriões sobreviventes. Neste estudo, foram também apresentadas algumas escalas temporais das etapas estudadas, sendo que foi estabelecido que o embrião atingiu o estado de dois blastómeros às 40,5 horas após fertilização e o estado de três células às 46 horas (Rock e Menkin, 1944).

Aparentemente, a ideia comprovada *in vitro* de que o espermatozoide penetra a membrana do oócito e que perfura-o de modo a libertar o seu conteúdo genético para o seu interior, só foi, literalmente confirmada depois da década de 50, já que antes desta altura não havia grandes evidências da ocorrência deste processo, apesar de já haver conhecimentos escassos sobre o processo de fertilização (Bavister, 2002). Assim, na década de 60, foram efetuados os primeiros procedimentos de FIV em hamster e relatou-se a ocorrência do processo de capacitação, em 1963, por Yanagamachi e Yang. Estes últimos autores alcançaram uma conclusão importantes sobre este processo, alegando que, para o espermatozoide adquirir mobilidade, os valores de pH tinham de estar estabelecidos dentro de limites específicos (Austin, 1951 em Bavister, 2002; Yanagamachi e Chang, 1963 em Biggers, 2012).

Gradualmente, vários melhoramentos nos meios de cultura e nas hormonas de estimulação ovárica ocorreram, especialmente a partir dos anos 80, de modo a que todo o processo de incubação fosse otimizado e que os embriões fossem incubados de forma perfeita (DeCherney, 1986; Biggers, 2012). Assim, até 1983 os protocolos de estimulação ovárica já incluíam a administração de uma mistura de FSH e LH, que era designada por *human menopausal gonadotrophin* (hMG), conjugada com a administração da gonadotrofina coriónica humana (Edwards e Steptoe, 1983 em Wang e Sauer, 2006).

Depois de todas estas grandiosas descobertas, um marco importantíssimo para o nascimento da primeira criança gerada por esta técnica foi a sua conceção com sucesso por parte de Steptoe e Edwards, em 1978 (Steptoe e Edwards, 1978 em Silber *et al.*, 2017). Louise Brown foi, assim, a primeira descendente do século XX a ser gerada com recurso à técnica de FIV.

Em 1986, a fertilização *in vitro* já era um procedimento médico bastante conhecido no combate a problemas de fertilidade primária e secundária, no entanto apresentando, ainda, uma baixa taxa de sucesso para estas duas categorias (DeCherney, 1986).

A otimização desta técnica continuou após o sucesso conseguido com este primeiro nascimento, havendo sempre a necessidade de superar a composição dos meios de cultura e os protocolos e metodologias utilizadas. As primeiras otimizações relativamente a meios de cultura deram-se com recurso a embriões obtidos de animais,

especialmente de rato. Lawitts e Biggers (1991) realizaram um estudo precisamente com esta temática. No mesmo, conseguiram testar vários componentes presentes nos meios de cultura, concluindo que componentes como cloreto de sódio, piruvato, fosfato monopotássico e glucose em altas concentrações podem ser prejudiciais para o desenvolvimento dos embriões desta espécie.

### 3.2.2. Estudo da embriologia com recurso a técnicas tipo *time-lapse*

A aplicação pioneira da cinematografia nas ciências da reprodução foi implementada, primeiramente em espécies animais, devido ao facto de serem mais facilmente visualizados e apresentarem uma obtenção embrionária mais facilitada que no caso humano. A primeira constatação da aplicação do método da cinematografia em embriologia deu-se devido à investigação da observação de fertilização e do desenvolvimento posterior em ouriços-do-mar. O autor deste estudo foi Julius Ries que apresentou sequências de imagens sobre o desenvolvimento desta espécie, em 1907, altura em que esta descoberta permitiu mudar a mente cética de estudantes e membros da comunidade científica sobre a origem de novas células e a existência de movimento e mudança celular. Assim, Ries, através de técnicas de microcinematografia, conseguiu compilar as catorze horas de todo o processo de desenvolvimento do ouriço-do-mar numa sequência de imagens de apenas dois minutos, com a conjugação de várias imagens captadas ao longo de toda a sua progressão (Landecker, 2009). O seu estudo original apresenta uma imagem ilustrativa das várias etapas da segmentação celular no embrião de ouriço-do-mar, publicado posteriormente em 1910<sup>5</sup>. Assim, pode ter sido a partir deste estudo que começou a ideia de que várias imagens estáticas captadas em intervalos de tempo muito curtos poderiam ser compiladas e aceleradas numa sequência conjugada, de modo a criar a ilusão de um vídeo rápido do processo de desenvolvimento.

Um dos estudos pioneiros com sistemas de observações periódicas e bem definidas em embriologia estabeleceram-se em 1929, por Lewis e Gregory, em embriões de coelho (Lewis e Gregory, 1929), impulsionando outras investigações associadas à embriologia que já consideravam a introdução da captação por intervalos de imagem muito curtos para visualizar a contínua progressão de um processo.

Começando no final do século XX, Grisart e colaboradores (1994) utilizaram zigotos de bovinos como material biológico para a aplicação da cinematografia no seu estudo, pretendendo captar, *in vitro*, o desenvolvimento dos embriões desta espécie. Para

---

<sup>5</sup> Estudo de Julius Ries original intitulado "*Chronophotographie de la fécondation et de la segmentation*".

esta observação, os autores criaram um sistema personalizado conjugando uma câmara termorregulável de cinematografia com temperatura constante a 39°C, um microscópio invertido, e uma câmara incorporada. O sistema estava programado para uma gravação com duração de dez dias e estava orquestrado de uma maneira tão sinfónica que, em cada captação, a luz do microscópio ligava-se previamente e desligava-se logo a seguir à captação de imagem, de modo a diminuir ao máximo a exposição dos embriões à luz. O sistema utilizado mostrou o seu valor nesta experiência, já que foram estabelecidos os limites de tempo de ocorrência de todas as fases de desenvolvimento em embriões desta espécie. As experiências de observação cinematográfica pelo *time-lapse* em embriologia continuaram em espécies não humanas, como apresentado no estudo de Gonzales *et al.* (1995) na espécie de hamster. Neste estudo, o sistema usado, ainda rudimentar, apresentava um esquema muito semelhante ao anteriormente descrito, no entanto este consistia na associação entre um microscópio invertido, uma lente amplificadora para melhor detalhe de imagem e uma câmara de vídeo conjugada com uma cassete VHS (*Video Home System*), para, posteriormente, guardar a gravação.

O avanço realizado em espécies de mamíferos fomentou a curiosidade de investigadores da área a procurarem quais as condições atmosféricas ideais para a cultura embrionária e que meios de cultura podem ser empregues para que a mesma ocorra com sucesso.

Com o passar do tempo e otimização de condições de cultura, a investigação seguiu para o caso humano e, nos anos 90, o estudo de Payne *et al.* (1997) documentou a utilização de um método semelhante, com a observação microscópica de imagens em intervalos de tempo muito curtos, para a observação de etapas iniciais após a fecundação, de modo a demarcar os tempos exatos de tais eventos celulares (Herrero e Meseguer, 2013). O sistema rudimentar, utilizado por Payne e colaboradores, englobava um poço de cultura de embriões temporário com uma câmara a cores acoplada a todo o sistema, assentando num microscópio invertido com uma ampliação de x200. Posteriormente, as imagens eram captadas a cada quatro horas de intervalo e podiam ser visualizadas num monitor à parte associado a todo o esquema programado (Best, 2015). Esta descoberta poderá ter sido revolucionária no sentido de desencadear o interesse de inúmeros autores nesta temática e na incorporação de visualizações periódicas e com intervalos definidos na observação e pesquisa de todos os pormenores do processo de desenvolvimento humano embrionário.

Em suma, várias investigações foram efetuadas durante vários séculos, primeiramente em animais, de modo a tentar observar as várias etapas que compõem o processo reprodutivo de uma espécie, no entanto passando para uma visão "*in vitro*".

Assim, surge, desta forma, a ideia inerente a um conceito de *time-lapse*, a observação periódica e acelerada de uma sequência de imagens estáticas, de modo a dar a ideia de um movimento constante.

### 3.3. Sistemas *time-lapse* aplicados à ciência da reprodução humana *in vitro*

A etapa de incubação e monitorização de um embrião constitui a última e mais importante fase de todo o procedimento laboratorial com vista à obtenção e posterior transferência de um embrião, de modo que na fase de cultura embrionária ocorrem todos os marcos de desenvolvimento que determinam o destino do mesmo.

A monitorização pós-inseminação rotineira e diária de embriões criados por técnicas de reprodução humana assistida, como as conhecidas FIV e ICSI, é de extrema importância para determinar tanto a qualidade dos embriões como a sua progressão, respeitando algumas regras base pré-definidas para a classificação em vários parâmetros morfológicos embrionários. No entanto, segundo Cruz e colaboradores (2011), a classificação baseada apenas na morfologia embrionária, como por exemplo a contagem do número de células, poderá ser limitativa no momento de seleção embrionária para transferência, o que enfatiza o propósito de revolução do modo de visualização e monitorização embrionárias numa clínica de infertilidade. Desta forma, o *timing* de ocorrência de certos eventos celulares dentro do desenvolvimento embrionário poderá ser adicionado na sua avaliação, sendo assim um parâmetro que deve ser considerado.

Adicionalmente, existe uma grande especificidade dos meios de cultura para incubação de oócitos e embriões, visto que, em cada fase de desenvolvimento existem mudanças nas necessidades nutricionais e metabólicas (Feuer e Rinaudo, 2012), de acordo com a melhor adequação do ambiente fisiológico de cada compartimento do sistema reprodutor feminino, em termos de hidratos de carbono, como a glucose, aminoácidos, essenciais e não-essenciais, entre outros (Gardner e Lane, 1997). É também conhecida a máxima importância que as condições físico-químicas ótimas de cultura, incluindo temperatura (37°C, de modo a mimetizar a temperatura corporal feminina), humidade, exposição a luz, pH e concentração de dióxido de carbono e oxigénio têm na cultura embrionária e o modo como a influenciam (Mandawala *et al.*, 2016). Contudo, a monitorização morfológica convencional realizada pelo embriologista obriga, temporariamente, à exposição dos embriões a variações dessas condições e a

introdução de um fator de stress relacionado pode levar à alteração de determinadas funções fisiológicas do embrião (Feuer e Rinaudo, 2012). Igualmente, a monitorização microscópica convencional permite, somente, a obtenção de imagens estáticas no tempo, podendo as mesmas não ser inteiramente representativas de todos os acontecimentos celulares ocorridos até aquele momento (Cruz *et al.*, 2011).

Desta forma, estes obstáculos apresentados permitiram a implantação, em embriologia humana, de uma tecnologia conhecida e designada por *time-lapse*. Este sistema tecnológico e adaptado permite a monitorização e obtenção de imagens digitais embrionárias, em intervalos de tempo definidos e em diferentes planos de focagem, que podem ser obtidas e editadas recorrendo a *software* especializado (Armstrong *et al.*, 2015b). Desta forma, a captação de todas as fotografias pode ser justaposta e acelerada, de modo a que o conjunto de imagens captadas corra num “filme de desenvolvimento” quando se aumenta a velocidade de visualização (Herrero *et al.*, 2013).

Assim, revela-se como um método de monitorização não invasivo devido a dois aspetos, incluindo a possibilidade de minimização, ao máximo, da manipulação humana de embriões (Kaser e Racowsky, 2014) e à manutenção de todos os componentes de cultura, a nível de temperatura e proporção gasosa, entre outros (Armstrong *et al.*, 2015b). Este facto contribui, assim, para a minimização da introdução de fatores de stress ambiental provocados pela exposição a condições ligeiramente diferentes das de incubação (Swain, 2013). A implementação do *time-lapse* alia-se, então, à transição de uma monitorização diária interrompida para uma cultura contínua e sem perturbação, até ao dia de transferência para o útero (Kaser e Racowsky, 2014; Campbell, 2015a). Desta forma, todas as etapas de desenvolvimento, antes avaliadas de uma forma estática com a avaliação convencional, tais como a ativação do oócito, singamia e as sucessivas divisões mitóticas do embrião, podem, contrariamente, ser visualizadas sem interrupções e, possivelmente, oferecendo novos avanços no conhecimento da embriologia humana (Milewski *et al.*, 2015).

Como conhecido, o desenvolvimento embrionário é um processo altamente contínuo no tempo, sendo de máximo interesse conseguir capturar o conjunto das suas fases e as respetivas transições em tempo real. Esta última característica é possível devido ao crescimento e aposta no *time-lapse* sendo, assim, possível a visualização de todas as mudanças celulares não captadas nos momentos de análise morfológica tradicional e estática (Serdarogullari *et al.*, 2014). Consequentemente, todos os *frames* dos embriões obtidos em vários planos podem ser visualizados num computador com o *software* de seguimento celular específico e acoplado ao *time-lapse* e, de seguida, podem ser guardados para observação posterior (Armstrong *et al.*, 2015b).

Apesar de já ter sido provado o sucesso do *time-lapse* nesta área por alguns autores, ainda subsiste uma controvérsia a nível dos seus benefícios clínicos (Montag, 2016 em Kaser e Racowsky, 2014), já que a sua implementação clínica é relativamente recente (Swain, 2013), e em termos do melhoramento da seleção dos embriões (Kirkegaard *et al.*, 2015). Assim, uma forma de comprovar e determinar estas incertezas consiste na realização de mais ensaios clínicos, em centros de investigação ou clínicas. Contudo, segundo Montag (2016), estes ensaios apresentam limitações e, por vezes podem ser desafiantes de realizar visto que, no panorama geral de um centro de estudos de infertilidade, está inerente a dificuldade de obter um grande volume de pacientes e, conseqüentemente, de embriões que seriam usados nos mesmos, o que poderia comprometer a significância dos resultados.

São vários os estudos que salientam a segurança do uso do *time-lapse* para a monitorização dos embriões e garantem que, com o desenvolvimento da própria tecnologia, seja possível assistir a um aumento das taxas de gravidez em clínicas de procriação assistida (Kirkegaard *et al.*, 2013). No entanto, alguns autores como Herrero e Meseguer (2013) afirmam que poderão haver algumas desvantagens inerentes ao próprio aparelho, como a impossibilidade de rotação dos embriões para uma observação mais precisa das suas células constituintes e do ambiente citoplasmático (Herrero e Meseguer, 2013 em Milewski *et al.*, 2015)

Para além da avaliação morfológica embrionária, a aplicação do sistema de monitorização do *time-lapse* em clínicas de infertilidade estende-se para outros campos, como a determinação da influência de fatores externos (como o meio de cultura) na morfocinética do embrião ou o próprio estudo da dinâmica da embriogénese humana (Cruz *et al.*, 2011).

É importante recordar que todos estes estudos foram possíveis devido a uma otimização contínua das condições atmosféricas e de nutrição e da produção de meios de cultura ideais para a incubação de oócitos e embriões.

Assiste-se, igualmente, a uma renovação tecnológica e evolução dos sistemas automáticos, quer se seguimento celular quer de visualização microscópica que, associados, trouxeram o emergir de novos aparelhos e técnicas. O que antes era realizado à mão, pela visualização e anotação de eventos celulares e observações pertinentes, passou a ser automatizado pela criação de algoritmos específicos e desenvolvimento de *softwares* somente para esta tarefa (Sacan e Ferhatosmanoglu, 2008).

Em suma, é relevante salientar o papel do *time-lapse* numa clínica de reprodução assistida e estabelecer, se possível, uma relação entre a sua implementação e o sucesso dos tratamentos de infertilidade efetuados.



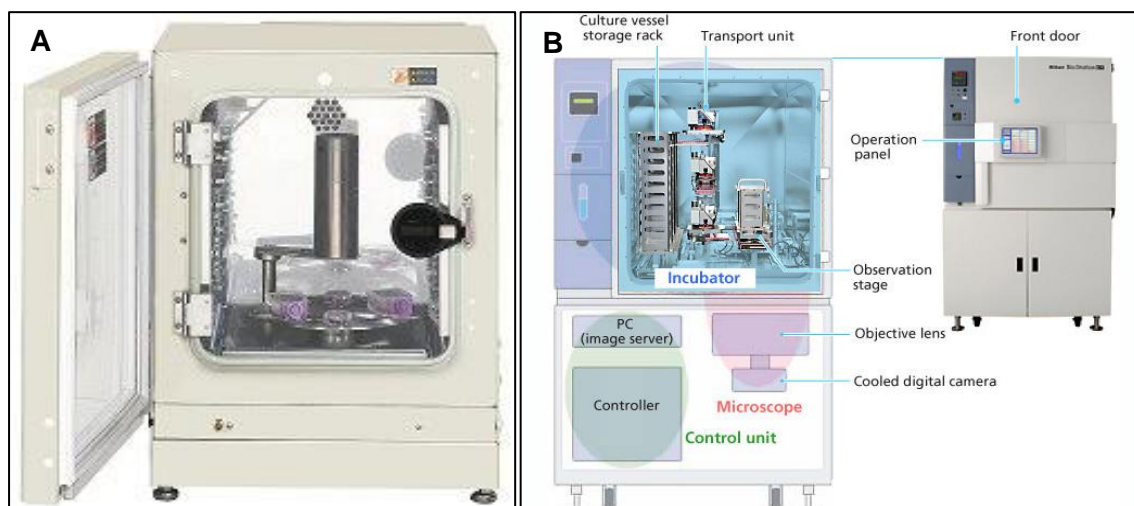
### 3.3.1. Tipos de sistemas *time-lapse* existentes

As observações convencionais nos laboratórios de embriologia numa clínica reprodução assistida ocorrem com recurso a um microscópio invertido especializado, normalmente agregado a ferramentas, como micromanipuladores, para a realização da técnica de ICSI. Estes microscópios especializados possuem um sistema computacional agregado a sistema, onde é possível obter imagens amplificadas dos embriões que estão a ser avaliados. É inquestionável a evolução microscópica até a este ponto, visto que sempre foi requerido pelos embriologistas um sistema mais seguro e eficiente de observação embrionária que não induzisse nenhuma condição de stress a estas células.

Em 2008, Arav utilizou um sistema *time-lapse* designado por EmbryoGuard™ para determinar a competência de desenvolvimento de embriões de rato. Este sistema de unidades mais antigo consistia num aparelho de monitorização que era inserido num sistema de incubação existente que, por sua vez, já permitia a cultura ininterrupta e constante (Arav, 2008). As imagens eram captadas em intervalos de trinta minutos por uma câmara associada à unidade e o microscópio invertido ligado a todo este sistema permitia uma maior ampliação dos embriões (Arav, 2008).

Outros dois sistemas de observação, não só de embriões como também de outros tipos de células não embrionárias, tinham a capacidade de visualizar os movimentos intra ou extracelulares ocorridos nas mesmas estruturas. A marca Sanyo avançou com um sistema de incubação multigás que permitia usar os métodos fotográficos do *time-lapse*, o InCu-View Live™ (Sanyo). Os avanços tecnológicos foram evidenciados na criação deste aparelho (figura 5A), visto que a incubação era feita no mesmo, que apresentava um microscópio (Olympus) integrado ao equipamento com ampliação de até x250 (Sanyo, 2007). Uma fonte de luz LED (*Light Emitting Diode*) foi adicionada ao sistema para que, na altura da captação, haja uma iluminação momentânea e o sistema de visualização dos embriões incluía um total de dez planos focais (Sanyo, 2007). O desenvolvimento embrionário era monitorizado por um sistema de seguimento celular, com um *software* específico instalado num computador externo ao equipamento (Sanyo, 2007). Outro sistema utilizado na observação de células em cultura corresponde a um sistema integrado desenvolvido pela marca Nikon e designado por BioStation CT (figura 5B), que apresenta uma grande inclinação para a visualização de outros tipos celulares (Nikon, 2017). Este sistema apresenta uma conjugação entre microscópio, zona de incubação e o sistema servidor de armazenamento de imagem. Como todos os aparelhos *time-lapse*, a manutenção das condições de temperatura, concentração de dióxido de carbono e oxigénio e humidade é uma propriedade característica. Este

sistema apresenta dois modos de visualização, um macroscópico e um mais detalhado, microscópico, possuindo uma câmara fotográfica a cores, iluminação LED e de contraste de fase (Nikon, 2017). Apesar da sua vasta aplicação na área do estudo de células estaminais, a sua implementação na área da reprodução é válida e o efeito *time-lapse* também pode ser obtido (Nikon, 2017).



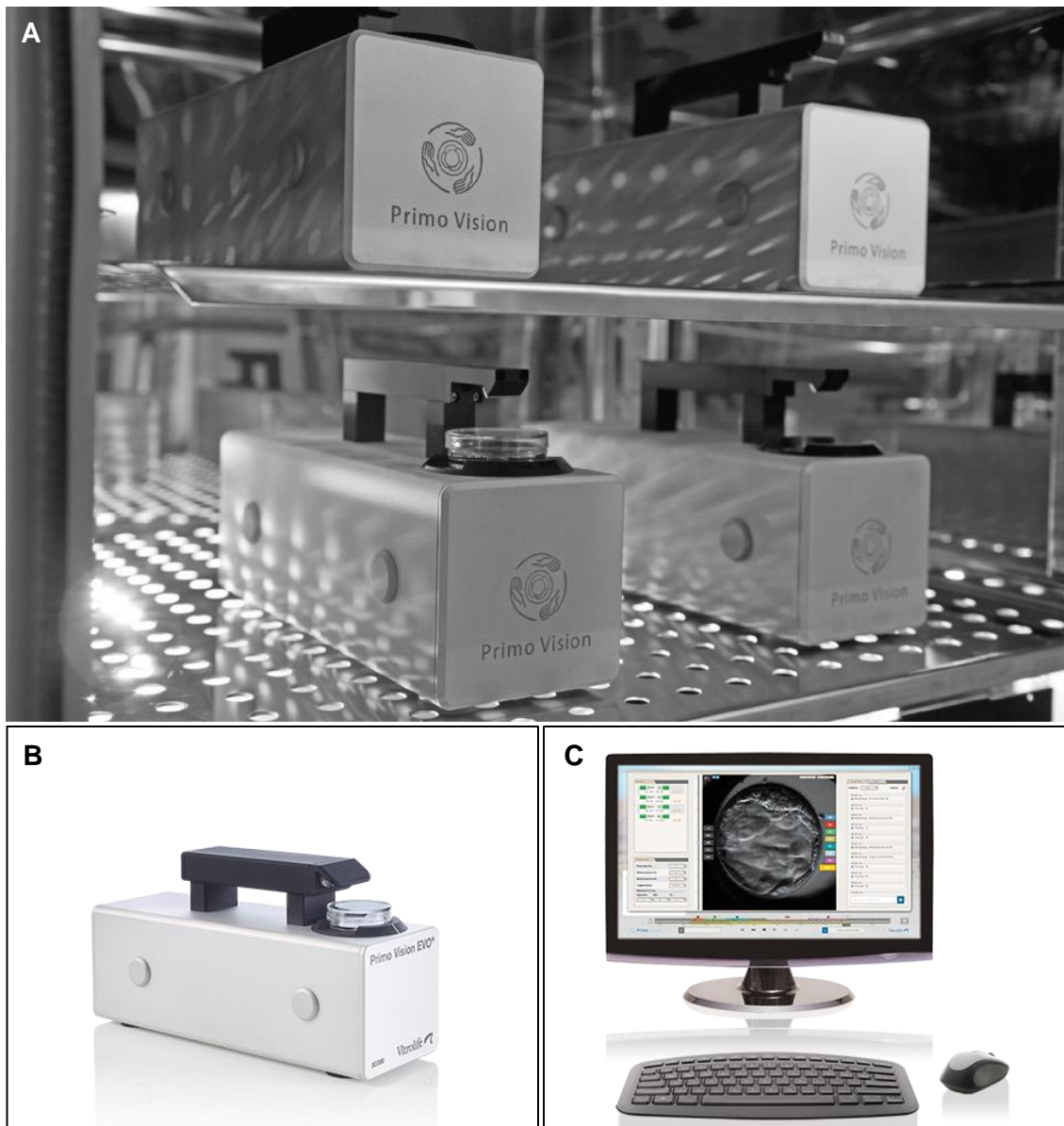
**Figura 5-** Representação do InCu-View Live™ da marca Sanyo (A) e o BioStation CT da marca Nikon (B). Ambos os aparelhos de incubação apresentam a opção de visualização do movimento celular, em embriões ou células não embrionárias. Adaptado de Sanyo, 2007 (disponível em <http://www.panasonic-biomedical.co.uk>) e de Nikon, 2017 (disponível em <https://www.nikoninstruments.com>). Acedidos a 7 de setembro de 2017.

Existem vários tipos de tecnologia *time-lapse* comercializada e exclusiva para a observação e monitorização do desenvolvimento de embriões, dos quais podem ser incluídos o Primo Vision™ (Vitrolife, Suécia), Eeva™ (*Early Embryo Viability Assessment*, Auxogyn, Estados Unidos da América), EmbryoScope® (FertiliTech, Dinamarca), e Miri® (Esco, Dinamarca), ilustrados nas figuras 6 a 10, respetivamente. Os novos aparelhos, relativamente aos anteriores, apresentam-se como sistemas automatizados, usufruindo dos muitos avanços na tecnologia, na ciência da computação e na incorporação de câmaras fotográficas e compartimentos de incubação no mesmo sistema. Mais uma vez, é de salientar que estes sistemas apresentam, como vantagem privilegiada, a captação contínua do desenvolvimento embrionário e a manutenção das condições de cultura.

Algumas diferenças entre estes últimos aparelhos referidos podem ser evidenciadas, tais como a quantidade de embriões (totais ou por placa de cultura) que monitoriza cada sistema, o número de planos focais, o tipo de iluminação ou mesmo a frequência de captação de imagem que cada um apresenta. A descrição destes

aparelhos será feita, de seguida, com base na necessidade de uma câmara de incubação pré-existente ou da sua ausência.

Primeiramente, alguns destes sistemas mencionados são acoplados e ajustados a uma câmara de incubação já existente no laboratório ou clínica de infertilidade. Segundo Best (2015), uma das possíveis vantagens deste facto é a possibilidade do estudo da influência das condições de incubação a que os embriões estão sujeitos, de modo a fazer pequenos ajustes de determinados parâmetros de cultura que poderão estar a afetar a incubação. Um deles constituiu o sistema Primo Vision™ (figura 6A). Este último corresponde a um microscópio invertido digital (figura 6B) que apresenta um aparelho de controlo computacional (figura 6C) independente à câmara de incubação. Cada unidade deste sistema equivale à monitorização de um caso clínico e os seus poços de cultura podem incubar de nove a dezasseis embriões (Vitrolife, 2015a). A iluminação LED, com um comprimento de onda de 550 nm (nanómetros) por parte do microscópio, permite a visualização (em três a sete planos focais) e análise do desenvolvimento dos embriões, no que diz respeito ao seu padrão de clivagem.

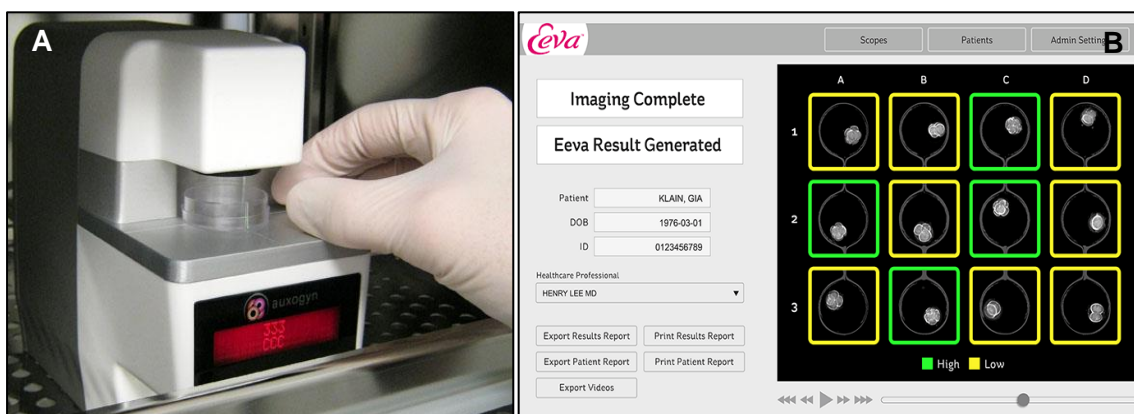


**Figura 6-** Sistema *time-lapse* Primo Vision™ EVO (A), inserido no seu respetivo local de uma estufa pré-existente.

B representa o aparelho digital de microscopia invertida, com uma placa de incubação de embriões já preparada para monitorização e o sistema de controlo computacional agregado ao aparelho de microscopia (C). Imagem A adaptada de Best, 2015. Imagens B e C Disponíveis em <http://www.vitrolife.com/en/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/> e <http://www.vitrolife.com/sv/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/Primo-Vision-Analyzer-Software/>. Acedido a 7 setembro de 2017.

O segundo sistema a necessitar de uma câmara de incubação pré-existente é o sistema Eeva™ (figura 7A). Este sistema modular usufrui de apenas um plano focal para análise embrionária através da utilização de microscopia de campo escuro (Kovacs, 2014). Ao permitir uma cultura coletiva, através deste sistema é possível fazer a monitorização individual de até nove embriões. Uma das características mais marcantes deste sistema é a associação do mesmo a um *software*, o *Early Embryo Viability*

*Assessment Test* ou *Eeva Test*, que, através do seguimento automático celular, fornece ao embriologista informações sobre a viabilidade e desenvolvimento embrionários, de acordo com o tempo decorrido, após inseminação, que cada embrião efetua em etapas fundamentais e marcantes dos dois dias de desenvolvimento depois do tratamento FIV ou ICSI efetuado. Um exemplo da aplicação deste seguimento encontra-se exemplificado na figura 7B.



**Figura 7-** Sistema *time-lapse* Eeva<sup>™</sup> (A) e uma representação da aplicação do Eeva *test* (B) numa situação de monitorização e avaliação automática, onde é possível observar duas das classificações deste modelo de avaliação, bem como ter acesso ao caso clínico em questão e a variadas informações sobre o mesmo. Imagem A disponível em <http://www.magazine.emerck> e imagem B disponível em <https://www.eevatest.com>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

Primeiramente, todas as pacientes que estão a efetuar um tratamento têm que ser devidamente registadas neste tipo de *software*, de modo a que não haja trocas de informação ou de material biológico. Após esta identificação, o aparelho *time-lapse* começa o registo e captação de imagens dos embriões. Assim, este sistema automático de monitorização utiliza como referência alguns parâmetros de avaliação, começando pelo tempo que o embrião demora a completar a citocinese do primeiro ciclo celular, o intervalo de tempo entre o estado de dois e três blastómeros e, por fim, o intervalo de tempo decorrido entre o estado de três e quatro blastómeros. Considerando o segundo parâmetro de análise (designado por P2 ou cc2) e o terceiro (designado por P3 ou s2), o Eeva *test* fornece uma classificação de três categorias (alta, intermédia e baixa) de acordo com o maior ou menor potencial de desenvolvimento dos embriões. Esta classificação automatizada nas três categorias mencionadas é atribuída relativamente aos intervalos de tempo destes dois parâmetros fundamentais, tal que: se P2 de 9,33 a 11,45 e P3 de 0 a 1,73 horas após inseminação a classificação é *High* (alta qualidade); se P2 entre 9,33 e 12,65 e P3 entre 0 a 4 horas após inseminação a classificação embrionária é *Medium* (média qualidade); se, no entanto, P2 e P3 não se encontrarem nesta gama de valores máximos e mínimos, então a classificação embrionária é *Low* ou

de baixa qualidade (VerMilyea *et al.*, 2014). Apesar de este teste apenas considerar estes parâmetros de avaliação, a sua programação para fazer previsões até ao estado de blastocisto é igualmente válida, visto que o desenvolvimento precoce do embrião traça o seu destino até uma fase mais tardia de desenvolvimento (Kieslinger *et al.*, 2016). Se os embriões monitorizados cumprirem todos os limites aceitáveis para os três parâmetros de avaliação, a sua qualidade será alta e este constituirá um possível embrião para transferência.

O segundo grupo de sistemas *time-lapse* inclui aqueles que são sistemas independentes de bancada, não necessitando de estufas previamente existentes. O sistema EmbryoScope® (figura 8A), comercializado no mercado desde 2009 (Vitrolife, 2015b), consiste num sistema independente de monitorização embrionária com uma câmara de iluminação LED de 635 nm de comprimento de onda capaz de captar imagens em nove planos de focagem distintos. Os seus poços de cultura são designados de EmbryoSlide (figura 8C e D) e constituem doze no total, suportando, assim, o mesmo número de embriões de um casal, que são depositados na sua depressão central (Vitrolife, 2015b). A totalidade do sistema permite o seguimento pós-inseminação de seis casos clínicos distintos, cada um com o seu respetivo local e placa de incubação. As imagens de desenvolvimento podem ser visualizadas por um sistema computacional à parte do sistema de incubação (correspondente ao EmbryoViewer, figura 8B) e este *software* do sistema *time-lapse* permite, igualmente, seguir cada embrião através de um sistema de seleção automático por tratamento retrospectivo de dados relativos à análise embrionária (Best, 2015).

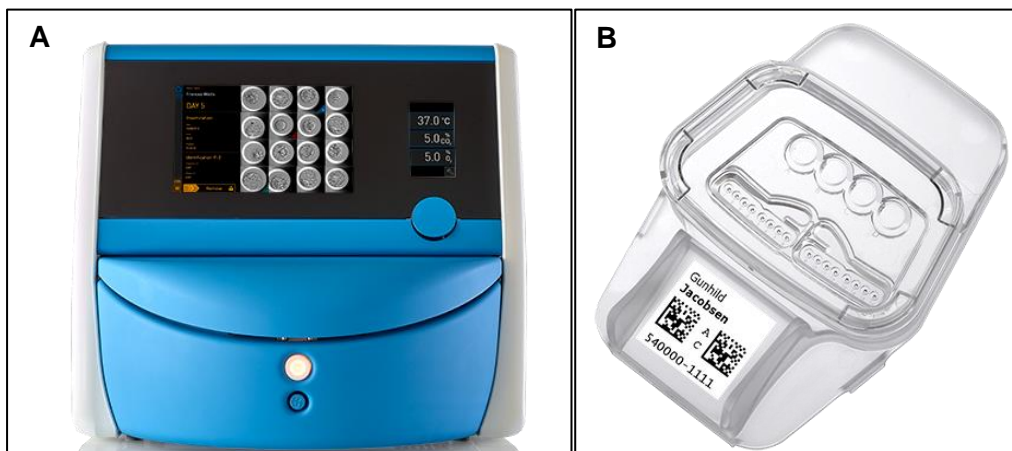


**Figura 8-** Sistema *time-lapse* EmbryoScope® (A), conjugado com o seu controlo computacional exterior ao aparelho de incubação (B). O EmbryoSlide (C e D), de diâmetro 0,2 mm e 25  $\mu$ L de volume máximo de meio de cultura, apresenta uma pequena peça na parte final, a seguir aos poços, que permite que o utilizador segure e encaixe o sistema de poços de cultura com a máxima segurança e cuidado (C). Imagem A disponível em <http://www.vitrolife.com>. Imagem B adaptada de Best, 2015. Imagem C e D disponíveis em <http://www.vitrolife.com>. Acedido a 7 de setembro de 2017.

O interior do EmbryoScope® está protegido por um sistema HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) de filtração de ar e um sistema de eliminação de compostos orgânicos voláteis e outros contaminantes e possíveis e pequenas partículas áreas, de modo a oferecer um ambiente de incubação o mais esterilizado possível (Rubio *et al.*, 2014). No caso dos sistemas de análise automática de seguimento celular, é possível que haja a troca de informação entre clínicas e exportação de dados relativos ao desenvolvimento embrionário, o que torna mais acessível e facilitada a partilha de informação e comunicação entre clínicas com o mesmo interesse científico e objetivo numa determinada investigação (estudos multicentro, Best, 2015).

Um melhoramento do aparelho original originou, no mesmo ano, o EmbryoScope + (figura 9A) que, por meio de várias experiências, foi otimizado para uma maior capacidade de incubação embrionária, de armazenamento de informação e de visualização de um maior número de embriões, de uma só vez, associada aos casos clínicos a serem monitorizados (Vitrolife, 2015c). Igualmente, para aumentar e melhorar a segurança a nível da identificação dos discos de cultura, os mesmos, designados de

EmbryoSlide+ (figura 9B), são automaticamente nomeados por uma marcação através de um código de barras (Vitrolife, 2015c).



**Figura 9-** Sistema *time-lapse* EmbryoScope + (A) e o respetivo EmbryoSlide+ (B), com a representação do sistema de identificação de cada casal com o nome e código de barras. Imagens disponíveis em <http://www.vitrolife.com>. Acedido a 10 de setembro de 2017.

Por fim, o aparelho Miri® (figura 10A), da companhia Esco, constitui o segundo aparelho de bancada, dividido em seis compartimentos de incubação distintos compostos por uma câmara fotográfica com frequência de captação de cinco minutos e obtenção de imagens em vários planos focais. O melhoramento deste aparelho em relação aos anteriores representa-se na manutenção cuidadosa e recuperação rápida das condições de cultura após abertura de cada câmara (um minuto de recuperação da temperatura e menos de três minutos de recuperação da concentração gasosa após abertura) e pela adição de um ecrã táctil de alta definição, que permite ao embriologista aceder a cada compartimento de incubação e realizar anotações pertinentes na câmara em questão (Esco medical, 2017). Cada câmara individual suporta poços de cultura, o CultureCoin (figura 10B), que oferecem a incubação e cultura máxima de catorze embriões.



**Figura 10-** Sistema *time-lapse* Miri® (A) e representação dos respetivos poços de cultura, Culture Coin (B). Imagem A e B disponíveis em <http://medical.escoglobal.com>. Acedido a 7 de setembro de 2017.



Este aparelho, assim como os anteriores, apresentam aprovação médica declarada pela FDA (*Food and Drug Administration*), aprovação do teste MEA (*Mouse Embryo Assay*)<sup>6</sup>, e classificação como aparelhos médicos de classe II pela MDD (*Medical Device Directive*)<sup>7</sup>, sendo que o Eeva foi o primeiro a obter aprovação para a seleção embrionária pela primeira instituição<sup>8</sup>.

A tabela seguinte (tabela 1) permite a sintetização das características mais relevantes que caracterizam cada sistema e permitem a sua distinção, pelos fatores mais característicos e importantes que definem uma tecnologia deste género.

**Tabela 1-** Apresentação das características principais dos tipos de sistemas *time-lapse* mencionados, incluindo o número máximo de embriões monitorizados que cada sistema suporta, o tipo de cultura, sendo este individual (apenas um aparelho a suportar vários casos clínicos) ou em grupo (cada unidade suporta um caso clínico de cada vez), o número de planos focais que a câmara possibilita para captação da imagem e a sua frequência e, por fim, o tipo de iluminação que cada sistema *time-lapse* apresenta no que diz respeito ao sistema microscópico incorporado. Adaptado de Best, 2015.

<b>Tipo <i>time-lapse</i></b>	<b>Nº máximo de embriões</b>	<b>Tipo de cultura</b>	<b>Nº de planos de focagem</b>	<b>Frequência de captação de imagem</b>	<b>Tipo de imagem/iluminação</b>
Primo Vision™	54 a 96 (9 ou 16 /placa)	Em grupo	11	A partir de 5 minutos	LED verde
Eeva™	48 (12 /placa)	Em grupo	1	5 minutos	Campo escuro
EmbryoScope®	72 (12 /placa)	Individual	9	A partir de 10 minutos	LED vermelho
Miri®	84 (14 /placa)	Individual	Sem limite	5 minutos	LED vermelho

<sup>6</sup> Teste de controlo de qualidade, desenvolvido em embriões da espécie de rato, de modo a testar a segurança de determinadas condições antes da sua aplicação a nível da embriologia humana (Gilbert *et al.*, 2016).

<sup>7</sup> Informação disponível em <http://medical.escoglobal.com/images/upload-pdf/9010177-Medical-Combined-Catalogue-A4-vC-LR.pdf> e <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/EmbryoScope-PLUS-time-lapse-incubator/>

<sup>8</sup> Informação disponível em <https://www.eevatest.com/eeva-test>

Recentemente, um novo e inovador aparelho *time-lapse*, Geri+ (*Genea Embryo Review Incubator*, Genea BIOMEDX) foi colocado no mercado com a promessa de uma tecnologia de alta qualidade para a monitorização embrionária, seguimento celular e seleção automática do melhor embrião para transferência. Desta forma, a seguinte secção permite elucidar a sua estrutura, componentes principais e modo de atuação.

### 3.3.2. Geri+ (Genea BIOMEDX)

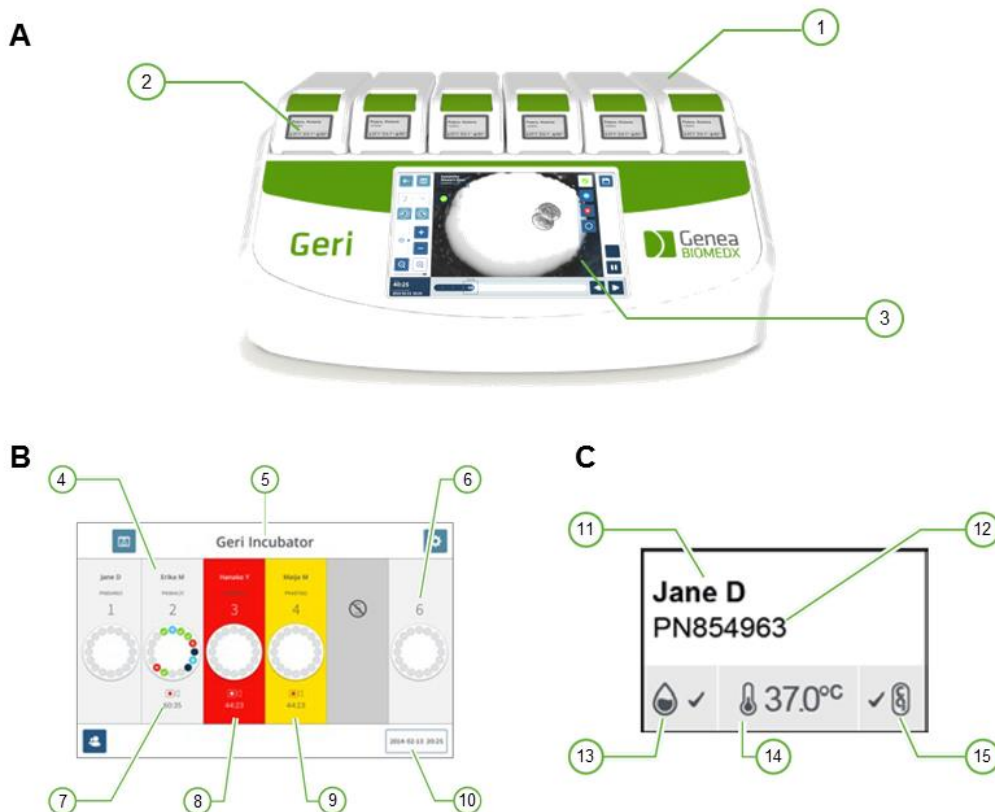
O sistema Geri+ representa no mercado um sistema *time-lapse* seguro para o armazenamento e preservação de embriões e blastocistos devido a uma excelente capacidade de manutenção de todas as condições ótimas de cultura embrionária, de forma a se assemelhar o mais possível a um sistema humano feminino. Usufruindo das propriedades preditivas da morfocinética, o Geri+ é capaz de selecionar, automaticamente, os embriões ou blastocistos com melhor potencial de desenvolvimento, escolhendo-os com base na avaliação da cinética embrionária (associada a respetivos tempos de ocorrência de várias etapas celulares adequados) e, adicionalmente, da análise conjunta respeitante à sua morfologia.

Um estudo realizado por Podsiadly e colaboradores (2016) comparou os resultados obtidos pelo Geri+ e por um sistema convencional de incubação, considerando como parâmetros de avaliação, por exemplo, a possibilidade de um embrião chegar a blastocisto ou taxa de blastocistos transferidos, e concluiu que os resultados foram semelhantes entre os dois, ou seja, que não houve melhoria aparente com a aplicação do Geri na cultura embrionária. No entanto, a escassez de estudos relacionados com este sistema é notória, de modo que nesta secção apenas serão abordados os seus componentes e estrutura. Desta forma, esta lacuna permite que este aparelho se torne um potencial alvo para investigações futuras, de modo a determinar os seus benefícios para esta área da ciência.

Embora se constate este facto, o conhecimento de que as características e propriedades automatizadas inerentes a este aparelho são notáveis é universal, de tal forma que o modo como opera e como foi orquestrado eleva-o a um nível de excelência na tentativa de uma prática laboratorial perfeita em relação à monitorização embrionária.

### 3.3.2.1. Estrutura e especificações do Geri+

O sistema Geri+, representado na figura 11, constitui um excelente modelo de monitorização embrionária, apresentando todos os seus componentes automatizados e bem organizados.



**Figura 11-** Apresentação do sistema *time-lapse* Geri+ (A). A1 representa uma das seis câmaras de incubação que compõem o sistema, cada uma com o ecrã informativo (A2), ampliado na imagem C. O ecrã interativo (A3) permite que o utilizador manipule todo o sistema de modo a obter informações sobre os casos monitorizados no momento e realizar todas as alterações necessárias, incluindo a verificação das condições de cultura em cada câmara. No ecrã interativo ou *home page* (B), apresentado no ecrã principal do aparelho, é apresentado panorama geral de todos os casos clínicos a serem monitorizados naquele momento (B4) pelo aparelho Geri+ (B5). Cada câmara é representada por uma numeração de um a seis (números referentes B6), relacionada com a ordem das câmaras do Geri+, e, imediatamente por baixo deste número, é possível ter uma visão geral dos poços ocupados em cada câmara e do estado dos embriões cultivados e monitorizados dentro da mesma. Adicionalmente, é possível saber a duração, após inseminação (em horas), no qual este aparelho regista todos os episódios de desenvolvimento dos embriões monitorizados (B7). No caso de haver alguma alteração das câmaras de incubação, o sistema Geri+ aciona um alarme (B8) com acompanhamento sonoro e visual, tornando-se a câmara em questão na cor vermelho. Se não se tratar de uma situação muito fora do normal, pode surgir apenas uma situação de aviso por parte do sistema, alertando na mesma que alguma modificação ocorreu (B9). O aparelho é sintonizado com a data e hora do dia em questão (B10). O ecrã exclusivo de cada câmara de incubação (C) inclui informações relevantes do paciente, incluindo o seu nome (C11), bem como o seu número de identificação nos registos clínicos (C12), e informação referente às condições atmosféricas da câmara em que a paciente está inserida, incluindo o nível de humidade (C13), a temperatura (C14) e, por fim, o nível de dióxido de carbono (C15). Imagem A disponível em <https://www.professionalsinfertility.com>, acedido a 10 de agosto de 2017, e imagens B e C adaptadas e disponíveis em Genea BIOMEDX.

As suas seis câmaras de incubação (figura 11 A1) possibilitam a monitorização conjunta de seis casos clínicos constituindo, assim, um sistema de cultura conjunta. De modo a ter acesso a todas as características físico-químicas e dados dos pacientes, cada câmara de incubação é composta por um pequeno ecrã frontal (figura 11C) que apresenta variadas informações associadas aos mesmos. Quando todas estas condições se encontram nos seus limites adequados, a confirmação apresenta-se, igualmente, registada nestes pequenos ecrãs.

Para além de conseguir manter a uniformidade em termos de temperatura e composição gasosa (menos de um minuto de recuperação de temperatura após abertura ou fecho da tampa e menos de três minutos para recuperação de CO<sub>2</sub> após a mesma situação), apresentando o interior de cada câmara de incubação 6% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 37° C de temperatura, este sistema possibilita esta grande propriedade visto que, cada vez que há abertura ou fecho das tampas das câmaras, uma pequena porção de gás atmosférico é perdido para o exterior e verifica-se, igualmente, uma pequena diminuição de temperatura. O sistema de sinalização emite um alerta no caso de estes parâmetros de incubação diferirem da situação adequada (Genea BIOMEDX).

Para além destes componentes, o ecrã principal *touch*, identificado pela letra B na figura 11, constitui o ecrã do utilizador ou *homepage* do sistema, necessário para que o embriologista possa aceder ao sistema de bancada do Geri+.

Igualmente, uma característica relevante do Geri+ é a presença de filtros HEPA, que permitem uma filtração adequada das partículas circulantes na mistura de gases fornecida ao aparelho para um ambiente o mais estéril possível.

### 3.3.2.2. Ecrã do utilizador principal

O acesso a cada câmara de incubação, bem como a obtenção de variados dados sobre as condições atmosféricas no interior das mesmas pode ser feito a partir da *homepage* principal do sistema Geri+, o ecrã frontal *touch* que este apresenta. Contudo, este ecrã não se limita apenas a dispor ao embriologista toda a informação relativa aos casos clínicos a serem tratados no momento, sendo fulcral na alteração e configuração de qualquer ferramenta que o sistema apresenta. Assim, está exposta uma opção de definições que permite aceder a variadas funções, umas relacionadas com as câmaras de incubação, como definir os seus parâmetros em relação às condições gasosas (temperatura, humidade e concentração de CO<sub>2</sub>) no seu interior ou até fazer uma revisão destas condições, obter informações sobre os planos focais e, se requerido, fazer as alterações necessárias ou associadas a informação sobre a tipologia dos ciclos a serem seguidos na clínica, exportar informações relativas à monitorização para uma fonte

externa, como uma *pen drive* e até desligar o aparelho. Um resumo destes itens que podem ser acedidos nesta interface apresenta-se na figura 12.

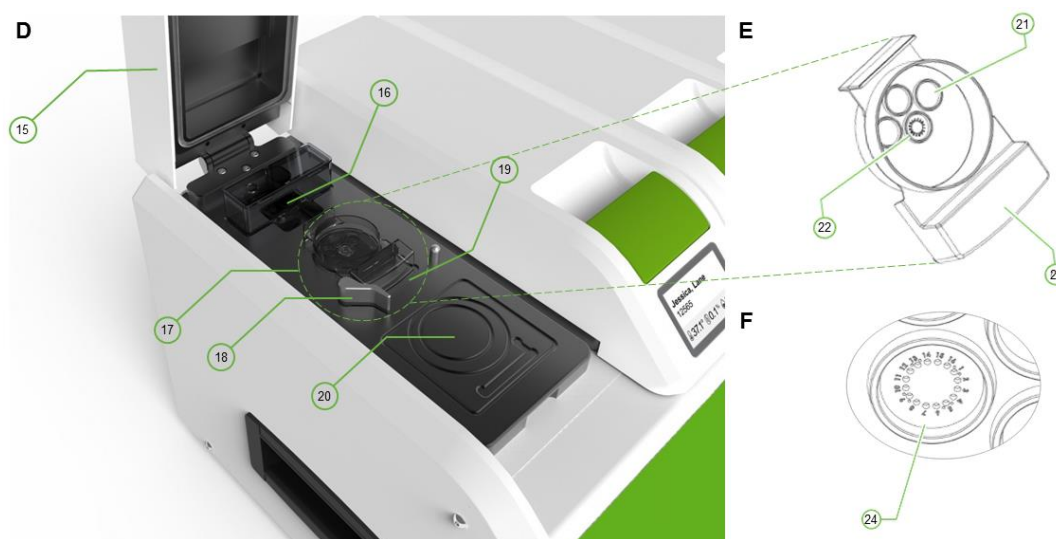


**Figura 12-** Interface acedida a partir do ecrã principal do sistema de laboratório Geri+, com disponibilidade de várias funções, desde o acesso às condições atmosféricas em cada câmara individual até à opção de extração de dados relativos a um caso desejado de uma câmara à escolha. Adaptado de Genea BIOMEDX.

Relativamente a uma destas opções disponibilizadas pela *homepage* do aparelho Geri+, esta inclui a apresentação da mesma sob a forma de gráfico, onde todas estas opções aparecem disponibilizadas diretamente. Nesta página é apresentada a variação de vinte e quatro horas dos parâmetros atmosféricos referidos anteriormente. Igualmente, se o utilizador quiser a informação exclusiva sobre estes parâmetros em cada câmara, a opção de “*incubator parameters*” pode disponibilizar todas estas informações, no entanto considerando cada câmara isoladamente. Como referido, o sistema Geri+ possui um sistema de aviso e alerta caso haja a modificação de alguns destes *settings*, possibilitando ao utilizador a ativação ou desativação dos mesmos, para cada parâmetro considerado e em cada câmara de incubação.

### 3.3.2.3. Câmaras de incubação do aparelho Geri+

As seis câmaras de incubação do aparelho Geri+ apresentam uma constituição complexa e específica, reunindo todos os componentes básicos para uma incubação de excelência e uma captação de imagem perfeita (figura 13) e apresentando características minuciosas que asseguram, sobretudo, uma ótima colocação do disco de incubação em perfeita posição em relação ao local onde está inserida a câmara fotográfica.



**Figura 13-** Representação do interior de uma câmara de incubação do aparelho Geri+ (D). Ao levantar a tampa de cada câmara (D15) observam-se variados compartimentos na mesma, incluindo uma posição que permite a circulação gasosa e de vapor de água (D16), que estabelece a ligação com as entradas de acesso da botijas de gás (nomeadamente  $\text{CO}_2$  e  $\text{O}_2$ ), a posição da câmara fotográfica (D17) responsável pela captação de imagens características do desenvolvimento do embrião e, por último, uma posição que permite pousar placas de quatro poços de manutenção embrionária de 35 milímetros (anel interior) e 60 milímetros (anel exterior), representada em D20. Estas últimas posições são extremamente úteis porque possibilitam aos embriologistas uma maneira facilitada e segura de manipulação dos embriões e a sua transferência destas placas de cultura para os discos Geri+ específicos para este aparelho (E). A patilha representada por D18 é utilizada para fixar a posição do disco Geri+ e a saliência na extremidade da posição do disco demarca a posição da extremidade final para colocação correta do mesmo (D19). Os discos Geri+ (ou Geri-DSH-20) são constituídos por três partes fundamentais, incluindo os três poços de lavagem (E21), preenchidos com meio de cultura específico necessário para lavagens de óocitos ou embriões, um poço central (E22) composto por dezasseis micro-poços de alta precisão e transparência com um diâmetro de 430  $\mu\text{m}$  (micrómetros) e profundidade de 400  $\mu\text{m}$  (F24), e, por fim, a extremidade do disco (E23) que permite que o embriologista manuseie este disco para inserção ou remoção do Geri+. Imagem D disponível em <https://www.good-design.com/entry/geri/>, acedido a 10 de agosto de 2017, e imagens E e F adaptadas de Genea BIOMEDX.

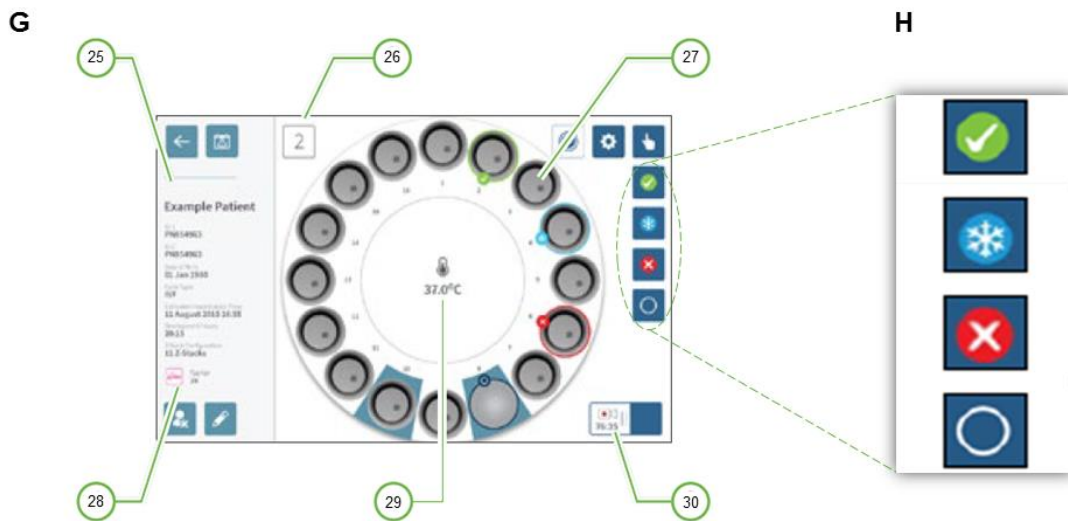
Os discos Geri+ (ou Geri-DSH-20 como especificado no manual de utilização) são constituídos por três partes fundamentais, representadas na figura 13E, que permitem ao utilizador uma prática laboratorial de boa qualidade no seu manuseio, identificação e colocação no sistema em questão. Dezasseis é o número de micro-poços construídos nestes discos Geri+ que correspondem aos locais onde vão ser inseridos os oócitos ou embriões, um em cada micro-poço, para armazenamento e monitorização. Para uma organização mais clara e precisa, cada um encontra-se numerado devidamente, de 1 a 16, de modo a que se saiba, com precisão, o micro-poço correspondente a um embrião de determinado caso clínico.

#### **3.3.2.4. Posicionamento do disco Geri+ na câmara de incubação**

O posicionamento do disco Geri+ no interior das placas de incubação é considerado um passo de precisão e de rigor, já que a sua correta colocação influencia a qualidade da captação de imagem e o seguimento e monitorização embrionária posteriores. Assim, a demarcação da posição do disco na área da posição da câmara (como verificado na figura 13D) torna evidente a posição devida de colocação, sendo que este deve ser alinhado rigorosamente de acordo com as marcas já desenhadas para este propósito. É importante assegurar que, após colocação do disco, a patilha de segurança está fechada, aproximando-a com cuidado à extremidade do disco Geri+.

#### **3.3.2.5. Acesso a cada câmara de incubação: observação e marcação do estado embrionário**

Através da interface inicial do *software* do aparelho, o acesso a uma janela referente a cada câmara, individualmente, pode ser requerido. Desta forma, a monitorização embrionária pode ser visualizada com mais pormenor e cuidado acedendo, precisamente, a esta função, onde vão ser destacadas todas as propriedades das câmaras de incubação, bem como podem ser visualizados os embriões em cultura nos micro-poços correspondentes. Esta página é ilustrada na figura 14G.



**Figura 14-** Acesso à interface referente a cada câmara de incubação (G). As informações obtidas nesta página vão desde dados associados ao caso clínico de monitorização da câmara em questão (G25), o número da câmara selecionada (G26), a representação de cada embrião inserido nos micro-poços correspondentes (exemplo de um micro-poço ocupado por um embrião em G27) e determinação da temperatura no interior da câmara (G29). Para cada embrião, o sistema dispõe de uma classificação simbólica (H), simples e de fácil compreensão, no qual possibilita que o embriologista marque um micro-poço com os símbolos apresentados. Desta forma, o primeiro símbolo está associado a uma situação de transferência, o que significa que, naquele caso, o embrião a que este símbolo foi atribuído apresenta uma grande chance de ser selecionado e transferido para o útero. O segundo símbolo refere uma situação de criopreservação, o que indica que este será o destino do embrião marcado com o mesmo. Já o terceiro simboliza uma situação de exclusão do embrião, sendo que o mesmo será descartado e, por isso, não considerado para transferência devido a um desenvolvimento anormal, morfológico ou morfocinético. Por fim, o último símbolo é atribuído pelo utilizador a um micro-poço vazio (sem embriões incubados). Outras opções podem ser acedidas nesta interface incluindo a indicação se aquele caso clínico está a ser avaliado automaticamente pelo Eeva test (G28) e a indicação de captação de imagem (G30), bem como o tempo desde a inseminação, a que os embriões estão submetidos (em horas e minutos). Adaptado de Genea BIOMEDX.

Esta interface, identificada com o nome da paciente e referente ao número da câmara de incubação exclusiva para o seu caso, apresenta uma visão detalhada dos dezasseis micro-poços do disco Geri+ e dos respetivos embriões neles armazenados.

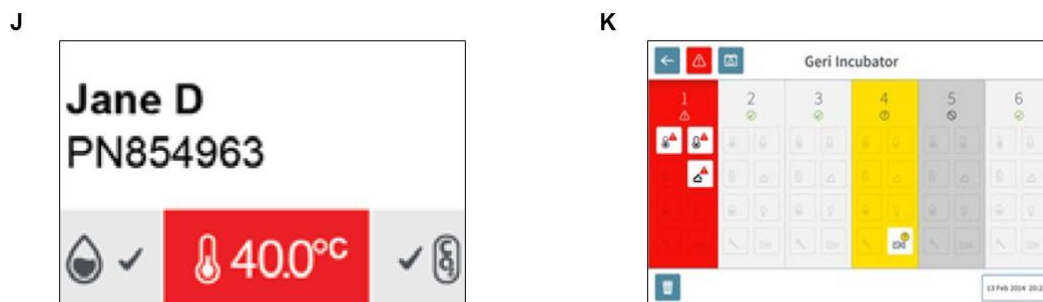
O Geri+ apresenta a possibilidade, com base na avaliação prévia de morfologia e parâmetros morfocinéticos, de classificar simbolicamente cada embrião, disponibilizando ao embriologista que segue cuidadosamente a progressão de cada um, uma lista de ícones, cujo significado varia consoante o seu destino. A título de exemplo, o embrião localizado no micro-poço dois estaria em condições para ser transferido, visto que cumpre todos os requisitos para tal procedimento. Contrariamente, o embrião cultivado no micro-poço seis estaria destinado a ser descartado porque, por alguma razão, não teve o desenvolvimento ótimo para ser selecionado e transferido.



### 3.3.2.6. Sistema de alarmes e avisos do Geri+

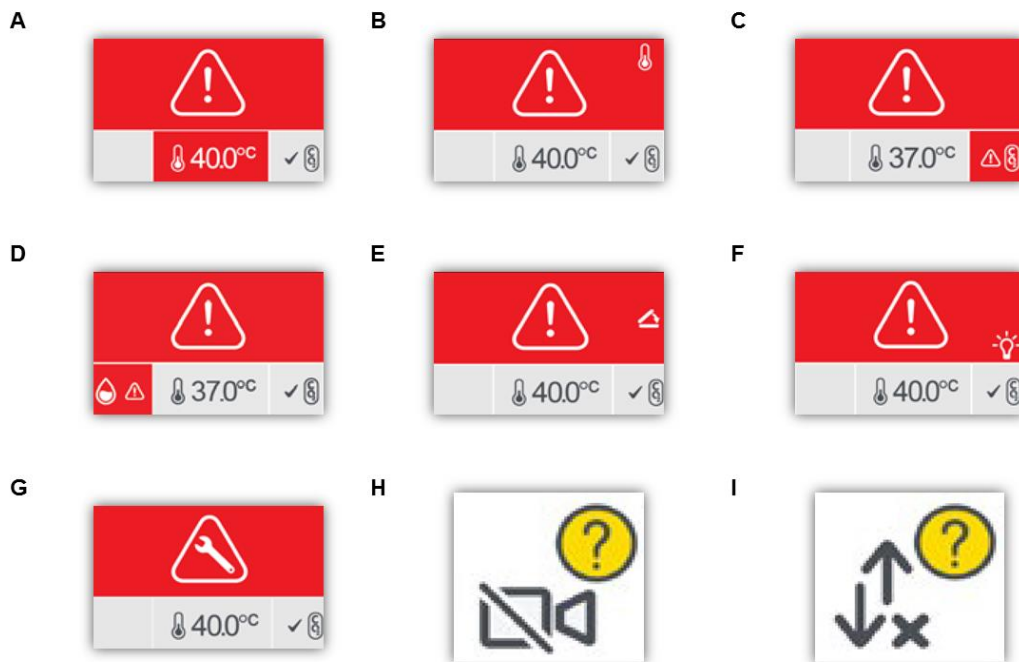
Como mencionado anteriormente, alguma alteração ocorrente no sistema é imediatamente alertada por um sistema visual e sonoro. Assim, o sistema Geri+ apresenta uma propriedade importantíssima para o utilizador: um sistema de avisos e alarmes aquando de qualquer alteração do ambiente das câmaras de incubação, mostrando uma cor diferente conforme seja um aviso, cor amarela, ou uma situação alarmante, cor vermelha (conforme ilustrado na figura 11B), esta última conjugada com um sinal sonoro.

Esta informação pode ser visualizada no pequeno ecrã frontal exclusivo das câmaras de incubação (figura 15J) ou, para mais detalhes numa página fornecida pelo Geri+ referente apenas a esta situação, apresentando uma visão geral de todas as câmaras e a cor referente à situação anormal na (s) câmara (s) em que esta se verifica (figura 15K).



**Figura 15-** Representação de uma situação alarmante ilustrativa um grande aumento de temperatura dentro de uma câmara de incubação (J). Na figura K é possível observar o panorama geral das seis câmaras de incubação, em que duas estão a indicar uma situação de alarme (câmara 1, cor vermelha) e de aviso (câmara 4, cor amarela). Adaptado de Genea BIOMEDX.

Adicionalmente, cada parâmetro alterado apresenta uma imagem simbólica própria, para facilitar ao embriologista o conhecimento do que tem que ser corrigido. Estes símbolos estão ilustrados na figura 16.



**Figura 16-** Representação simbólica de várias situações referentes a alarmes (A a G) e a avisos (H e I). A e B são referências a alarmes relativos a uma mudança de temperatura, ativado numa situação de subida ou descida de 0,4 °C, e a uma falha ou erro no sistema de aquecimento, respetivamente. Por sua vez, C e D representam, respetivamente, situações de alarme em que há uma variação da concentração de CO<sub>2</sub> e dos níveis de humidade para além dos aceitáveis. A imagem E representa a situação em que a tampa da câmara de incubação foi deixada aberta pelo utilizador, situação que deve ser de evitar, e F simboliza a ocorrência de alguma falha intrínseca à câmara de incubação, alarmando para uma situação de reparo imediato da mesma câmara. Por fim, H e I correspondem, respetivamente, a avisos de falha de comunicação entre o sistema Geri+ de bancada e o sistema externo computacional, seja na falha de captação de imagem ou a nível do acesso a uma câmara de incubação. Adaptado de Genea BIOMEDX.

Quer seja um alarme (figura 16A a G) ou um aviso (figura 16H a I), este sistema de comunicação do Geri+ apresenta vantagens evidentes, não só pela simples chamada de atenção que executa, mas também pela tentativa de executar uma cultura embrionária perfeita já que, como mencionado anteriormente, a menor variação do ambiente ideal para o embrião pode ter repercursões futuras graves na sua sobrevivência e no sucesso de todo o tratamento de infertilidade.

### 3.3.2.7. Captação e gravação de imagens relativas ao desenvolvimento embrionário humano

A câmara fotográfica do aparelho Geri+ (2560 x 1928 pixels com sensores monocromáticos CMOS ou *Complementary Metal Oxide Semiconductor*), representada na figura 13D com o número 17, é altamente especializada para o seu propósito, com uma resolução de dois pixels por  $\mu\text{m}$ , iluminação LED (*Light Emitting Diode*) com um comprimento de onda de 591 nm (nanómetros) não nocivo para os embriões, emitido em menos de 0,005 segundos por imagem em cada fotografia retirada e um total de duração de exposição do *flash* fotográfico de menos de 125 segundos por dia e por embrião exposto, o que torna estes segundos de exposição negligenciáveis na sua ação negativa perante a cultura embrionária <sup>9</sup>.

A frequência com o que o Geri+ consegue captar *frames* relativos a cada etapa de desenvolvimento embrionário corresponde a intervalos de cinco minutos, sendo automatizado a um total de captação de noventa e seis imagens em onze planos focais distintos <sup>10</sup>. Neste aparelho é possível fazer a alteração do número de planos focais a serem considerados na captação de imagem, bem como da distância entre os mesmos, e também fazer o ajuste de algumas propriedades da imagem captada, englobando o foco, o contraste e o alinhamento da câmara em relação à posição do disco.

A página de cada câmara de incubação (ilustrada na figura 14) dá acesso a opções que possibilitam o começo da captação/gravação de *frames* relativos ao desenvolvimento embrionário. No entanto, um primeiro passo fundamental, ainda na fase de introdução do paciente no aparelho Geri+, inclui a definição do tipo de ciclo que a paciente está a efetuar. Isto porque, consoante o tipo de ciclo, o tempo de início de inseminação pode apresentar uma pequena variação, como demonstrado na tabela 2.

---

<sup>9</sup> Fonte bibliográfica <https://www.professionalsinfertility.com/en/our-fertility-technology/geri.html>, acedido a 7 de agosto de 2017

<sup>10</sup> Fonte bibliográfica <https://www.professionalsinfertility.com/en/our-fertility-technology/geri.html>, acedido a 7 de agosto de 2017

**Tabela 2-** Representação das diferentes opções, disponíveis no momento de introdução de um paciente no sistema Geri+, representativas do tipo de ciclo efetuado. Esta ferramenta é de tal maneira importante que permite uniformizar o tempo inicial de captação de imagem para que todos os *frames* analisados de casos diferentes apresentem tempos de ocorrência referentes ao mesmo ponto inicial, já que diferentes tipologias de ciclos apresentam tempos de iniciação de desenvolvimento distintos (em horas, ICSI corresponde a *Intracytoplasmic Sperm Injection* ou Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides e FIV a Fertilização *In Vitro*. Adaptado de Genea BIOMEDX.

<b>Tipologia do ciclo efetuado</b>	<b>Intervalo de tempo desde a inseminação (h)</b>
ICSI	0
Oócito criopreservado/descongelado	0
FIV	18
Embrião de 2º dia criopreservado/descongelado	36
Embrião de 3º dia criopreservado/descongelado	60
Embrião de 4º dia criopreservado/descongelado	84
Embrião de 5º dia criopreservado/descongelado	108
Embrião de 6º dia criopreservado/descongelado	132
ICSI de recurso	0

Assim, a comparação da cinética de embriões provenientes de ciclos distintos pode ser efetuada com maior relevância e significado, visto que todos os tempos de ocorrência de um determinado marco de desenvolvimento está referenciado em relação ao mesmo patamar inicial. O tempo de gravação apresentado neste aparelho aparece indicado, em horas após inseminação, na página de cada câmara de incubação (figura 14 número G30).

Para um maior detalhe e supervisão é possível realizar uma seleção de cada embrião monitorizado, selecionando o micro-poço correspondente. Consequentemente, uma nova página é criada com a ampliação do micro-poço e do embrião contido no mesmo (figura 17).



**Figura 17-** Representação da interface apresentada na seleção e ampliação de um determinado micro-poço de uma câmara de incubação. Para além da devida identificação do micro-poço correspondente com o nome da paciente em questão (I31 e 32, respetivamente), uma imagem ampliada do embrião pode ser obtida, de forma a visionar todas as etapas de desenvolvimento do mesmo, tanto pelo manuseio, para a esquerda (retrocesso) ou direita (avanço) da barra temporal indicada com a letra e número I37. O tempo inicial de inseminação é apresentado na barra azul escura do canto inferior esquerdo (I36) e o tempo total de captação de imagem, desde o início da captação de imagens associadas ao desenvolvimento do embrião em questão, é, igualmente, indicado (I35), de modo a que o embriologista acompanhe todos os momentos em pormenor e conheça a etapa de desenvolvimento em que o embrião se encontra em cada momento. Para embriões avaliados pela opção *Eeva test*, o tipo de microscopia correspondente é de campo escuro, pelo que esta opção terá de ser selecionada para estes casos em específico (I34). Adaptado de Genea BIOMEDX.

Uma propriedade muito relevante neste sistema consiste no retrocesso ou avanço do conjunto de imagens fotografadas até ao último momento de captação, funções essas que podem ser acedidas a partir da interface representada na figura 17. Consequentemente, todo o processo de visionamento torna-se mais claro e preciso, de tal modo que o embriologista pode retroceder ou avançar no processo de desenvolvimento embrionário até ao evento celular que deseja visualizar. Na mesma barra é apresentado o tempo, em horas, ocorrido após inseminação para fornecer ao utilizador uma referência temporal de quando um determinado episódio de desenvolvimento ocorreu. Esta lógica torna possível a avaliação embrionária com base nos tempos ocorridos após inseminação dos eventos celulares mais marcantes na história do desenvolvimento embrionário, contando, igualmente, com a avaliação morfológica baseada em critérios específicos e pré-determinados.

### 3.3.2.8. Exportação de dados relativos ao desenvolvimento embrionário humano

A exportação de dados, incluindo todo o conjunto de *frames* fotografados pelo Geri+ de um dado casal, informação sobre os parâmetros intrínsecos ao aparelho (incluindo os níveis de gases atmosféricos, temperatura e humidade) e referentes a cada câmara de incubação e até dados relativos ao próprio, pode ser conseguida através de um sistema de exportação fornecido pelo Geri+ para uma *pen drive* externa.

### 3.3.2.9. Sistema computacional do sistema Geri+: Geri connect

Para além do aparelho de bancada com estrutura apresentada nas seções anteriores, o Geri+ possui um sistema de conexão que permite que o *software* associado ao aparelho seja acedido através de uma ligação e acesso a uma rede local (LAN, *local area network*), estabelecida no momento de instalação do aparelho, noutra dispositivo computacional presente numa diferente divisão da clínica. Esta aplicação de ligação ao sistema Geri+ designa-se Geri Connect. Desta forma, a informação disponibilizada pelo aparelho presente no laboratório de embriologia é sincronizada automaticamente com o computador externo ligado a este mesmo *software*. A imagem computacional do sistema Geri+ está ilustrada na figura 18.



**Figura 18-** Representação do sistema e *software* Geri Connect, o sistema computacional externo com ligação ao sistema Geri+ inserido no interior do laboratório de embriologia. Existe uma estreita ligação e troca de dados entre os dois sistemas, de modo que haja a mesma informação de todos os casos contida nestes dois segmentos e que novos dados sejam atualizados em ambos quando introduzidos em cada um. O servidor do Geri Connect apresenta uma capacidade de armazenamento de 5,3 TB (*Terabytes*), de modo a que todas as gravações referentes a todos os pacientes cujos embriões são monitorizados pelo Geri+ sejam registadas e armazenadas. Disponível em <https://www.professionalsinfertility.com>. Acedido a 10 de agosto de 2017.

Igualmente ao sistema tratado anteriormente, a extensão computacional do Geri+ permite a realização de várias funções importantes, como o acesso aos casos clínicos a serem tratados num determinado momento, possibilidade de obter as captações de imagens embrionárias fotografadas pelo *time-lapse* ou, até, a possibilidade de extração de dados, como referido na secção “3.3.2.8. *Exportação de dados relativos ao desenvolvimento embrionário humano*”.

Para aceder a este sistema, o Geri *Connect* dá a opção de um acesso restrito e de um acesso não restrito (ou administrador), com palavra-passe para cada utilizador, sendo que esta última categoria apresenta acesso a informação confidencial dos pacientes, consegue permitir a alteração de algum elemento referente às imagens embrionárias, como a sua classificação, e fornece autorização para permitir a sincronização entre o aparelho Geri+ de bancada e o Geri *Connect*, tendo este a última palavra na adição de computadores externos ao sistema Geri *Connect*. Para além de todas estas regalias, o administrador pode adicionar ou controlar os utilizadores do sistema e alterar dados referentes aos mesmos.

Na entrada de um administrador ou utilizador no Geri *Connect* é apresentada uma lista dos casos clínicos a serem monitorizados pelo *time-lapse* naquele momento. Nesta página é possível fazer a introdução ou atualização (em relação ao sistema Geri+) de novos pacientes ou de pacientes já colocados no *time-lapse*, respetivamente.

No Geri *Connect*, também é possível aceder ao interior das câmaras de incubação, e visualizar, desta forma, os micro-poços correspondentes, bem como os embriões incubados e selecionados de um determinado micro-poço (figura 19).



**Figura 19-** Representação da interface de acesso a cada câmara de incubação e micro-poços correspondentes pelo Geri Connect. Aquando da seleção desta opção em particular, o controlo de toda a captação de imagem do embrião é possível, apresentando, no canto inferior direito, todos os comandos para parar, pôr em pausa, visualizar *frames* antigos ou mais recentes na escala temporal (permitindo a alteração da frequência de captação de imagem em cinco, dez ou trinta minutos), alterar os planos de focagem, mudar para outros micro-poços e, ainda, exportar dados relativos às imagens do embrião selecionado no momento. Igualmente, a categorização dos embriões com base nos diferentes símbolos (cujo significado está expresso na secção “3.3.2.5. Acesso a cada câmara de incubação: observação e marcação do estado embrionário”) pode ser efetuada, também, com recurso a esta parte integrante. Adaptado de Genea BIOMEDX.

A exportação, no caso do Geri Connect, de dados importantes pode incluir variadas situações, seja de exportar apenas imagens embrionárias ou um vídeo completo, seja de ter acesso a um documento que contenha dados dos pacientes conjugados com algumas imagens dos embriões correspondentes ao mesmo caso clínico com imagens retiradas em cada dia da monitorização embrionária pelo Geri+. Um registo de todos os alarmes, avisos ou parâmetros atmosféricos das câmaras de incubação, também, podem ser exportados.

### 3.3.2.10. Geri Assess: componente complementar do Geri+

Por definição, o Geri Assess é o componente presente no dispositivo externo, conetado com o incubador Geri+, que permite ao utilizador atribuir uma classificação a cada embrião monitorizado, baseando-se na seleção de eventos de desenvolvimento importantes a serem registados, observações que avaliem o progresso de um embrião e os símbolos de classificação abordados anteriormente, após uma visualização precisa e atenta de todos os *frames* captados pelo *time-lapse*.



Assim, o sistema Geri Assess dispõe de quatro categorias principais de divisão desta classificação (tabela 3): eventos, correspondendo a episódios/capítulos de desenvolvimento importantes com um determinado valor de classificação, eventos representativos e com ocorrência obrigatória que antecipam marcos importantes de desenvolvimento, eventos que têm que ocorrer antes de um evento obrigatório e observações registadas sempre que se verifica um aspeto negativo podendo estas apresentar um *score* positivo ou negativo consoante a situação que se trata. Consequentemente, o utilizador tem a possibilidade de, no retrocesso das imagens captadas pelo sistema *time-lapse*, classificar todos estes fenómenos com base num *score* definido pelo mesmo. Esta propriedade facilita para o utilizador a tarefa de avaliação embrionária, possibilitando que o mesmo possa marcar na barra temporal estas categorias com base em símbolos específicos para cada uma. O Geri Assess apresenta, igualmente, exemplos de eventos, observações, eventos obrigatórios e capítulos de desenvolvimento fornecidos pelo próprio sistema, contudo o utilizador tem a liberdade de alterar os eventos e as observações, sendo que os capítulos de desenvolvimento encontram-se, aparentemente, pré-definidos. Estes capítulos baseiam-se nos tempos de ocorrência de determinados marcos de desenvolvimento, usufruindo da morfocinética (conceito abordado no “*Capítulo IV- Cinética de desenvolvimento humano embrionário*”) para atribuição de um *score* de boa ou má qualidade embrionária. De seguida apresenta-se um resumo destas categorias bem como exemplos de ocorrências celulares propostos pelo Geri Assess.

**Tabela 3-** Representação dos vários eventos celulares que podem ser selecionados pelo utilizador através do Geri Assess, de modo a demarcar, na avaliação embrionária, as etapas de desenvolvimento mais marcantes e significativas. Adaptado de Genea BIOMEDX.

<b>Capítulos de desenvolvimento</b>	<b>Eventos obrigatórios</b>	<b>Eventos</b>	<b>Observações</b>
Fertilização	Aparecimento de pronúcleos	---	Vacúolos Um PN Reticulo endoplasmático liso Sem formação de halo Três PN Corpos de inclusão
Divisão até quatro blastómeros	Estado de quatro blastómeros	Desaparecimento de PN Estados de dois a três blastómeros	Vacúolos Nível de fragmentação (10 a 25%) Multinucleação Clivagem direta Tamanho dos blastómeros Divisão irregular
Divisões até o estado de oito blastómeros	Estado de oito blastómeros	Estado de cinco a sete blastómeros	Vacúolos Nível de fragmentação (10 a 25%) Multinucleação Tamanho dos blastómeros Divisão irregular Clivagem reversa Número de blastómeros
Estado de mórula	Estado de mórula	Compactação	Vacúolos Nível de fragmentação (10 a 25%) Multinucleação Clivagem reversa Número de blastómeros
Blastocisto expandido	Expansão do blastocisto	Cavitação e estabelecimento da fase de blastocisto	Colapso do blastocisto Ausência de MCI Fragmentação em TE ou MCI Compactação incompleta de MCI Número de células da TE Dupla camada de MCI

Uma vantagem adicional do sistema Geri+ corresponde à possibilidade de implantação da classificação de três dias do sistema Eeva™ na monitorização e avaliação pelo Geri+ (figura 20), sendo que existem algumas opções a serem efetuadas.



Opção de ligar/desligar o diagnóstico do Eeva™ test

**Figura 20-** Representação da opção de seleção do sistema de avaliação Eeva test disponibilizado pelo Geri+ para casos em que seja necessário fazer o seguimento automático com recurso a esta ferramenta. Adaptado de Genea BIOMEDX.

Primeiramente, o sistema deve permanecer intocável para o caso de onde está a ser aplicado o Eeva test, para minimizar distúrbios na classificação, e o próprio aparelho está programado para selecionar apenas um plano focal (dos onze disponíveis) e diminuir em 10 ms a exposição do embrião à luz da captação da câmara. Todas estas opções são necessárias para otimizar as condições de cultura e torna-las semelhantes ao sistema Eeva™, já que o sistema original opera com apenas um plano focal e utiliza microscopia de campo escuro. Assim, o embriologista pode permitir, através da opção apresentada na figura 20, que um determinado embrião seja escolhido para ser avaliado precocemente pelo Eeva™ test.

## Capítulo IV

### Cinética de desenvolvimento embrionário humano

“(...) a identificação de certos marcadores tardios de desenvolvimento (...) são tão vitais para a classificação como os parâmetros morfocinéticos durante fases iniciais de desenvolvimento embrionário. (...) outros parâmetros morfocinéticos (...) podem influenciar em grande escala a seleção clínica de embriões, oferecendo novas oportunidades e métodos para os embriologistas”.

Mandawala, A. A.; Harvey, S. C.; Roy, T. K.; Fowler, K. E. (2016). Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis. *Animal reproduction science*, 174: 2-10.

## 4. Morfocinética e a sua aplicação na avaliação embrionária

O desenvolvimento embrionário humano, por si só, apresenta-se como um acontecimento progressivo e altamente controlado, de modo que todos os fenómenos celulares marcantes ocorram no *timing* específico e sem erros. Uma componente genética forte e uma variação temporal da expressão de genes responsáveis por variadas mudanças a nível do desenvolvimento podem estar na base do sucesso da sua progressão (Yi *et al.*, 2010), de tal modo que deverá ser do interesse do embriologista analisar todo o conjunto de mudanças graduais que, temporalmente, se vão fazendo notar.

Neste capítulo será abordada, desta forma, uma vertente inovadora, revolucionária e com aplicação bastante frequente na avaliação embrionária, a morfocinética. Desta forma, a ascensão do uso de aparelhos time-lapse na compreensão de processos celulares associados à embriologia humana potenciou a criação desta vertente para que, aliada à avaliação convencional conhecida, constitui-se uma forte complementação para garantir a máxima confiança na seleção e transferência de embriões ou blastocistos.

### 4.1. Conceito de morfocinética

A determinação do exato tempo de ocorrência de marcos celulares de desenvolvimento, para um embrião de desenvolvimento embrionário normal, permitiu que o *time-lapse* pudesse fazer esta leitura temporalmente variável e aprovar a transferência de um determinado embrião considerando, assim, esta análise de marcos ou etapas de desenvolvimento com *timings* determinados e já conhecidos.

Estes marcos podem ser, então, designados por parâmetros morfocinéticos e dão lugar ao conceito de morfocinética, um princípio definido como a junção entre a duração precisa de um determinado evento padronizado de desenvolvimento embrionário com a morfologia do próprio embrião (Campbell, 2015b; Armstrong *et al.*, 2015a). Vários são os marcos que podem ser nomeados ao longo de toda a progressão embrionária, estejam estes englobados nas fases de clivagem do embrião, nas fases mais tardias de desenvolvimento (mórula ou blastocisto) ou, ainda, na determinação de parâmetros secundários relevantes para análise de qualidade.

#### 4.1.1. Parâmetros morfocinéticos incluídos na avaliação embrionária

A cinética do padrão de clivagem do embrião, bem como todas as suas fases e marcos intermédios e importantes, deverá ser considerada na avaliação embrionária (Kirkegaard *et al.* (2012), levando, desta forma, à determinação de marcos específicos de desenvolvimento (Armstrong *et al.*, 2015b) que sejam preditivos da qualidade do embrião. Milewski *et al.* (2015) propõe a divisão dos parâmetros morfocinéticos essencialmente em dois grupos: os absolutos, cuja leitura e determinação ocorre diretamente a partir da análise pelo time-lapse (como, por exemplo, todas as etapas de clivagem e parâmetros morfocinéticos associados às fases de mórula e blastocisto) e os relativos, cuja determinação, contrariamente aos primeiros, é indireta e dependente do conhecimento prévio dos timings dos parâmetros morfocinéticos absolutos (como ocorre para o caso do cálculo da duração de ciclos celulares ou de parâmetros de sincronização).

Nas seguintes secções (4.1.1.1. e 4.1.1.2.) serão abordados todos os parâmetros morfocinéticos inseridos nestes dois grupos, com a finalidade de os definir e de dar a conhecer a sua significância no contexto de determinação da qualidade embrionária. Por ordem cronológica e lógica das várias etapas do desenvolvimento embrionário, será apresentada a nomenclatura e terminologia propostas para cada um, já bem definida, contudo, ainda com um baixo nível de universalidade. Desta forma, estas duas secções seguintes permitirão abordar os conceitos mais gerais e com significado uniforme em toda a comunidade científica.

##### **4.1.1.1. Parâmetros morfocinéticos absolutos de desenvolvimento embrionário**

São vários os parâmetros a serem considerados e empregues na avaliação embrionária com recurso ao *time-lapse*. Desta forma, os mesmos são designados de acordo com as várias e sucessivas etapas de desenvolvimento embrionário e os tempos (t) específicos nos quais as mesmas ocorrem.

Assim, o primeiro parâmetro a ser considerado é  $t_0$  que, por definição, indica o tempo de início de inseminação no caso de ser aplicada uma técnica de FIV enquanto, para ICSI, é um indicador do meio termo entre o início e fim da injeção dos espermatozoides no citoplasma do oócito.

O momento de ocorrência da extrusão do segundo glóbulo polar, despoletado pela ocorrência da fertilização, também pode ser tido em consideração, apresentando-se

com a terminologia tPB2 (em que PB2 representa *second polar body* ou segundo glóbulo polar). Seguidamente, o *timing* de aparecimento dos dois pronúcleos (feminino e masculino), igualmente despoletado pelo processo de fertilização e correspondente à finalização da segunda divisão meiótica do oócito, pode ser registado na primeira imagem na qual ambas as estruturas celulares são visualizadas, sendo que este parâmetro morfocinético pode ser representado como tPNa (em que PNa significa *pronuclear appearance* ou aparecimento de pronúcleos).

Posteriormente, o fenómeno de fusão destas duas estruturas celulares gera o subsequente desaparecimento pronuclear que, genericamente, pode ser representado pelo parâmetro morfocinético tPNf, em que PNf significa *pronuclear fading* e o parâmetro completo corresponde ao *timing* de ocorrência do desaparecimento dos pronúcleos (Ciray *et al.*, 2014).

Todas estas etapas descritas, com a sua coordenada e respetiva cronologia, levam à formação de um zigoto, composto por uma única célula embrionária, esta que, por sua vez, irá entrar num processo regulado de divisões mitóticas sucessivas. Assim, a primeira divisão mitótica origina a formação de dois blastómeros idênticos e o tempo desde o início da inseminação ( $t_0$ ) até ao *timing* de divisão de duas células embrionárias designa-se por  $t_2$  (Ciray *et al.*, 2014). Seguidamente, estes dois blastómeros dividir-se-ão em quatro blastómeros idênticos e simétricos que, por sua vez, também iniciam os seus respetivos ciclos celulares. Consequentemente, cada *timing* de finalização destes estados apresenta uma terminologia genérica que é englobada nos parâmetros morfocinéticos de  $t_3$  a  $t_8$  (em que o número identificativo do parâmetro morfocinético corresponde ao número de blastómeros obtidos depois da ocorrência dos eventos mitóticos associados. Assim,  $t_3$  a  $t_8$  indicam o tempo de finalização, desde a inseminação até ao estado de três a oito blastómeros, respetivamente (Siristatidis *et al.*, 2015). Desta forma, todos os parâmetros compreendidos desde a primeira divisão celular até ao momento de estabelecimento de um embrião com oito células embrionárias correspondem às várias etapas do estado de clivagem embrionário (Kirkegaard *et al.*, 2012).

A partir do último estado de clivagem mencionados, as sucessivas divisões mitóticas decorrem no percurso do desenvolvimento contínuo do embrião, até criam um estado em que o número de blastómeros aumenta e não é distinguível. Nesta fase, os mesmos adquirem uma estrutura celular mais achatada e a sua maior proximidade, provocada pela diminuição do seu tamanho aquando das graduais divisões celulares, permite que o contacto entre os mesmos aumente em grande escala e se estabeleçam pontos de adesão criados pela expressão de certas proteínas. Começa, assim, o processo de compactação e começo de formação da mórula. O parâmetro morfocinético respeitante

ao timing de início da ocorrência deste fenómeno de desenvolvimento representa-se por tSC (em que SC significa start of compaction ou início da compactação, Ciray *et al.*, 2014). Estabelecido totalmente o estado de mórula, o embrião torna-se uma entidade mais coesa e unificada, de modo que a completa finalização do despoletar do processo de compactação define-se pelo parâmetro morfocinético tM (tempo desde t0 até ao estabelecimento do estado de mórula (M ou *morula*)).

Na etapa seguinte, a mórula formada começa a entrar em processo de blastulação, caracterizado por eventos de aparecimento de uma cavidade com fluído e de diferenciação celular. Assim, este processo leva ao começo da formação da estrutura embrionária mais desenvolvida na escala embrionária, o blastocisto. O parâmetro que caracteriza, desta forma, o início do processo de blastulação designa-se tSB (tempo contabilizado desde t0 até ao início da blastulação (SB, *start of blastulation*), Ciray *et al.*, 2014; Meseguer, 2016). A partir deste momento, o blastocisto começa a expandir, permitindo que haja o crescimento e desenvolvimento das suas camadas celulares constituintes, a trofoectoderme e da massa celular interna e a expansão da cavidade blastocística. Deste modo, o tempo desde t0 até à expansão celular do blastocisto caracteriza-se pelo parâmetro tEB (tempo desde t0 até a etapas de expansão e crescimento blastocístico (EB, *expansion of blastocyst*)). A contínua expansão deste blastocisto chega a um ponto de desenvolvimento máximo, altura esta determinada pelo parâmetro tB, ou seja, correspondente ao tempo desde a inseminação até ao estabelecimento de um blastocisto completamente formado, com as suas diferentes partes bastantes distintas, uma grande cavidade com fluído, uma trofoectoderme fina e periférica e uma massa celular interna com posição e morfologia adequadas (Gardner e Schoolcraft, 1999; Ciray *et al.*, 2014). No processo de reprodução natural, a última etapa antes da fixação do blastocisto ao útero, ou nidação, corresponde ao destacamento do blastocisto da zona pelúcida, esta que no processo de expansão, apresenta-se mais fina de modo a facilitar a ocorrência do mesmo. Assim, o tempo de ocorrência deste último processo celular pode ser contabilizado e visualizado ao quinto dia de cultura embrionária *in vitro*, compreendendo o parâmetro morfocinético tHD (ou *hatched blastocyst*). Meseguer, 2016 propõe um tipo de designação dos parâmetros morfocinéticos mais detalhado e com vista à descrição do progresso da massa celular interna e da trofoectoderme, assim como do grau de expansão, sendo que os mesmos encontram-se descritos na tabela 4. Assim, nesta mesma tabela é apresentado um resumo dos parâmetros morfocinéticos abordados, desde t0 à eclosão do blastocisto, juntamente com a sua definição, por ordem cronológica de acontecimentos de desenvolvimento, apresentando, para algumas etapas, parâmetros adicionais e mais detalhados que possam ser determinados ou calculados.



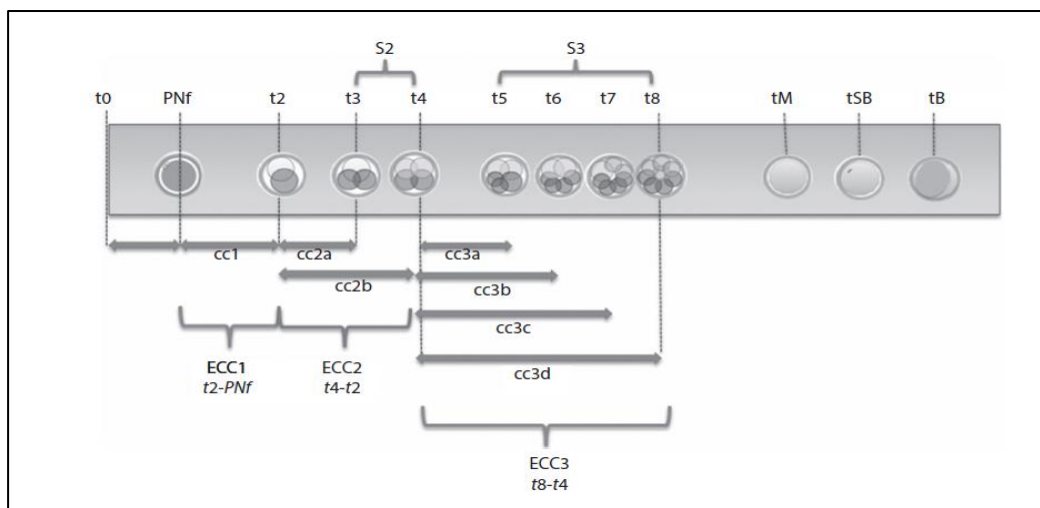
**Tabela 4-** Sumarização de todos os parâmetros morfocinéticos absolutos, desde os determinantes dos estados de clivagem (de dois a oito blastómeros) até às etapas de desenvolvimento tardio (desde a iniciação do estado de mórula até à eclosão do blastocisto). Uma breve definição dos mesmos é apresentada na segunda coluna da tabela e todos os parâmetros são definidos em horas após inseminação (ou t0). Adaptado de Ciray *et al.*, 2014 e Meseguer, 2016.

Parâmetros morfocinéticos	Descrição dos parâmetros morfocinéticos
t0	Tempo de início de FIV ou meio-termo no caso de ICSI
tPB2	Tempo de extrusão do segundo glóbulo polar
tPN	Tempo de confirmação da ocorrência de fertilização
tPNa	Tempo decorrido desde a inseminação até ao aparecimento dos dois pronúcleos
tPNf	Tempo decorrido desde a inseminação até ao desaparecimento ( <i>fading</i> ) dos glóbulos polares (ou singamia)
tZ	Momento de classificação dos pronúcleos.
t2	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de embrião com dois blastómeros
t3	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de embrião com três blastómeros
t4	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de embrião com quatro blastómeros
t5	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de embrião com cinco blastómeros
t8	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de embrião com oito blastómeros
t9	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de embrião com nove blastómeros
tSC	Tempo decorrido desde a inseminação até à fase inicial de compactação
tM	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de mórula
tSB	Tempo decorrido desde a inseminação até à fase de início da blastulação (SB- <i>start blastulation</i> )
tB ou tByz	Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de formação completa de blastocisto. tByz corresponde à mesma etapa, considerando “y” como a morfologia da MCI e “z” como a morfologia de TE
tEB ou tEyz	Tempo decorrido desde a inseminação até ao início da expansão do blastocisto. tEyz corresponde à fase de desenvolvimento, considerando “y” como a morfologia da MCI e “z” como a morfologia da TE
tHNyz	Tempo decorrido desde a inseminação até a uma fase intermédia entre o fim da expansão e o início da eclosão do blastocisto da zona pelúcida ( <i>Herniation</i> ). “y” simboliza a morfologia da MCI e “z” a morfologia da TE
tHDyz	Tempo decorrido desde a inseminação até à fase de eclosão completa do blastocisto da zona pelúcida (H- <i>hatching</i> ou eclosão). “y” simboliza a morfologia da MCI e “z” a morfologia da TE

#### **4.1.1.2. Parâmetros morfocinéticos relativos de desenvolvimento embrionário**

Estes parâmetros morfocinéticos de análise dos padrões de desenvolvimento adicionais e secundários podem constituir um critério a considerar na avaliação embrionária. Designam-se como relativos visto que a sua duração (em horas) é determinada através da determinação prévia dos *timings* dos parâmetros absolutos. Desta forma, esta categoria de parâmetros morfocinéticos inclui os que avaliam a duração dos ciclos celulares e eventos de sincronização das divisões mitóticas sofridas pelo embrião, bem como pode englobar diferenças temporais entre etapas de desenvolvimento absolutas.

A duração dos ciclos celulares revelou-se como um grande fator aliado na avaliação embrionária, sendo que estes processos também têm uma duração e ocorrência definidas e específicas. Como mencionado, a passagem de zigoto para embrião e deste para blastocisto engloba uma longa ronda de ciclos celulares, estes responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do embrião e controladas, maioritariamente, por fatores genéticos. A figura 21 ilustra todos estes eventos com as respetivas designações.



**Figura 21-** Parâmetros morfocinéticos e suas respectivas alocações nas diversas etapas de desenvolvimento embrionário, desde t0 (tempo de iniciação da inseminação para FIV e tempo intermédio para ICSI) até ao momento de formação do blastocisto após inseminação (tB). PNF representa *pronuclear (PN) fading (f)* ou desaparecimento pronuclear. t2 a t8 correspondem a parâmetros morfocinéticos indicadores do tempo decorrido desde a inseminação até ao estabelecimento do estado de duas a oito células embrionárias. Os primeiro, segundo e terceiro ciclos celulares embrionários (ECC1, 2 e 3, sendo que ECC significa *Embryonic Cell Cycle*) incluem o primeiro ciclo celular (cc1), o segundo ciclo celular, subdividido em duas partes (cc2a, culminando no embrião com três células embrionárias e cc2b, terminando o embrião com quatro células embrionárias), cuja duração total pode ser determinada pela diferença entre t4 e t2, e, por fim, o terceiro ciclo celular, subdividido em quatro eventos de mitose (cc3a a cc3d, sendo que o embrião progride para fases de cinco a oito células embrionárias). A duração deste último parâmetro relativo pode ser determinada pela diferença entre t8 e t4. tM representa o parâmetro morfocinético correspondente ao tempo decorrido desde t0 até ao estabelecimento do estado de mórula (M representa *morula* ou mórula). tSB e tB são parâmetros representativos do estado de blastocisto, em que tSB corresponde ao tempo decorrido desde t0 até ao momento de começo da blastulação (SB significa *Star Blastulation*) e até à formação terminada e expansão total do blastocisto (tB, em que B representa *blastocyst*). Os parâmetros relativos s2 e s3 correspondem a parâmetros de sincronização de divisões celulares e do padrão de clivagem, respetivamente (s significa *synchronization* ou sincronização). s2 é determinado pela diferença entre t4 e t3 e s3 pela diferença entre t8 e t5. Adaptado de Campbell, 2015a.

Assim, o primeiro ciclo celular (cc1 ou ECC1, em que ECC corresponde a *Embryonic Cell Cycle*) sofrido pela célula primordial ou zigoto após fertilização dá origem a duas células geneticamente iguais e a sua duração pode ser calculada pelo intervalo de tempo desde o desaparecimento dos pronúcleos até ao momento em que o embrião se encontra no estado de dois blastómeros (Hojnik *et al.*, 2016). Englobado no primeiro ciclo celular, um outro fator que pode, igualmente, constar entre os critérios de avaliação relevantes e significativos constitui a duração da primeira citocinese (Wong *et al.*, 2010), que corresponde ao intervalo de tempo compreendido entre o aparecimento do fuso acromático para iniciação da primeira divisão mitótica até à sua finalização e obtenção de dois blastómeros individualizados (Kirkegaard *et al.*, 2012).

Posteriormente, os dois blastómeros formados sofrem uma segunda divisão mitótica, iniciando o segundo ciclo celular embrionário (cc2 ou ECC2). Visto que, neste segundo ciclo, existem dois eventos mitóticos a ocorrer, correspondentes a cada célula

embrionária, pode ser feita uma subdivisão em dois grupos: cc2a, para a divisão de um dos blastómeros (originando um embrião com três células embrionárias) e cc2b, para o outro, culminando num embrião com quatro células-irmãs (Hojnik *et al.*, 2016). Assim, a duração do parâmetro em questão corresponde ao intervalo de tempo entre o estado de dois (t2) e o de quatro blastómeros (t4).

Por sua vez, no terceiro ciclo celular embrionário (cc3 ou ECC3), os quatro blastómeros do embrião iniciam os seus respetivos ciclos celulares, sendo que se verificam, para este caso, quatro eventos mitóticos separados: cc3a, originando um embrião com cinco blastómeros, cc3b, culminando com seis blastómeros, cc3c, constituindo um embrião de sete blastómeros e, por fim, cc3d, a fase de finalização do último evento mitótico (associado ao último blastómero que se dividiu) que permite a obtenção de um embrião com oito blastómeros no total. Assim, a duração de cc3 pode ser calculada por esta diferença: t8-t4 (Campbell, 2015a).

A determinação da duração dos ciclos celulares já mostrou ser um critério de seleção embrionária muito importante na reflexão da qualidade embrionária (Herrero e colaboradores, 2013), já que ciclos muito curtos ou muito longos podem indicar, respetivamente, uma situação de qualidade embrionária ou de qualidade blastocística inaceitáveis. Considerando que os ciclos celulares têm um papel primordial e essencial na divisão do material genético da célula-mãe para as células-filhas resultantes, a sincronização e controlo destas divisões tem que ser o mais corretos possível, de modo a que toda a informação genética seja devidamente herdada pelas células descendentes. Assim, ciclos celulares demasiados curtos podem refletir uma péssima gestão da distribuição de DNA da célula primordial para as células-filhas, podendo indicar uma situação de anomalias cromossómicas (Aguilar *et al.*, 2014) que, em última instância, são prejudiciais para a qualidade embrionária.

Outro fator a ser considerado como um parâmetro morfocinético relativo constitui todo o conjunto de critérios associados com a sincronização de divisões mitóticas sucessivas. Assim, a sincronização (s), por si só, corresponde ao intervalo de tempo entre a iniciação de uma divisão celular e o início da divisão seguinte (Kirkegaard *et al.*, 2012).

A sincronização das divisões mitóticas que ocorrem ao longo do desenvolvimento embrionário revelaram ser pontos a testar e definir aquando da análise pelo *time-lapse*. Podem ser considerados três momentos de sincronização associados com os três ciclos celulares iniciais: s1, 2 e 3 (Kirkegaard *et al.*, 2012). Desta forma, o parâmetro s1, corresponde à duração da etapa inicial de apenas um blastómero, enquanto s2, constitui o tempo de sincronização das divisões mitóticas entre as etapas de dois a quatro blastómeros, podendo ser calculado pela diferença entre os timings referentes aos

parâmetros  $t_4$  e  $t_3$  ( $t_4-t_3$ ). Por fim,  $s_3$  é considerado um parâmetro morfocinético relativo que reflete a sincronização do padrão de clivagem apresentado pelo embrião entre as etapas de cinco a oito blastómeros, já que o seu cálculo pode ser efetuado pela diferença de tempos de ocorrência destes dois parâmetros morfocinéticos absolutos (figura 21). Tanto  $s_2$  como  $s_3$  revelaram, em estudos diferentes, contribuírem como fatores informativos e de valor significativo na previsão do potencial de implantação embrionária (Meseguer *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2014).

Outros parâmetros morfocinéticos relativos podem ser indicados, de acordo com a duração de etapas marcantes de desenvolvimento, incluindo a compactação (dcom), a blastulação (dB) e a expansão do blastocisto (dexp). Uma vez mais, os parâmetros morfocinéticos associados à duração ou intervalos de tempo entre etapas de desenvolvimento estão apresentados na tabela 5, a fim de sumarizar e detalhar a sua descrição e o seu significado.

**Tabela 5-** Parâmetros morfocinéticos relativos referentes à duração (em horas) de parâmetros associados à ocorrência dos ciclos celulares, sincronização de estado de clivagem e parâmetros morfocinéticos adicionais que, apesar de não abordados, podem constar na lista de critérios de avaliação com recurso à morfocinética. Adaptado de Meseguer, 2016.

<b>Parâmetros morfocinéticos (cont.)</b>	<b>Descrição dos parâmetros morfocinéticos</b>
ECC1 ou cc1	Primeiro ciclo celular ( $t_2-t_{PB2}$ )
ECC2 ou cc2	Segundo ciclo celular, incluindo a primeira e segunda fases do primeiro ciclo celular, cc2a e cc2b, respetivamente ( $t_4-t_2$ ). Este parâmetro pode ainda designar-se por P2.
ECC3 ou cc3	Terceiro ciclo celular, incluindo as quatro fases, cc3a, cc3b, cc3c e cc3d ( $t_8-t_4$ )
$s_2$	Parâmetro de sincronização das divisões mitóticas da fase de dois até quatro blastómeros ( $t_4-t_3$ ). Este parâmetro ainda pode designar-se por P3.
$s_3$	Sincronização do padrão de clivagem referente ao terceiro ciclo celular ( $t_8-t_5$ )
dcom	Duração da etapa de compactação (com- <i>compaction</i> ), determinada por $t_M-t_{SC}$ .
dB	Duração da fase de blastulação (B- <i>blastulation</i> ), determinada por $t_B-t_{SB}$
dexp	Duração da fase de expansão do blastocisto (exp- <i>expansion</i> ), determinada por $t_{HN}-t_B$

## 4.2. Interpretação da análise de dados obtidos com recurso ao *time-lapse*

Na interpretação de um estudo realizado com recurso à morfocinética, os modelos de seleção propostos poderão corresponder à determinação do seu potencial de previsão para implantação, desenvolvimento até blastocisto ou aneuploidia (Kirkegaard *et al.*, 2015) e, muitas vezes, mais do que uma destas variáveis.

A validação da aplicação de análise de um aparelho *time-lapse* na área da reprodução tem que ser alvo da realização de RCT (*Randomized Control Trials*) ou ensaios randomizados. Por definição, estes ensaios são realizados na área científica para avaliar a segurança e eficiência de um tratamento, medicamento ou técnica inovadoras encontradas ou criadas num determinado momento, de modo a que essa situação possa ser utilizada sob aprovação médica, ética e legal (Kabisch *et al.*, 2011). Nos ensaios clínicos médicos, os pacientes são escolhidos, ao acaso, para serem colocados no grupo controlo ou no grupo de teste, sempre com consentimento prévio e legal de todos os riscos e efeitos que possam advir do que está a ser testado. Todas as condições acordadas devem ser cumpridas especifica e devidamente, respeitando sempre o cumprimento do interesse dos participantes (Schulz *et al.*, 2010). Na área da reprodução assistida, o que se pretende é que o *time-lapse* e os critérios de seleção embrionários aplicados em modelos esquemáticos sejam comprovados como não invasivos e, ao mesmo tempo, de análise preditiva e significativa, de modo a que seja determinada a relevância da sua utilização e, acima de tudo e no contexto desta redação, da segurança para o material biológico incubado nestes sistemas.

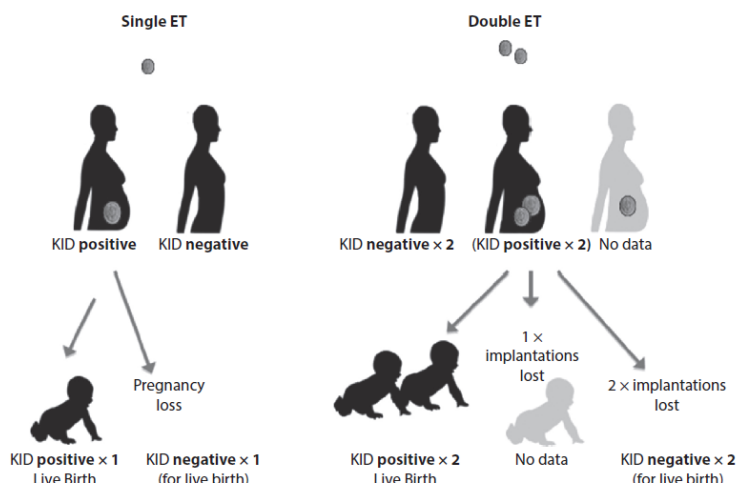
Segundo Armstrong *et al.* (2015) existem dois *designs* de ensaios randomizados que são válidos neste contexto, já que o *time-lapse* apresenta, para além da cultura contínua, a possibilidade de determinar a influência das condições de cultura em relação à estufa tradicional. Este constitui, assim, o primeiro ensaio proposto, o da avaliação das condições de cultura no desenvolvimento dos embriões. Por outro lado, as investigações podem seguir um destino diferente possibilitando a procura de algoritmos de seleção embrionária (os mais marcantes apresentam-se mencionados na secção seguinte). Para este último caso, os embriões são colocados, ao acaso, em estufas tipo tradicional ou sistemas de incubação tipo aparelho de *time-lapse*, de modo a que os autores possam determinar a existência de diferenças significativas influenciadas pelos métodos de incubação testados.

Na procura de parâmetros morfocinéticos para a análise de seleção baseada em parâmetros preditivos de implantação, o conhecimento da ocorrência de implantação (*Known Implantation Data* ou KID) torna-se uma ferramenta essencial para descobrir os parâmetros morfocinéticos mais representativos de embriões cuja implantação foi confirmada. Dentro deste grupo de dados, duas categorias podem ser reconhecidas: KID+, se a implantação dos embriões foi confirmada e positiva ou, por outro lado, KID-, no caso de, contrariamente à primeira situação, a implantação for negativa (Campbell, 2015a). O fundamento desta categorização de embriões com implantação conhecida pode ser baseada, especialmente, na cinética embrionária que é conhecida por influenciar o destino de implantação.

O aparelho EmbryoScope® apresenta a existência de uma ferramenta, designada por *KIDscore*, que permite atribuir este género de categorização embrionária com recurso ao próprio sistema. Assim, nas transferências de terceiro e quinto dias, respetivamente, os embriões KID apresentam classificações distintas, sendo que, no caso do terceiro dia de transferência, é atribuída uma classificação de 1 a 5, de acordo com os limites temporais de parâmetros morfocinéticos desde o desaparecimento dos pronúcleos até ao estado de oito blastómeros e consoante o potencial de implantação (sendo 5 a categoria que dita uma maior possibilidade de ocorrência deste processo, Vitrolife, 2015a e Montag, 2015). Relativamente aos tempos de ocorrência ideias nesta parte do desenvolvimento para um maior potencial de implantação, o estado de dois blastómeros deveria ocorrer entre 21 a 31 horas após inseminação, o estado de três blastómeros a 34 a 35 horas após inseminação, o estado de quatro blastómeros entre 37 a 39 horas após inseminação, o estado de cinco blastómeros entre 45 a 55 horas após inseminação e, por fim, para o estado de oito blastómeros considera-se o maior potencial de dados de embriões com implantação conhecida entre as 55 a 56 horas após inseminação (Campbell, 2015). Por sua vez, se a cultura embrionária se prolongar e a transferência for efetuada ao quinto dia, a classificação atribuída passa para uma escala de 1 a 9,9 (Vitrolife, 2015a e Montag, 2015), sendo então que os parâmetros considerados incluem os associados às etapas de blastocisto. Assim, com a finalidade de atingir taxas de implantação superiores, o tempo decorrido entre a inseminação e o momento de começo da blastulação deverá centrar-se entre os 92 a 94 horas após inseminação na expectativa que o desenvolvimento total do blastocisto ocorra entre as 102 e 104 horas após inseminação (Campbell, 2015). Todos os tempos de ocorrência referidos para estas fases foram inferidos a partir de dados morfocinéticos com uma distribuição normal, considerando apenas os timings verificados para embriões com implantação positiva determinada e correspondentes a uma distribuição central. A razão para esta escolha centra-se no facto de que, numa curva de distribuição temporal de

dados relativos a todo o set de embriões conjugado com os de implantação conhecida, devem ser considerados, preferencialmente, tempos relativos a intervalos próximos da média para evitar os intervalos de risco (Montag, 2015).

A figura (figura 22) seguinte permite esclarecer a atribuição da categoria dos embriões KID.



**Figura 22-** Esquema de atribuição da classificação de embriões com base no *outcome* de implantação (KID). KID representa *Known Implantation Data*, que tanto pode obter uma classificação positiva (*Positive*) como negativa (*Negative*). Assim, na situação de confirmação de uma gravidez, um nascimento vivo (*live birth*) reflete uma atribuição KID+ aquele embrião, contudo, na verificação de um aborto (*Pregnancy loss*), a categorização passa de positiva para negativa. O número de embriões transferidos, quer seja por transferência simples (*Single ET*) quer seja por transferência dupla (*Double ET*), deverá ser contabilizado para a verificação da proporção de embriões KID + e KID-. Outras situações divergentes podem, igualmente, ser contabilizadas, na ausência de resultados assertivos (*No data*, por exemplo, em situações de falha de implantação, *implantation lost*). Adaptado de Campbell, 2015a.

Assim, se houver a confirmação que da transferência embrionária (simples ou dupla) ocorreu implantação é atribuída a classificação de KID+. Contrariamente, a classificação KID- é válida quando não ocorre implantação ou em situações em que existe aborto espontâneo (mesmo com uma confirmação positiva inicial). No caso do cálculo da proporção de embriões KID, o número de embriões transferidos, um ou dois, deverá ser contabilizado para uma contagem mais segura e confiável. A confirmação da implantação é verificada pela deteção do número de batimentos cardíacos singulares através de ecografia intrauterina, que deverá corresponder ao número de embriões transferidos, e a subsequente gravidez através de análises clínicas que detetam a presença da hormona  $\beta$ -hCG (*human Chorionic Gonadotropin* ou gonadotrofina coriónica humana) (Liu *et al.*, 2015b), catorze dias após o procedimento (Rubio *et al.*, 2014).

Este tipo de categorização pode ser utilizado para estudos definidos pela procura de fatores que influenciem as taxas de implantação, que podem ser calculadas pela razão



entre o número de batimentos detetados e o número de embriões transferidos (Rubio *et al.*, 2014). Consequentemente, este conhecimento pode levar ao teste e confirmação de diferenças significativas de parâmetros morfocinéticos nos grupos de embriões KID+ e KID-, já que, no estudo de Liu *et al.*, 2015, estas diferenças foram encontradas e revelam um menor potencial de desenvolvimento (ou seja, limites temporais dos eventos celulares fora dos aceitáveis) em embriões cuja implantação não foi possível (Liu *et al.*, 2015).

Os testes estatísticos realizados no âmbito de estudos científicos são preciosos para o tratamento de resultados e para a confirmação da significância dos dados obtidos. No âmbito da aplicação da morfocinética na avaliação e seleção embrionária, os testes de regressão logística constituem testes estatísticos importantes que permitem obter valores de *Odd Ratios* (OR), muito utilizados em investigações associadas à influência dos parâmetros morfocinéticos, quer a nível do desenvolvimento quer a nível de implantação ou gravidez. Normalmente, estes testes são utilizados, neste contexto em específico, na inclusão de fatores influenciadores dos parâmetros morfocinéticos (Kieslinger *et al.*, 2016) e na determinação da sua maior influência em relação a outros igualmente representativos. Assim, com a finalidade de determinar o maior potencial preditivo de um fator, os valores de OR representam a maior ou menor probabilidade do poder preditivo e significativo de certos parâmetros morfocinéticos considerados.

Outro assunto muito importante a ser abordado na interpretação de estudos referentes à monitorização do *time-lapse* é a distinção entre estudo prospetivo e retrospectivo. Assim, um estudo retrospectivo corresponde a um tipo de estudo em que o seu *design* consiste na aquisição, pesquisa e incorporação, num determinado estudo, de informação proveniente de estudos anteriores do mesmo âmbito, considerando, assim, um conjunto de dados que foram analisados por outros autores nas suas publicações prévias. Contrariamente, um estudo prospetivo apresenta a vantagem de dar liberdade aos seus autores para selecionar novos dados e obter resultados inovadores e promissores, de modo que o seu tratamento é efetuado no momento. Uma das limitações do estudo retrospectivo é o facto de não considerarem na sua análise as variações intrínsecas ao conjunto de pacientes que testam ou da diferença das condições de cultura no qual os embriões são incubados (Kovacs, 2014). De uma maneira geral, vastos são os estudos que englobam estes dois tipos de *design* na área da reprodução, contudo, o maior fator a ter em conta é simplesmente o objetivo do estudo que se quer desenvolver e, consoante este, qual o modo de trabalho mais vantajoso e aconselhável.

### 4.3. *Timings* de ocorrência de etapas de desenvolvimento embrionário para previsão do desenvolvimento e implantação

A ocorrência temporal de eventos celulares importantes no desenvolvimento do embrião e a sua competência para clivar segundo um padrão normal correlaciona-se com a morfocinética, o que a pode tornar uma aplicação muito viável e confiável na seleção embrionária na última etapa de um tratamento de infertilidade (Meseguer *et al.*, 2011). Consequentemente, todos os eventos, desde o aparecimento dos PN e ocorrência dos ciclos celulares até aos primeiros passos para a formação de um blastocisto, parecem estar temporalmente traçados na escala de desenvolvimento do embrião (Rubio *et al* 2012).

#### 4.3.1. Estudo de Payne e colaboradores, 1997

Desde Payne *et al.* (1997), vários foram os autores que quiseram aprofundar o conjunto de conhecimentos sobre o embrião humano e a seu crescimento com base em informação fornecida pelos *frames* captados em curtos intervalos de tempo. Este modo de visualização permitiu ver o que até à data não era claro, visto que rápidas mudanças podem alterar completamente o aspeto morfológico do embrião. Este estudo pioneiro, em humanos, teve como objetivo principal estudar os processos iniciais após o contacto do espermatozoide com o oócito. Neste mesmo estudo, os autores conseguiram observar vários fenómenos importantes, incluindo a aproximação dos pronúcleos e a sua fusão ou singamia.

Adicionalmente, com o seu sistema *time-lapse* rudimentar, Payne e colaboradores observaram que, em média, a extrusão do segundo glóbulo polar ocorria a 2 horas e 39 minutos após inseminação e que a maioria dos embriões no mesmo estudo apresentava a formação de ambos os pronúcleos a 5 horas após inseminação.

As conclusões retiradas pelos autores apresentam resultados emocionantes e impulsionadores visto que o aparelho utilizado na altura não apresentava a tecnologia inerente aos dias de hoje. Daí ter sido este o estudo pioneiro e mais marcante do começo da utilização da análise tipo *time-lapse* em embriologia humana.

#### 4.3.2. Estudo de Lemmen e colaboradores, 2008

Primeiramente, em 2008, Lemmen e colaboradores estabeleceram um estudo sólido no mundo da aplicação da morfocinética na determinação e seleção embrionária, constituindo uma investigação de renome em relação à definição de marcadores de desenvolvimento embrionário. Usufruindo de um sistema *time-lapse* integrado de microscópio<sup>11</sup> com câmara adjacente (controlada por um *software* externo), a captação de imagem ocorreu a cada cinco minutos nos primeiros dois dias de monitorização, para um total de 102 óocitos fertilizados (com dois pronúcleos) resultantes de ciclos de FIV (63) e ICSI (39). Os parâmetros morfocinéticos considerados consistiram, assim, no desaparecimento de pronúcleos após fertilização e nos eventos subsequentes da primeira e segunda divisões mitóticas, incluindo os momentos de desaparecimento nuclear para preparação da divisão e reaparecimento dos mesmos na formação das células-filhas. Para embriões de segundo dia, a primeira conclusão do estudo mostrou que o desaparecimento pronuclear ocorreu temporalmente mais cedo em embriões de quatro células relativamente a estados de zigoto ( $P < 0,001$ ).

Para além de mostrarem que o número de células foi um fator determinante para o *timing* perfeito do desaparecimento pronuclear, a mesma conclusão foi admitida para a primeira divisão mitótica, sendo que, ao segundo dia, zigotos com um número apropriado de blastómeros (mais de cinco) começaram a divisão mais cedo relativamente a embriões que não cumpriram este requisito ( $P < 0,05$ ). Desta forma, foi sugerido que embriões com um número correto de células ao segundo dia de cultura apresentassem um momento de desaparecimento de pronúcleos a  $24,3 \pm 2,5$  horas após inseminação com o começo da primeira divisão mitótica a  $26,6 \pm 2,3$  horas após inseminação.

O aparecimento nuclear, resultante da formação das células-filhas resultantes da primeira divisão mitótica, e o desaparecimento nuclear, para a iniciação da seguinte ocorreram, respetivamente, a  $28,2 \pm 1,4$  horas e  $36,4 \pm 2,2$  horas após inseminação. Neste mesmo estudo, verificou-se uma relação entre a ocorrência de gravidez e a rapidez com que se verificaram os eventos celulares, já que a sincronização do aparecimento nuclear, após a primeira divisão, ocorreu mais precocemente em embriões implantados ( $P < 0,05$ ).

Em suma, a conclusão principal a ser retirada dos resultados obtidos inclui a ideia de que, tanto o número de blastómeros em cada fase de desenvolvimento precoce (duas primeiras divisões) como o momento em que cada fenómeno de iniciação de ciclos

---

<sup>11</sup> Microscópio usado no estudo Nikon Diaphot 300

celulares ocorre pode ser preditivo da taxa de implantação e, conseqüentemente, das taxas de gravidez resultantes de embriões com maior qualidade.

#### 4.3.3. Estudo de Wong e colaboradores, 2010

Dois anos mais tarde surge o estudo de Wong *et al.* (2010) que estabeleceu como objetivos primordiais os seguintes termos: compreender a relação entre a expressão genética, *a priori* da ativação do genoma do embrião, e as etapas de desenvolvimento precoce até quatro células com a hipótese de progressão para o estado de blastocisto.

Os resultados do seu estudo permitiram dar ênfase às primeiras etapas do desenvolvimento embrionário, desde o primeiro ciclo celular até à etapa de quatro blastómeros. Assim, Wong e colaboradores definiram como parâmetros morfocinéticos principais para o seu estudo a duração da primeira citocinese, intervalo de tempo entre o fim e o início da primeira e segunda divisões mitóticas, respetivamente e, por fim, a duração entre a segunda e terceira divisões mitóticas (num total de 100 embriões criopreservados).

Com base nestes parâmetros, os autores definiram que o maior potencial de um embrião para alcançar o estado de blastocisto é atingido quando o primeiro, segundo e terceiro parâmetros correspondem, respetivamente, a 0 a 33 minutos, 0,8 a 14,3 horas e 0 a 5,8 horas, apresentando os blastocistos de melhor qualidade uma maior aproximação (*cluster*) dos valores temporais em relação a estes parâmetros mencionados.

Adicionalmente, a análise do padrão de expressão de genes associados ao controlo do processo da citocinese revelou que embriões cuja citocinese é anormal apresentam um padrão de expressão genética difuso e com menor intensidade de expressão, revelando, juntamente com a descoberta anterior, que o destino dos embriões até blastocisto está especificamente determinado e traçado temporalmente, já que pode, também, ser influenciado pelo padrão de expressão de genes associados ao desenvolvimento.

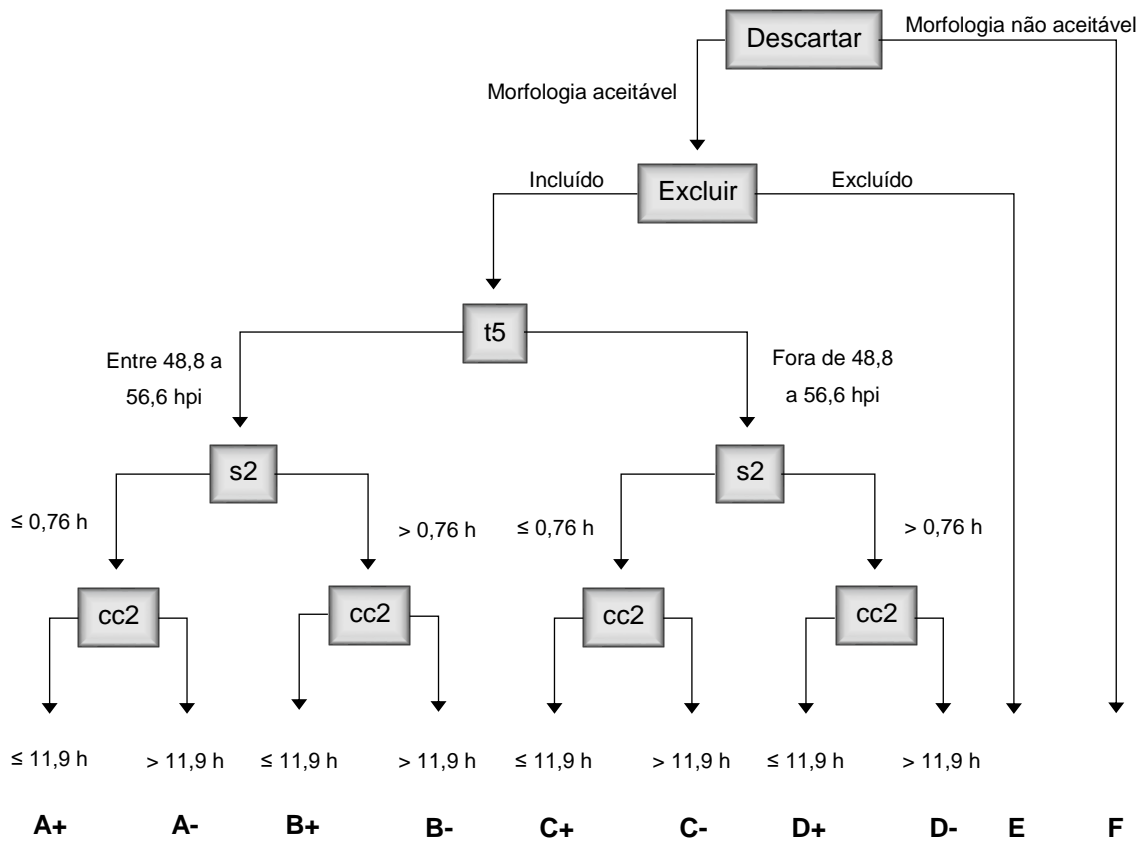
#### 4.3.4. Estudo de Meseguer e colaboradores, 2011

Seguiu-se um dos mais emblemáticos e referenciados estudos no que diz respeito ao estabelecimento de modelos de seleção de embriões para prever o potencial de implantação dos mesmos. Neste mesmo estudo, Meseguer e colaboradores (2011) focaram-se nos parâmetros morfocinéticos t2, t3, t4, t5, s2 e cc2, cujos timings e durações foram obtidos pela análise de 247 embriões obtidos pela técnica de ICSI (61 implantados), com recurso ao *time-lapse*.

Para os três parâmetros primeiramente mencionados foram propostos os limites aceitáveis para o qual se obteve um maior potencial de implantação, incluindo 24,3 a 27,9 horas para t2, 35,4 a 40,3 horas para t3, 48,8 a 56,6 horas para t5 (referente a horas após inseminação). Adicionalmente, foi proposta uma duração menor ou igual a 11,9 horas para o segundo ciclo celular (cc2) e menor ou igual a 0,76 horas para s2.

No entanto, o modelo de seleção embrionária para evidenciar o maior potencial de implantação inclui, de todos os parâmetros mencionados, apenas os que apresentaram valores de OR superiores, calculados com o recurso a testes de regressão logística. Consequentemente, t5, cc2 e s2 mostraram ser os parâmetros morfocinéticos mais relevantes e significativos para serem incorporados na criação deste modelo. A razão pela qual se deve escolher os parâmetros morfocinéticos mais significativos centra-se no facto de estes terem que ser o mais confiável possível, de modo a constituir uma base sólida de previsão e de informação pertinente (Milewski *et al.*, 2015).

A figura 23 demonstra, assim, o esquema do modelo proposto por estes autores, segundo uma classificação hierárquica composta por dez categorias (A+ a F) com base nos parâmetros classificados pelos autores como apresentando diferenças significativas entre embriões com implantação confirmada *versus* embriões não implantados.



**Figura 23-** Modelo hierárquico, proposto por Meseguer *et al.* (2011), composto por dez categorias principais de modo a classificar os embriões de acordo com o seu potencial de implantação. O parâmetro morfocinético t5 corresponde ao tempo ocorrido desde a inseminação até à finalização do estado embrionário de cinco blastómeros e, por sua vez, s2 e cc2 correspondem ao tempo de sincronização das divisões mitóticas entre o estado de duas e de quatro blastómeros e a duração do segundo ciclo celular, respetivamente. Segundo este modelo, um embrião é considerado A+ se, primeiramente, tiver morfologia ótima e ausência de parâmetros de exclusão (como blastómeros desiguais no estado de duas células, clivagem direta e multinucleação no estado de quatro células). Caso respeite esses primeiros critérios, a primeira etapa da classificação corresponde a um t5 dentro dos limites considerados ótimos (entre 48,8 e 56,5 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Caso cumpra este requisito é verificado, de seguida, se s2 se inclui nos *timings* perfeitos (duração inferior a 0,76 horas (h)). Por sua vez, a última etapa de classificação é a verificação de que cc2 tem uma duração aceitável (inferior a 11,9 horas). Contrariamente, uma classificação D- representa um embrião com morfologia aceitável e sem parâmetros de exclusão, embora t5, s2 e cc2 estejam fora dos limites aceitáveis. Os embriões E são descartados devido a conterem elementos que permitem a sua exclusão e, por fim, embriões com morfologia não adequada são automática e imediatamente classificados na categoria F. Adaptado de Mesguer *et al.*, 2011.

Usufruindo do modelo apresentado, Liu e colaboradores (2015) compararam embriões com implantação conhecida (KID + e KID -) concluindo que, apesar de terem sido verificadas diferenças significativas entre os parâmetros morfocinéticos destes dois grupos em dois centros de tratamento de infertilidade diferentes (de KID + em relação a KID-), a aplicação do sistema de classificação para ambas as clínicas não revelou um aumento significativo da taxa de implantação para embriões com a qualidade máxima

de hierarquização (A+), nem da capacidade preditiva deste sistema, quando aplicado para ambos os casos ( $P > 0,05$ ). Consequentemente, os métodos de seleção e avaliação de embriões e blastocistos devem ser considerados e bem aplicados, tendo em conta que existe um *set* de embriões de clínicas diferentes. Os mesmos autores afirmam, desta forma, que muitos são os fatores que influenciam a cinética embrionária, incluindo fatores intrínsecos aos pacientes de cada centro.

Assim sendo, a aplicação do mesmo método de avaliação para duas clínicas diferentes, com protocolos e modos de cultura variáveis, mostrou poder constituir um fator de risco na tomada de uma decisão definitiva acerca do poder preditivo de um determinado parâmetro morfocinético.

Entretanto, os autores Basile *et al.* (2015) atualizaram este algoritmo de classificação embrionária, considerando a inclusão do parâmetro t3 e a exclusão de s2, estudo abordado mais à frente nesta secção), comprovando a utilidade e significância estatística para justificar esta modificação.

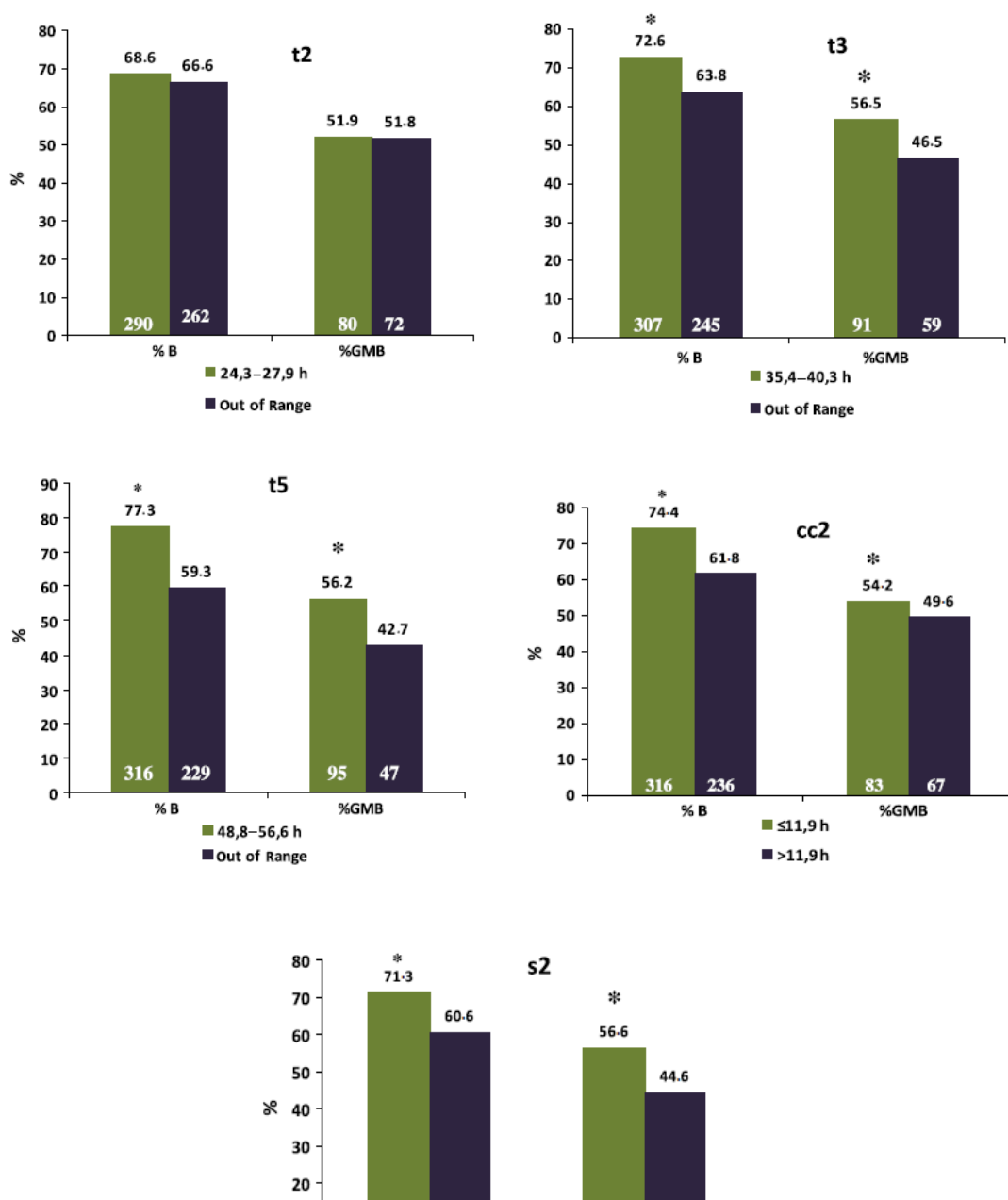
#### 4.3.5. Estudo de Cruz e colaboradores, 2012

Como mencionado, a previsão feita com recurso à aplicação da morfocinética para destinos clínicos dos embriões incubados não se centra apenas na potencialidade de implantação, mas também pode ser considerada para um parâmetro inerente a este destino, o de desenvolvimento. Consequentemente, o estudo descrito nesta secção centrou-se, especificamente, no poder discriminativo e preditivo do *time-lapse* e do uso da morfocinética para ditar o destino de desenvolvimento de embriões em cultura.

Embriões obtidos com a técnica de ICSI (274 embriões transferidos) foram monitorizados pelo EmbryoScope® (6,0% de CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> e 37,4 °C), de modo a determinar parâmetros morfocinéticos absolutos, desde tPNf a tM e relativos, incluindo cc2 e s2.

Os parâmetros morfocinéticos t2, t3, t4, tM, cc2 e s2 revelaram diferenças significativas nos tempos médios de ocorrência entre embriões que atingiram e não atingiram o estado de blastocisto (respetivamente para os dois grupos: t2, 26,8 ± 0,2 hpi e 27,9 ± 0,5,  $P < 0,001$ ; t3, 39,2 ± 0,4 e 40,8 ± 0,8,  $P < 0,001$ ; t4, 39,9 ± 0,4 e 42,4 ± 0,9,  $P < 0,001$ ; tM, 90,6 ± 0,6 e 93,7 ± 1,6,  $P < 0,001$ ; cc2, 12,4 ± 0,3 e 13,0 ± 0,6,  $P = 0,006$ ; e, por fim, s2, 0,6 ± 0,2 e 1,0 ± 0,5,  $P = 0,031$ ), relevando um padrão de atraso, tanto em relação aos tempos de ocorrência e como à duração de eventos celulares em embriões que não completaram o desenvolvimento.

Adicionalmente, uma análise feita considerando como variável principal a qualidade blastocística considerada no estudo revelou intervalos de tempo ótimos e significativamente relevantes associados aos mesmos parâmetros morfocinéticos: t2 entre 24,3 e 27,9 horas após inseminação; t3 entre 35,4 e 40,3 horas após inseminação; t5 entre 48,8 e 56,6; duração para s2 inferior a 0,2 e para cc2 inferior ou igual a 11,9 horas (como ilustrado na figura 24).



**Figura 24-** Representação dos limites temporais ótimos para os parâmetros apresentados t2, t3, t5, cc2 e s2, comparando categorais de blastocistos com qualidade distinta (B- *Blastocyst* ou blastocisto, GMB- *Good Morphology Blastocyst* ou blastocistos de alta qualidade). Os números apresentados em cima das colunas correspondem às percentagens de blastocistos enblogados em cada categoria e os números contidos nas colunas correspondem ao número total de blastocistos nas mesmas. Os asteriscos representam a verificação de diferenças significativas entre os diferentes grupos. Adaptado de Cruz *et al.* (2012).



Embora o limite do parâmetro  $t_2$  não ter apresentado diferenças significativas entre os dois grupos de blastocistos com categorias de qualidade distintas, o limite de tempo proposto pelos presentes autores já tinha sido documentado, por Meseguer *et al.* (2011), como preditivo para o potencial de implantação dos embriões incubados no EmbryoScope®.

Para além do estabelecimento de uma relação entre o desenvolvimento e os parâmetros morfocinéticos obtidos, o tamanho dos blastómeros foi um critério que influenciou significativamente a quantidade de embriões obtidos de boa qualidade, de modo que, blastocistos de melhor qualidade apresentavam um tamanho mais semelhante entre as suas células embrionárias.

Desta forma, os parâmetros morfocinéticos precoces revelaram ser descodificadores do destino do embrião e da qualidade que o mesmo terá na evolução até blastocisto e o *time-lapse* revelou, mais uma vez, o seu valor como instrumento de monitorização.

#### 4.3.6. Estudo de Rubio e colaboradores, 2012

Como verificado anteriormente neste capítulo, não só os parâmetros morfocinéticos referentes a cada etapa de desenvolvimento do embrião são relevantes para a análise da qualidade embrionária. Assim, os ciclos celulares parecem demonstrar, igualmente, se um determinado embrião tem capacidade para chegar ao estado de blastocisto, já que ciclos celulares cuja duração calculada é menor que a de um ciclo celular padrão pode induzir a ideia de que aquele embrião pode não ser incluído na categoria de alta qualidade.

Tendo em conta que ciclos celulares curtos podem refletir uma divisão mitótica deficiente, Rubio e colaboradores (2012) investigaram sobre o impacto da clivagem direta na previsão de implantação. Estipulado está que a clivagem direta corresponde, geralmente, a uma situação negativa de clivagem visto que corresponde à passagem direta e rápida de dois para três blastómeros, com uma duração de ocorrência inferior ou igual a cinco horas. Comparando os tempos de clivagem de embriões com presença e ausência de clivagem direta foi possível concluir que estes parâmetros apareciam alterados, atrasados ou avançados, nos embriões que passaram por este processo em relação aos embriões com clivagem normal.

Constatou-se, igualmente, que a taxa de clivagem direta influenciou a taxa de implantação, já que embriões que implantaram apresentaram uma menor percentagem

de ocorrência deste fenómeno celular (1,2 %) comparativamente a embriões cuja implantação falhou (20,2%).

Assim, para além destes autores concluírem que a existência de clivagem direta deve ser um fator a ter em conta na prática clínica de avaliação embrionária, os mesmos demonstraram a utilidade do *time-lapse* para a certificação da ocorrência deste fenómeno e da sua duração, visto que o tempo em que ocorre corresponde à parte prejudicativa do mesmo.

#### 4.3.7. Estudo de Hlinka e colaboradores, 2012

O estudo redigido por estes autores permitiu, através do Primo Vision™ (5% de CO<sub>2</sub> e 37°C), obter o tempo de duração aceitável para etapas distintas ao longo do desenvolvimento embrionário que permitisse demonstrar o desenvolvimento de um embrião de alta qualidade que, aquando da sua transferência, fosse capaz de implantar no útero.

A nomenclatura usada para definir os parâmetros morfocinéticos, neste estudo em particular, consistiu na distinção entre “*tempos de repouso*”, definidos com períodos de ocorrência da etapa de interfase dos ciclos celulares e “*períodos de atividade mitótica*”, definidos pela ocorrência da divisão celular dos blastómeros correspondentes. Assim, para a segunda interfase (i2, associada à ocorrência do segundo ciclo celular), que traduz a duração da etapa de dois blastómeros, a duração correspondente foi de  $11,0 \pm 1$  hora. Por sua vez, a terceira interfase (i3, associada à ocorrência do terceiro ciclo celular) obteve uma duração ótima de  $15 \pm 1$  hora e, por fim, a quarta interfase (i4, associada à ocorrência do quarto ciclo celular) teve uma duração proposta de  $23 \pm 1$  hora.

Igualmente, para as etapas de clivagem, foram propostas as durações ótimas de  $15,5 \pm 5$  minutos,  $40 \pm 10$  minutos e  $55 \pm 15$  minutos para os parâmetros c2 (ou segundo evento de clivagem, correspondendo ao tempo decorrido entre a etapa de três para quatro blastómeros), c3 (ou terceiro evento de clivagem, correspondendo ao tempo decorrido entre as etapas de cinco para oito blastómeros) e c4 (ou quarto evento de clivagem, correspondendo ao tempo decorrido entre as etapas celulares de nove e dezasseis blastómeros), respetivamente.

É de salientar, neste estudo em particular, o uso de nomenclatura distinta por parte dos autores, visto que, a título de exemplo, o parâmetro designado aqui como i2 pode ser definido, em outros estudos, como o parâmetro cc2 visto que ambos se referem à mesma etapa, a duração do estado de dois blastómeros (Kaser e Racowsky, 2014). Por

sua vez, c2 e c3, utilizados no presente estudo, podem referir-se, respetivamente, aos parâmetros s2 e s3, já que demonstram o mesmo significado descrito anteriormente para estes últimos parâmetros mencionados (Kaser e Racowsky, 2014). Assim, as diferentes terminologias usadas para definir o mesmo parâmetro devem ser analisadas com cuidado, de modo a cometer erros de linguagem ou divulgação.

#### 4.3.8. Estudo de Dal Canto e colaboradores, 2012

Outra investigação que marcou fortemente o estudo da morfocinética e do *time-lapse* no mundo da reprodução assistida foi o de Dal Canto e colaboradores (2012). Iguamente a outras investigações da área, os parâmetros considerados neste estudo constituem toda a cinética de desenvolvimento (t2 a t8) para determinar se os mesmos ajudam podem prever a progressão do estado de blastocisto e, por fim, a sua competência para implantar no útero.

A primeira conclusão apresentada pelos autores consistiu no apelo da influência da técnica, FIV ou ICSI, na cinética embrionária. Ao comparar o padrão de desenvolvimento em embriões criados por ICSI e FIV (num total de 459 embriões analisados), os resultados revelaram, especialmente, que t2 e t3 e o intervalo de tempo entre estes parâmetros apresentavam diferenças significativas entre as duas técnicas, sendo que estes parâmetros ocorreram mais tardiamente no caso de FIV. A explicação possível e clara para a obtenção destes resultados, e para o pequeno atraso verificado no caso de FIV, centra-se nos momentos iniciais de interação do espermatozoide com o oócito, já que, na técnica referida é contabilizado a duração da penetração na sua membrana plasmática. Contrariamente, a técnica de ICSI não inclui estes momentos, apresentando, assim, embriões que iniciam o desenvolvimento em *timings* mais precoces.

Adicionalmente, t7 e t8 foram considerados parâmetros morfocinéticos importantes na distinção entre embriões que seguiram e não seguiram até ao estado de blastocisto (sendo que o primeiro e segundo grupos contaram, respetivamente, com a ocorrência do estado de sete células a  $56.5 \pm 8.1$  e  $58,8 \pm 10,4$  horas após inseminação,  $P$  igual a 0,03, e ao estado de oito células a  $61.0 \pm 9.4$  e  $65,2 \pm 13,0$  horas após inseminação,  $P$  igual a 0,0008). Relativamente ao tempo decorrido até ao estado de oito blastómeros, para embriões implantados, foram obtidos os tempos de  $54,9 \pm 5,2$  horas após inseminação, sendo que os que não chegaram a implantar apresentaram um tempo para t8 estatisticamente mais tardio ( $58,0 \pm 7,2$  horas após inseminação,  $P$  igual a 0,035).

No que diz respeito ao estado de expansão do blastocisto, os autores determinaram, igualmente, que parece existir um padrão temporal mais tardio para blastocistos que não expandem corretamente, apresentando estes uma ocorrência mais tardia de todos os parâmetros morfocinético de t2 a t8.

Consequentemente, estes resultados refletem a importância de análise de todos estes parâmetros que se associam ao padrão dos ciclos celulares primordiais, revelando estes autores que estes momentos podem prever como será o desenvolvimento de zigoto a embrião e, em última instância, a blastocisto.

#### 4.3.9. Estudo de Chamayou e colaboradores, 2012

O estudo publicado de Chamayou *et al.* (2012) apresenta-se, assim como os mencionados, como uma ferramenta de estudo com resultados promissores na temática geral apresentada nesta secção. A ideia principal deste estudo centrou-se na procura dos intervalos de tempo, e não de tempos estáticos, de parâmetros morfocinéticos relativos ao desenvolvimento embrionário, de modo a criar intervalos ótimos de cada parâmetro, tanto para previsão do potencial de desenvolvimento como do de implantação. Assim, para previsão da competência de desenvolvimento *in vitro* do embrião até blastocisto, os parâmetros selecionados para este feito, bem como os intervalos temporais ótimos de ocorrência, aparecem representados na tabela 6.

**Tabela 6-** Parâmetros morfocinéticos e respetivos intervalos de ocorrência, em horas após inseminação (hpi representativo de *hours post-insemination*). tF corresponde ao tempo referente ao primeiro momento de aparecimento dos pronúcleos, enquanto tC corresponde ao último momento de observação de ambas as estruturas (sendo que a sua diferença corresponde à duração do processo de singamia). Os parâmetros morfocinéticos t1 a t8 demonstram os *timings* de ocorrência desde a inseminação até ao estabelecimento de todas estas fases de clivagem e s3 é considerado um parâmetro relativo indicativo da sincronização dos estados de clivagem de cinco a oito blastómeros. Nesta tabela, o tempo médio dos intervalos correspondentes é, igualmente, apresentado, em horas após inseminação. Adaptado de Chamayou *et al.*, 2012.

Parâmetros morfocinéticos	Intervalos de tempo de ocorrência (hpi)		Média dos intervalos de ocorrência (hpi)
	Mínimo	Máximo	
tC- tF0	7,7	22,9	15,1
t1	18,4	30,9	24,1
t2	21,4	34,8	26,9
t4	33,1	57,2	40,3
t7	46,1	82,5	57,4
t8	46,4	97,8	61,0
s3	0,7	30,8	8,0

Adicionalmente, apenas um parâmetro foi comprovado como útil para a previsão de implantação para blastocistos de quinto dia: cc3. Os valores de ocorrência aceitáveis e propostos para este parâmetro correspondem a limites mínimo e máximo de 9,7 a 21,0 horas após inseminação, respetivamente (um limite médio de 14,4 horas após inseminação).

Para praticamente todos os parâmetros mencionados, incluindo para a previsão de desenvolvimento e implantação, verifica-se que os intervalos de tempo relativos a embriões cujo desenvolvimento é anormal apresentam-se com um maior nível de diversificação e, comparando com padrões normalizados, ocorrem sob intervalos discrepantes.

#### 4.3.10. Estudo de Herrero e colaboradores, 2013

Na continuação da temática desta secção, de forma a determinar todos os *timings* de desenvolvimento correspondentes a parâmetros morfocinéticos absolutos e relativos, Herrero e colaboradores (2013) dividiram, no seu estudo retrospectivo, embriões gerados por ICSI em quatro grupos diferentes relativos a três grandes momentos de desenvolvimento: fase de clivagem inicial, embriões no estado de oito células e momento de blastulação e implantação.

Quase 10 000 embriões foram analisados pelo Embryoscope® e a sua análise evidenciou uma clara tendência dos parâmetros morfocinéticos associados a determinadas partes do desenvolvimento para serem significativos e concordantes com essas mesmas. Sendo assim, alguns dos resultados evidenciam que estados precoces de desenvolvimento (t2, t3 e t5) apenas foram significativos entre os estados de clivagem comparado com o estado de oito células (26,4 e 25,4 horas após ICSI para t2; 38,6 e 37,0 para t3 e 53,5 e 51,5 para t5, no grupo de clivagem e de embriões de oito células, respetivamente,  $P < 0,001$ ). Registaram-se diferenças significativas entre o estado de oito células e o de blastocisto, nos parâmetros t5 e t8 e, igualmente, em cc3 (respetivamente, para t5 51,5 e 52,4,  $P < 0,001$ ; para t8, 58,7 e 59,3,  $P < 0,03$ ; e, por fim, para cc3 14,3 e 15,0,  $P < 0,0001$ ). Por sua vez, tM e tB mostraram ser potenciais parâmetros para previsão da implantação, já que se verificaram diferenças significativas dos mesmos aquando da comparação entre o conjunto de blastocistos testados e embriões implantados e os que, contrariamente, não finalizaram esta tarefa (respetivamente, tM 89,3 e 85,1,  $P < 0,041$ , e tB 104,1 e 102,0,  $P < 0,001$ ).

Estes resultados evidenciam conclusões claras e precisas, ilustrando a existência de uma relação entre cada etapa de desenvolvimento com o seu poder preditivo para

a mesma fase, de forma que os parâmetros mais precoces são os que permitem prever o potencial inicial de desenvolvimento e, considerando esta linha de pensamento, torna-se claro que parâmetros morfocinéticos mais tardios se associem com a previsão de uma fase de desenvolvimento igualmente mais tardia.

#### 4.3.11. Estudo de Desai e colaboradores, 2014

Desai e colaboradores (2014) contribuíram, igualmente, para a análise do desenvolvimento embrionário com base na morfocinética, estabelecendo e realizando um estudo randomizado retrospectivo no qual foi importante determinar quais os parâmetros importantes para previsão do potencial de desenvolvimento de um embrião e se o estado de implantação (implantado ou não implantando) era influenciado pelo padrão e tempo de ocorrência de eventos celulares.

Usfruindo do sistema de *time-lapse* Embryoscope<sup>®</sup>, os autores conseguiram observar cada passo de progressão embrionária, desde o processo de singamia à expansão do blastocisto. A determinação dos parâmetros morfocinéticos que influenciam a implantação embrionária tem como objetivo final conhecer aqueles que, eventualmente, podem oferecer uma melhor previsão para a eleição de apenas um embrião. Assim, considerando os parâmetros que diferiram estatisticamente é possível compará-los em blastocistos de quinto dia com implantação confirmada de blastocistos que, contrariamente, não implantaram. Consequentemente, ao comparar alguns parâmetros de desenvolvimento, incluindo tPNf, t2, t3, t5, t8, s1 e t5-t2, Desai e colaboradores apresentaram a verificação de variações, quer atrasos quer avanços, nos *timings* de ocorrência associados a estes mesmos parâmetros.

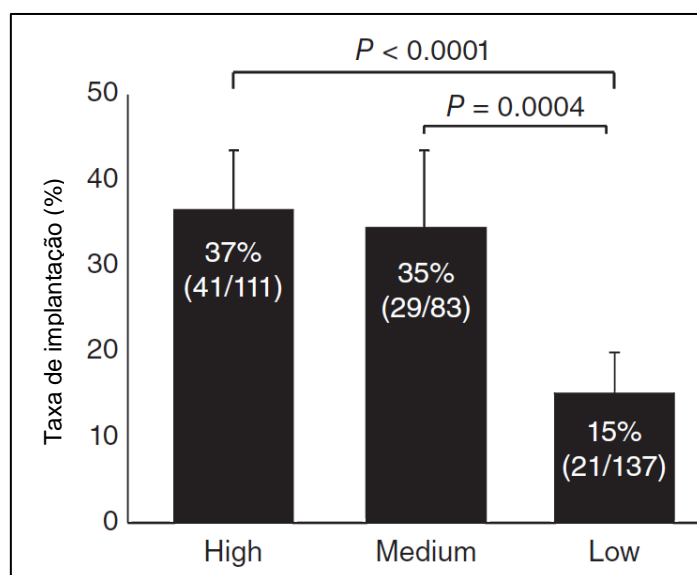
Neste mesmo estudo efetuou-se, adicionalmente, um confronto em termos dos *timings* dos eventos morfocinéticos entre blastocistos de quinto dia de alta qualidade, com transferência confirmada, e blastocistos descartados. Apesar de eventos celulares precoces, incluindo t2, t4 e t8, terem apresentado uma divergência significativa de *timings* de ocorrência, o maior ênfase dos resultados obtidos foi dado a partir do estado de 8 células, nomeadamente o estado de mórula e de blastocisto. Para estes parâmetros, os autores constataram que um blastocisto transferido e de alta qualidade apresentava um processo de compactação parcial entre as 71,4 a 75,5 horas após inseminação e mórula total a 93,9 horas após inseminação. Ainda foi concluído que a formação de blastocisto, contrariamente aos parâmetros mencionados, foi significativamente mais tardia em blastocistos transferidos. cc2, s2 e s3 apresentaram, igualmente, diferenças significativas entre estes dois grupos.

Outro aspeto importante demonstrado por estes autores foi a maior incidência de anomalias de desenvolvimento, como clivagem direta ou multinucleação, em embriões com menor hipótese de constituir um blastocisto de elevada qualidade, sendo que estes são critérios maioritariamente associados a embriões que não apresentam um padrão de clivagem dentro dos tramites corretos.

Consequentemente, Desai e colaboradores construíram mais uma prova de evidência do papel da morfocinética na dedução do potencial de desenvolvimento até ao estado final e derradeiro.

#### 4.3.12. Estudo de VerMilyea e colaboradores, 2014

Outro estudo retrospectivo muito comentado e referenciado na temática apresentada nesta secção é o de VerMilyea e colaboradores (2014). Através do sistema Eeva™, que, como explicado anteriormente, permite a atribuição de uma classificação automática de embriões com três dias de incubação, com base nos parâmetros morfocinéticos P2 (ou cc2) e P3 (ou s2) conjugados com a classificação morfológica, os autores pretenderam determinar se a classificação prevista de desenvolvimento do embrião por este sistema automático poderia ter uma relação com a previsão dos melhores embriões para implantar. A primeira dedução deste estudo permitiu concluir que embriões classificados como *High* no Eeva test, ou seja, de elevada qualidade, apresentaram um aumento significativo de cerca de 22% no potencial de implantação de *High* relativamente a *Low* (baixa qualidade) e de 20% de *Medium* (ou qualidade mediana) relativamente a *Low* ( $P < 0,0001$  e  $P < 0,0004$ , respetivamente), como ilustrado na figura 25.



**Figura 25-** Resultados obtidos relativos à taxa de implantação nas três categorias propostas do Eeva test, apresentando diferenças significativas entre os grupos respetivos (Alto versus médio,  $P < 0,0001$ ; Médio versus Baixo,  $P = 0,0004$ ). Os números entre parêntesis correspondem ao número de embriões integrados em cada categoria deste sistema de avaliação em relação ao número total considerado e a proporção em percentagem é, igualmente, referida. Adaptado de VerMilyea *et al.*, 2014.

As transferências de, pelo menos, um embrião de elevada qualidade, não só apresentaram, subsequentemente, uma maior taxa de implantação em relação aos de baixa qualidade, como também criaram um aumento das taxas de gravidez, com uma diferença significativa de cerca de 17% ( $P = 0,02$ ) em relação a uma situação em que não houve transferências de embriões de máxima ou média qualidade.

Desta forma, os autores demonstraram que a categorização automática do Eeva test permite hierarquizar corretamente os embriões consoante a maior ou menor taxa de implantação e, em última instância, de gravidez, visto que foi comprovado estatisticamente que a categoria de melhor qualidade (*High*) apresentou os maiores valores para as duas variáveis, seguido do grupo de qualidade mediana e, posteriormente, do grupo de qualidade inferior.

Assim, para além da confirmação da utilidade deste sistema automatizado, pode-se concluir, indiretamente, que P2 e P3 podem ser considerados fortes indicadores de previsão da implantação e gravidez clínica, permitindo avaliar, devida e corretamente, o desenvolvimento dos embriões.



#### 4.3.13. Estudo de Rubio e colaboradores, 2014

Outro estudo liderado por Rubio e colaboradores (2014) correspondeu a um RCT (*Randomized Control Trial*) de análise prospetiva para validação do método de seleção proposto por Meseguer *et al.* (2011) e extrapolação para um novo contexto, com a finalidade de comparar as taxas de gravidez entre embriões cultivados pelo método convencional ou através do *time-lapse* (EmbryoScope®).

Neste estudo, de 930 casais que efetuaram ciclos de ICSI foram obtidos embriões que, posteriormente e ao acaso, foram distribuídos pelos dois grupos, englobando um grupo de embriões incubados numa estufa convencional (grupo controlo, número total 2427) e os restantes monitorizados pelo *time-lapse* (número total 2638). O primeiro grupo seguiu as práticas e avaliações diárias convencionais (avaliação da morfologia a 48 e 72 horas após inseminação, considerando como critérios principais o número de células, simetria, presença de fragmentos, multinucleação e, para embriões de quarto dia, grau de compactação) e os do segundo grupo foram cultivados segundo as condições padrão do aparelho *time-lapse* (5,5 % CO<sub>2</sub>, concentração atmosférica de O<sub>2</sub> e 37°C e captação de imagem de quinze a vinte minutos de intervalo). Para este último grupo, os *timings* dos parâmetros morfocinéticos de análise absolutos, t2 a t5, e relativos, cc2 e s2, foram incorporados nos critérios de avaliação, usufruindo do sistema de seleção de Meseguer *et al.* (2011) para a avaliação embrionária (descrito anteriormente nesta secção).

Duas variáveis foram reportadas como significativamente distintas entre os dois grupos, incluindo a deteção de uma maior percentagem de embriões de terceiro dia de melhor qualidade e de blastocistos de quinto dia de qualidade notável para transferência. Relativamente a estes dois critérios, o grupo de embriões incubados no aparelho *time-lapse* apresentaram resultados mais promissores, registando valores médios estatisticamente maiores de obtenção de embriões e blastocistos de ótima qualidade, em detrimento do que se verificou para a situação de incubação convencional (respetivamente, 46,2 % e 43,1 % para o primeiro parâmetro,  $P = 0,010$  e, 20,9 % e 16,6 % para o segundo,  $P = 0,001$ ).

Adicionalmente, é possível observar uma percentagem de incidência de fragmentação estatisticamente superior no grupo de monitorização pelo *time-lapse* ( $P = 0,006$ ), o que demonstra, nitidamente, a maior capacidade de deteção deste tipo de anormalidades por este aparelho, em relação à observação microscópica convencional.

O *time-lapse* revelou-se, igualmente, um aparelho com vantagens no aumento das taxas de gravidez em progresso, visto que permitiu que se verificasse uma maior

incidência desta variável em relação aos embriões transferidos e à totalidade de ciclos efetuados ( $P = 0,01$  e  $P = 0,005$ , respetivamente).

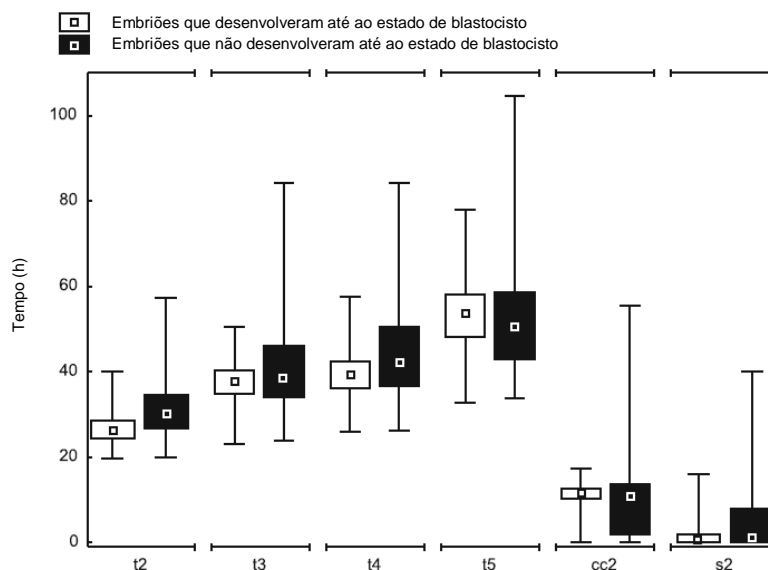
Para além deste resultado, a percentagem de perda de gravidez foi significativamente menor (16%) no caso de embriões derivados da incubação do EmbryoScope® comparativamente ao grupo controlo (25,8 %,  $P = 0,01$ ).

Em suma, Rubio e colaboradores apresentaram uma grande defesa do sistema EmbryoScope® para o melhoramento da seleção e de-seleção de embriões, visto que este estudo foi uma prova do quão superior pode ser a previsão do *time-lapse* para a determinação da competência do embrião, conjugada com a deteção facilitada de anomalias embrionárias.

#### 4.3.14. Estudo de Milewski e colaboradores, 2015

A cultura prolongada *in vitro* de embriões até ao estado de blastocisto é alvo de divergência de opiniões, visto que os seus efeitos negativos no desenvolvimento, incluindo alterações epigenéticas, estão documentados (Hammond *et al.*, 2015). Deste modo, Milewski e colaboradores (2015) depositaram no seu estudo o objetivo da procura de marcadores de desenvolvimento precoces de seleção embrionária, realizando um estudo retrospectivo de análise de desenvolvimento pelo EmbryoScope®. Desta forma, somente t2 a t5 (definidos como parâmetros absolutos) e cc2 e s2 (definidos como parâmetros morfocinéticos relativos) foram contabilizados na análise de desenvolvimento.

De uma forma geral, assim como verificado em outros estudos anteriores, a comparação de dados morfocinéticos entre embriões que desenvolveram e não desenvolveram até blastocistos reflete uma menor variação e um *cluster* mais próximo para o primeiro grupo (figura 26), revelando, assim, que existem mais semelhanças temporais de cada etapa de desenvolvimento quando se testam embriões competentes para atingir o estado de blastocisto.



**Figura 26-** Representação da variação dos parâmetros morfocinéticos t2, t3, t4, t5, cc2 e s2 entre grupos embrionários implantados e não implantados. É notória a diferença entre estes dois grupos, relevando que, para o segundo, a variação dos intervalos de tempo de ocorrência é maior e mais difusa relativamente aos do primeiro grupo. Tempo apresentado em horas (h). t2 a t5 correspondem a parâmetros morfocinéticos indicativos do tempo decorrido desde a inseminação até ao estabelecimento dos estados de dois, três, quatro e cinco blastómeros e os parâmetros relativos cc2 e s2 correspondem, respetivamente, à duração do segundo ciclo celular e ao tempo de sincronização das divisões mitóticas do estado de dois ao estado de quatro blastómeros. As barras pretas correspondem aos intervalos de tempo de parâmetros morfocinéticos obtidos em embriões com fracas potencialidades de desenvolvimento e as barras brancas representam a situação inversa, embriões cujo desenvolvimento culminou na formação de um blastocisto. Adaptado de Milewski *et al.*, 2015.

Adicionalmente, uma menor taxa de desenvolvimento foi encontrada para situações de embriões em que se verificavam maiores intervalos de tempo de ocorrência para todos os parâmetros testados, mostrando, mais uma vez, que cada etapa de progressão ocorre com base em limites ótimos e específicos.

De modo a determinar os parâmetros mais influenciadores para o desenvolvimento do embrião *in vitro*, os autores atribuíram a cada um uma classificação individual de três valores principais (0, 1 ou 2). A atribuição desta classificação ocorre consoante uma crescente capacidade de desenvolvimento embrionário, sendo que a classificação 2 foi atribuída a embriões mais competentes. Assim, com base nesta classificação e nos valores de análise de regressão logística para cada parâmetro, t2, t5 e cc2 apresentaram-se como os parâmetros que melhor indicam a probabilidade de um embrião atingir o estado de blastocisto (já que os valores de *odd ratios*<sup>12</sup> foram os maiores e a classificação atribuída a cada um foi de 2). Estes resultados permitiram aos autores criar, desta forma, uma equação de classificação que permitisse, segundo uma

<sup>12</sup> Valores de *odd ratios* para t2, t5 e cc2 correspondentes a 2,929, 2,331 e 2,356, respetivamente. Valor *P* < 0,001.

fórmula geral, gerar uma classificação com base nos valores de *odd ratios* e na classificação individual dos três valores. O que foi observado é que os valores de classificação desta variável obtidos entre embriões competentes e não competentes eram estatisticamente diferentes ( $P < 0,001$ ), sendo que quanto maior for a probabilidade de competência do embrião e da classificação individual destes parâmetros morfocinéticos maior será a classificação com base neste modelo. Assim, a fórmula proposta por Milewski e colaboradores pode constituir um modelo aceitável de previsão de desenvolvimento até blastocisto visto que, aquando da comprovação estatística, embriões que obtenham maiores valores desta variável irão, por sua vez, refletir um maior potencial de desenvolvimento.

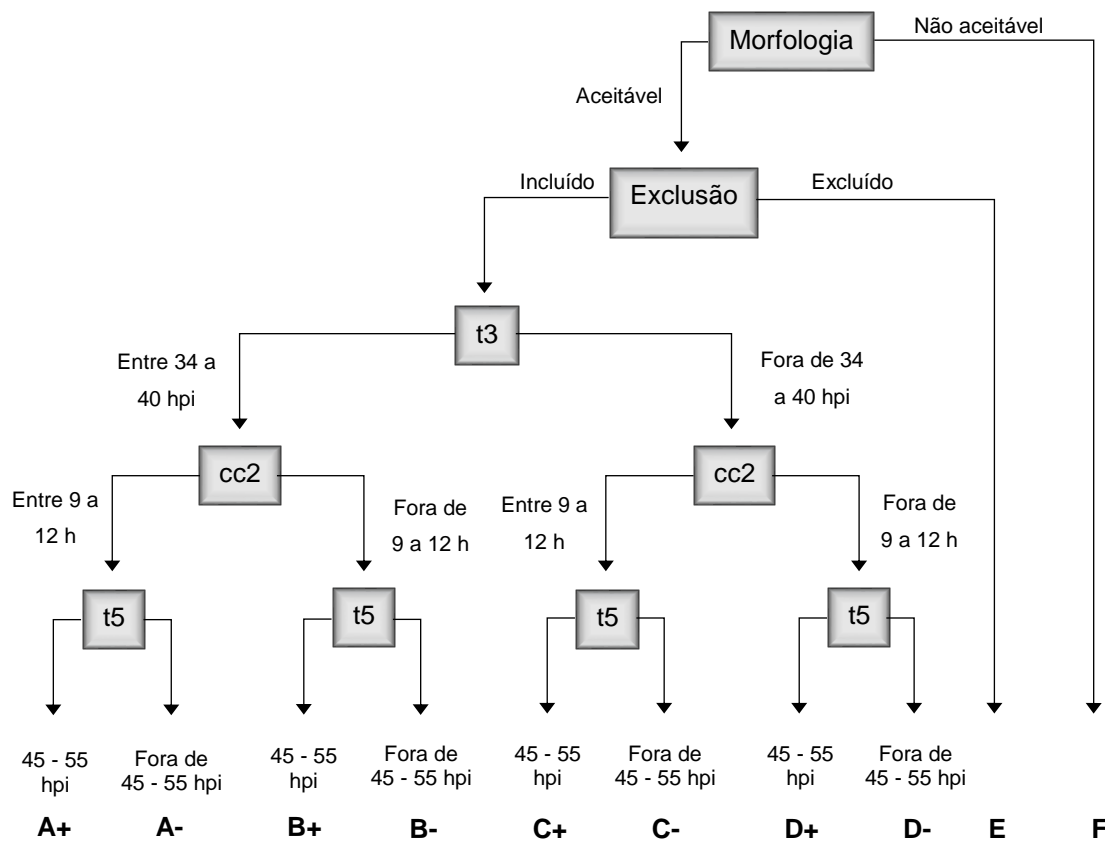
#### 4.3.15. Estudo de Basile e colaboradores, 2015

Inspirado na criação do algoritmo de seleção para previsão da implantação proposto por Meseguer e colaboradores (2011), o estudo retrospectivo de Basile *et al.* (2015) permitiu a criação de um outro algoritmo de seleção, novo e inovador, de modo a prever o potencial de um embrião para implantação. O conhecimento da informação KID e, por isso, do destino de implantação dos embriões considerados no estudo (754 ciclos de ICSI, protagonizados em quatro clínicas de tratamento de infertilidade diferentes) mostrou, mais uma vez, a sua utilidade de importância para objetivos deste âmbito.

Numa fase posterior, marcos encontrados a partir de embriões com destino de implantação conhecido são aplicados num modelo de seleção e validados, prospectivamente, num conjunto de embriões transferidos. Assim, na fase inicial de procura destes marcadores, os embriões são classificados com recurso à análise pelo EmbryoScope® e Embryoviewer considerando os parâmetros de clivagem absolutos (t2 a t5) e relativos (cc2, s2, e duração do estado de duas células embrionárias, calculada pela diferença entre t2 e t3). Para cada parâmetro foi atribuído um sistema de classificação binário consoante os embriões apresentassem etapas de desenvolvimento nos intervalos de tempo aceitáveis e dentro dos limites ou fora dos limites aceitáveis. A significância destas variáveis para o objetivo do estudo foi determinada pelo cálculo de OR. Algumas variáveis, como mutinucleação, clivagem direta e o tamanho dos blastómeros, foram analisados juntamente com a análise morfocinética realizada pelo *time-lapse*.

Deste modo, para a primeira parte do estudo, os intervalos de tempo para cada parâmetro morfocinético foram obtidos, bem como foram calculadas as taxas de

implantação associadas. De acordo com as maiores taxas de implantação obtidas (de 26 a 37%), os autores definiram limites de tempo para t2 de 24,5 a 28 horas após inseminação, t3 de 34 a 40 horas após inseminação, t4 entre 36,6 e 41,3 horas após t0, 45 a 55 horas após inseminação para a ocorrência de t5 e duração do segundo ciclo celular (cc2) e s2 entre 9 a 12 horas e 0,01 a 1,29 horas, respetivamente. O teste de regressão logística permitiu definir que t3, t5 e cc2 foram os mais preditivos e significativos (valores de OR superiores a 1 e os maiores relativamente aos valores dos restantes parâmetros) para determinar a potencialidade de implantação. Subsequentemente, após a determinação dos marcadores de desenvolvimento mais relevantes, a tarefa seguinte consistiu na criação do algoritmo de previsão de implantação englobando, desta forma, os três parâmetros demonstrados como mais pertinentes. O resultado do modelo completo encontra-se ilustrado na seguinte figura (figura 27).



**Figura 27-** Modelo proposto por Basile e colaboradores em 2015. O modelo está dividido em dez categorias principais, de A a F, de acordo com os parâmetros t3 (tempo decorrido desde t0 até ao estado de três blastómeros), duração de cc2 (segundo ciclo celular) e t5 (tempo decorrido desde t0 até ao estado de cinco blastómeros). O primeiro parâmetro, e mencionado como o mais significativo, t3 (entre 34 a 40 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação), corresponde ao primeiro critério morfocinético a ser considerado se o embrião apresentar uma morfologia aceitável e ausência de critérios de exclusão. Assim, se os embriões testados apresentarem o parâmetro t3 dentro dos limites aceitáveis, o próximo passo é a análise da duração do segundo ciclo celular (cc2). Por sua vez, se os limites temporais de cc2 ocorrerem entre as 9 e 12 horas (h), então é atribuída ao embrião a categoria A. As categorias A+ e A- serão, posteriormente, atribuídas consoante os embriões apresentarem limites temporais de t5 dentro ou fora da gama aceitável, respetivamente. Contrariamente, se os embriões não evidenciarem um valor de cc2 nos limites de tempo referidos, então os embriões nesta situação enquadram-se na categoria B. Mais uma vez, o parâmetro t5 irá decidir se é atribuída uma classificação B+ (dentro dos limites indicados) ou B- (fora dos limites indicados) aos embriões em avaliação. No entanto, se determinados embriões apresentam t3 com limites variáveis da situação normal, restam duas classificações possíveis: C, se a duração de cc2 estiver dentro dos limites aceitáveis ou D se ocorrer precisamente o contrário. Mais uma vez, t5 irá decidir entre a atribuição das classificações C+ ou D+ (se entre 45 a 55 hpi) e C ou D (se fora do limite de tempo 45 a 55 hpi). As duas últimas categorias, E e F, são as que ditam que o embrião não pode ser considerado de qualidade aceitável, já que a classificação E indica que podem ter ocorrido situações de clivagem direta, desigualdade de tamanho de blastómeros ou multinucleação, enquanto F infere que a prévia visualização do embrião indica uma morfologia não aceitável. Adaptado de Basile *et al.*, 2015.

Assim, este modelo apresenta-se como um complemento mais recentes do apresentado por Meseguer *et al.* quatro anos antes, contudo a única diferença reside, na substituição do parâmetro s2 para t3 que, segundo os presentes autores, é mais relevante que o anterior. Este modelo inclui o mesmo número de categorias de classificação embrionária que o previamente apresentado, contando como uma hierarquização de dez categorias ordenadas por ordem decrescente de competência para implantação.

Por fim, para a fase final de validação do algoritmo, os critérios apresentados neste esquema foram utilizados como modelo de seleção e aplicados num determinado conjunto de embriões para comprovar o seu grau de utilidade e confiança. Sendo que o objetivo principal foi estabelecer uma relação dos parâmetros morfocinéticos do modelo recente com a taxa de implantação foi verificado um decréscimo significativo ( $P < 0,001$ ) desta variável consoante as decrescentes ordens de qualidade (a categoria A+ englobou embriões com a maior taxa de implantação registada de 32%).

Concluindo, Basile e colaboradores mostraram que os parâmetros morfocinéticos são ferramentas de avaliação não invasivas e preciosas para este tipo de previsões, sendo possível determinar o nível da sua potencialidade e validá-lo para um determinado conjunto de embriões transferidos.

#### 4.3.16. Estudo de Liu e colaboradores, 2015

Um estudo muito interessante e diferente do ponto de vista dos fatores testados para previsão de um outcome clínico foi redigido e visionado por Liu e colaboradores (2015b), contudo utilizando como ferramenta de monitorização o *time-lapse*.

Os presentes autores estabeleceram um critério para avaliação de embriões de quatro blastómeros baseado no número de pontos de comunicação entre os mesmos. Certamente, a comunicação intercelular constitui uma ferramenta essencial no desenvolvimento do embrião, já que permite a troca de informação biológica e fisiológica fundamental para o seu crescimento. Assim, com base neste facto, os autores utilizaram como material biológico embriões no estado de quatro células (765 embriões, obtidos de FIV e de ICSI) com morfologia de alta qualidade e, a partir dos mesmos, obtiveram os valores dos parâmetros morfocinéticos (referentes aos primeiros três dias de cultura (68 horas após inseminação) através da sua análise pelo *time-lapse* (EmbryoScope® e Embryoviewer, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, nível equilibrado de N<sub>2</sub> e 37°C). Adicionalmente, houve

a tentativa de compreender e definir fatores de um desenvolvimento anormal embrionário que afetem a taxa de implantação (por informação de embriões KID) e que sejam utilizados como um modelo de de-seleção embrionária.

Os parâmetros morfocinéticos anotados para este estudo incluíram a duração do estado de quatro blastómeros, cc2, s2 e s3. Adicionalmente, outros aspetos foram determinados com recurso ao *time-lapse* para a segunda parte do estudo, incluindo situações de multinucleação, clivagem direta e reversa. Em vez de t0 como ponto de referência, os autores utilizaram o desaparecimento de pronúcleos para a mesma tarefa, de modo a evitar as diferenças iniciais de tempo registadas entre ciclos de FIV e ICSI (reportadas anteriormente). Os pontos de comunicação entre cada blastómero foram contabilizados pela quantidade de pontos de contacto existentes entre os mesmos (quatro, cinco ou seis). Ocorreu, igualmente, a análise morfológica complementar à análise pelo *time-lapse*.

A maioria dos embriões de quatro células apresentou seis pontos de comunicação no total, no entanto, verificaram-se outros casos em que ocorreu a passagem de menos de quatro, quatro ou cinco pontos de contacto intercelulares no início da fase de quatro blastómeros para seis no final desta mesma fase. Seis pareceu, assim, ser o número de pontos de contacto a ter em conta como referência, já que os embriões foram divididos em três grupos principais, de acordo com a explicação prévia: embriões com menos de seis pontos de comunicação, embriões que atingiram seis pontos de comunicação no fim da fase de quatro blastómeros, e embriões já com seis pontos de comunicação. Das três categorias, a primeira apresenta os resultados menos promissores, tanto em relação ao tempo dos parâmetros morfocinéticos como relativamente ao potencial de implantação. Assim sendo, este grupo apresentou uma maior duração do parâmetro s2 comparado com os embriões do segundo grupo (respetivamente,  $0,9 \pm 1,5$  e  $0,6 \pm 0,6$  horas após o desaparecimento pronuclear,  $P < 0,05$ ) e do parâmetro s3 em relação aos embriões do terceiro grupo (respetivamente,  $5,7 \pm 4,8$  e  $4,1 \pm 4,1$  horas após o desaparecimento pronuclear,  $P < 0,05$ ). Relativamente aos restantes parâmetros morfocinéticos, não foram encontradas diferenças significativamente relevantes entre este grupo e os restantes ( $P > 0,05$ ).

O primeiro grupo registou, ainda, a mais baixa taxa de implantação (apenas de 5%,  $P < 0,05$ ), análise de regressão logística com um valor significativamente menor de OR (0,128) e, maioritariamente, embriões com menor qualidade morfológica ( $P < 0,01$ ). Consequentemente, os seguintes resultados mostraram, claramente, uma maior tendência de implantação e normalidade dos parâmetros morfocinéticos para embriões que atingiram ou que já possuíam seis pontos de contacto entre os quatro blastómeros associados à fase estudada. Contudo, em relação ao segundo grupo, o tempo



necessário para atingir esta situação parece não influenciar significativamente a taxa de implantação e os parâmetros morfocinéticos testados.

Considerando, desta forma, a variável “menos de seis pontos de comunicação no estado de quatro blastómeros” como um fator negativo para a implantação, embriões descartados com base neste critério e com os critérios de de-seleção mencionados anteriormente contribuíram para um aumento de mais de 30% na taxa de implantação ( $P < 0,05$ ).

Desta forma, Liu e colaboradores alcançaram um feito extraordinário ao mostrarem que, não só os fatores já reportados como negativos para o desenvolvimento e implantação, como também novos parâmetros de avaliação, incluindo a comunicação intercelular em seis pontos de comunicação, podem aumentar o número de melhores embriões selecionados e aperfeiçoar os métodos utilizados para esta tarefa tão árdua e cuidadosa. Mais uma vez, a monitorização com recurso ao *time-lapse* mostrou ser um ponto fundamental para este tipo de pesquisas e uma ferramenta essencial da criação de métodos de seleção e de de-seleção.

#### 4.3.17. Estudo de Goodman e colaboradores, 2016

O que muitos embriologistas e investigadores nesta área propõem é que mais ensaios randomizados sejam realizados, de forma a testar a utilidade dos modelos de seleção propostos por autores de artigos científicos da área em casos respeitantes a outros centros de tratamento de infertilidade. Como mencionado anteriormente, o maior desafio desta tarefa reside, ainda, na grande variabilidade de procedimentos, protocolos e *set* de embriões que cada clínica ou centro engloba, dificultando, assim, a introdução com sucesso de um método de seleção. Contudo, vários são aqueles que existem a fim de provar o contrário. Recentemente, um RCT prospetivo foi realizado por Goodman e colaboradores (2016) com o objetivo principal de testar se a combinação dos métodos convencionais de avaliação embrionária com os parâmetros morfocinéticos de análise pelo *time-lapse* poderiam ajudar a que houvesse uma melhor previsão de implantação e, conseqüentemente, da gravidez de um casal. Todos os embriões foram, primeiramente, seguidos pelo *time-lapse*, no entanto a partir de determinado momento, uns embriões foram transferidos para estufas convencionais e outros persistiram no sistema *time-lapse* de monitorização. Assim, a comparação, para a mesma proporção de pacientes, de embriões que foram avaliados pelo método convencional *versus* os que, para além do convencional (grupo controlo), foram analisados com recurso à morfocinética pelo EmbryoScope<sup>®</sup>, foi possível para distinguir qual destes

procedimentos suportaria embriões com melhor *outcome*. O método convencional foi determinado pela avaliação da morfologia para tempos fixos (como apresentado na secção dos anexos), enquanto na avaliação pelo *time-lapse*, todos os parâmetros morfocinéticos precoces e tardios foram analisados.

Assim, para esta última categoria, os autores consideraram como pontos positivos de avaliação uma duração (desde a inseminação até ao estabelecimento da etapa celular em questão) de t5 entre 45,8 e 57 horas após inseminação, s2 entre 0,0 e 0,1 horas, s3 entre 1,4 e 7 horas e tSB inferior a 100 horas após inseminação. Com base nos métodos propostos no estudo, apesar de não ter havido diferenças significativas entre a análise convencional e a análise morfocinética adicional, a análise KID revelou que, embriões que implantaram apresentaram, como em estudos anteriores, durações mais curtas de parâmetros entre tPNf a tEB e maior duração de s2 e cc2.

Adicionalmente, a análise pelo *time-lapse* contribuiu positivamente para o aumento da visualização de processos como multinucleação e clivagem direta em embriões cuja implantação falhou, resultando num aumento de deteção de cerca de 28 % com a implementação deste sistema. Como já mencionado, tSB apresentou-se estatisticamente diferente no que diz respeito à capacidade de implantação (através da análise de KID) e, apesar de todos os parâmetros não apresentarem diferenças significativas entre o grupo controlo e o grupo EmbryoScope®, a análise de apenas blastocistos transferidos entre os dois grupos revelou uma melhor classificação baseada nos critérios morfocinéticos estipulados no grupo com posterior análise pelo Embryoscope®<sup>13</sup>.

Deste modo, assume-se que este novo sistema de monitorização constitui uma ferramenta com vantagens perceptíveis e adicionais à análise convencional morfológica, apresentando mais possibilidade de deteção de anomalias celulares, como a multinucleação, clivagem direta e reversa e fragmentação, e um maior poder discriminativo de desenvolvimento obedecendo a critérios específicos dentro de cada etapa celular.

---

<sup>13</sup> Baseada na classificação morfocinética do grupo controlo e do grupo *time-lapse* de  $2,6 \pm 1,2$  e de  $2,2 \pm 1,2$ , com  $P < 0,01$ .

#### 4.4. Aplicação da morfocinética à previsão de embriões aneuploides

O diagnóstico genético pré-implantação corresponde a um método utilizado recorrentemente na área de reprodução assistida com a finalidade primordial de determinar se embriões obtidos por técnicas de reprodução humana assistida apresentam anormalidades cromossómicas (Munné, 2012), muitas destas incompatíveis com a sobrevivência a longo prazo do ser vivo.

Primeiramente, esta técnica foi usada para determinar, principalmente, a existência de doenças genéticas associadas a progenitores que, à partida, recorriam a métodos de tratamento de infertilidade e cujo diagnóstico apontava para a presença de um problema genético, quer a nível de um distúrbio dos cromossomas sexuais quer da existência de problemas cromossomais de foro estrutural (Handyside *et al.*, 1990 e Munné *et al.*, 1995 em Ly *et al.*, 2011). Assim, a aplicação desta técnica, quando devidamente recomendada, refletia a descodificação da presença nos embriões de doenças monogénicas (dominantes ou recessivas), doenças relacionadas com os cromossomas sexuais (especialmente ligadas ao cromossoma X) ou possibilidade de ocorrência de translocações (Harton *et al.*, 2011). Esta técnica minuciosa foi sendo aperfeiçoada ao longo do tempo com a tentativa de não provocar efeitos prejudiciais graves que se manifestassem negativamente no desenvolvimento embrionário (Handyside *et al.*, 1990; Pellestor, 1995 em Ziebe *et al.*, 2003).

Existem várias indicações que podem sugerir que um determinado casal sofre de algum problema genético, para além da idade avançada de uma mulher, onde podem ser nomeados fatores como impossibilidade de implantação, abortos ou casos de infertilidade graves em um ou ambos os elementos do casal (Harper *et al.*, 2010).

No contexto da procriação assistida, a deteção de anormalidades genéticas é de máxima relevância, especialmente para gâmetas provenientes de mulheres com idade avançada, já que parece haver evidências de uma estruturação mais fraca do fuso acromático, parte essencial para a divisão celular, e problemas a nível do alinhamento dos cromossomas aquando das divisões meióticas que formam os gâmetas femininos (Voorhis, 2007).

Um dos tipos de anormalidades genéticas mais comuns encontradas em embriões corresponde à existência de aneuploidias, cuja incidência em embriões submetidos a monitorização *in vitro* pode ser superior a 60% (Fragouli *et al.*, 2011 em Rienzi *et al.*, 2015). O teste genético para a sua descoberta em embriões humanos em fase de pré-

implantação designa-se PGD-AS (*Pre-implantation genetic diagnosis for aneuploidy screening*).

Por definição, a aneuploidia é definida como situação que reflete a presença de anormalidades genéticas em termos de número de cromossomas, podendo apresentar um número de cópias cromossomais superiores de determinado cromossoma numa célula ou, contrariamente, um menor número (Braude *et al.*, 2002). A relação entre a incidência de aneuploidia e a idade dos embriões parece encontrar-se bem estabelecida no mundo das ciências da reprodução. Para constatar tal facto, Gianaroli e colaboradores lideraram uma investigação sobre a relação de anormalidades cromossómicas em embriões provenientes de mulheres com idade mais avançada com a taxa de implantação e gravidez, usando a técnica de FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) com sondas específicas para marcação fluorescente dos cromossomas X, Y, 13, 18 e 21<sup>14</sup>. Os autores concluíram que realmente existe uma relação entre a incidência de anormalidades genéticas e da taxa de implantação, já que se verificou um potencial de implantação significativamente menor (11,9 % ,  $P < 0,05$ ) em embriões cuja técnica de FISH foi aplicada para verificação destas anormalidades relativamente a embriões normais pertencentes e obtidos de um grupo de mulheres mais jovens (taxa de implantação de 28%).

Convencionalmente, um embrião humano em estado de clivagem que não apresente características morfológicas suficientemente aceitáveis para ser considerado um futuro blastocisto de qualidade é rejeitado de modo a não comprometer a probabilidade de haver gravidez. Este facto foi comprovado Hardarson *et al.*, 2003, que realizaram um estudo comparativo para tentar perceber se embriões de segundo dia de baixa qualidade com melhoramento nos parâmetros de classificação morfológica no dia seguinte teriam a capacidade preditiva de determinar se os blastocistos provenientes a partir dos mesmos apresentavam alguma anormalidade cromossómica. O grupo de controlo incluiu embriões de dadores considerados de boa qualidade. Os resultados incluíram, entre outros, a afirmação que embriões de segundo ou terceiro dia que se encontrem com uma classificação morfológica mais baixa apresentam maior probabilidade de anormalidades cromossómicas no estado de blastocisto, comparativamente a embriões considerados de boa qualidade. A análise feita neste estudo incluiu aproximadamente o mesmo conjunto de cromossomas considerados no estudo anteriormente mencionado (13, 16, 18, 21, 22, X e Y) e, através da análise pela técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) com sondas específicas para cada

---

<sup>14</sup> Cromossomas considerados de máxima importância para o estudo de aneuploidias, já que a ocorrência de aneuploidias a nível dos mesmos pode causar, por exemplo, patologias como a trissomia 21 ou o síndrome de Patau.

cromossoma, os autores concluíram que os níveis de aberrações cromossómicas entre estes grupos, no que diz respeito aos níveis de tetraploidia, evidenciaram diferenças significativas em blastocistos provenientes de embriões de baixa qualidade e embriões de boa qualidade. No entanto, os autores afirmam que uma investigação mais profunda terá que ser efetuada em relação a este aspeto, concluindo os próprios que, mesmo que haja um melhoramento na qualidade embrionária, não é possível dizer com certeza que este critério é suficiente para prever o desenvolvimento de um blastocisto cromossomicamente normal, com base, somente, no conjunto de cromossomas utilizados, visto que pode haver mudanças genéticas inerentes ao desenvolvimento do blastocisto nesta mesma fase.

Adicionalmente, para além das características morfológicas anormais que um embrião aneuploide pode apresentar, vários autores lideraram investigações de modo a associar a morfocinética e os tempos de desenvolvimento ditados pela sua aplicação à previsão de aneuploidia de um embrião. Claro está que o objetivo primordial mantém-se para esta temática, a criação de modelos de previsão baseados na morfocinética que possam permitir uma seleção embrionária mais confiável e segura, tendo sempre em vista a transferência de um embrião geneticamente normal.

A relação aneuploidia-parâmetros morfocinéticos ainda está pouco definida e continua a ser alvo de discussão. Esta situação verifica-se porque, ainda recentemente, vários estudos afirmam que não foram encontradas evidências significativas suficientemente fortes que associem a aneuploidia à análise morfocinética dos embriões (Rienzi *et al.*, 2015), enquanto outros parecem já definir alguns limites para parâmetros morfocinéticos que permitam prever a possibilidade de um embrião apresentar anomalias cromossómicas (Campbell *et al.*, 2013). Campbell e colaboradores, em 2013, propuseram um modelo de previsão de aneuploidia muito importante, permitindo classificar, em três categorias, o risco de um determinado embrião ser aneuploide. Assim, a partir de dados conhecidos da implantação de embriões (embriões KID), o modelo proposto por estes autores englobou dois parâmetros morfocinéticos referentes à fase de blastocisto, incluindo tSB e tB. Desta forma, o modelo de classificação do risco de aneuploidia pode definir-se por estes critérios: risco elevado, se tB ocorrer depois das 122,9 horas após inseminação; risco intermédio, se tSB ocorrer depois das 96,2 horas após inseminação e tB ocorrer antes das 122,9 horas após inseminação; e, por fim, um baixo risco de aneuploidia, se tSB e tB ocorrerem, respetivamente, antes das 96,2 e 122,9 horas após inseminação.

Ao realizar os testes estatísticos devidos, as diferentes categorias do modelo proposto relacionaram-se significativamente com o potencial de implantação e com a possibilidade de nascimentos vivos ocorrentes de embriões submetidos a avaliação por

este modelo. Assim, embriões com menor risco de aneuploidia, segundo esta avaliação, apresentaram um potencial significativamente superior de implantação e de nascimentos vivos gerados pelos mesmos (respetivamente,  $P < 0,0001$  e  $P = 0,01$ ). Igualmente, estes dois parâmetros morfocinéticos, para embriões aneuploides e geneticamente normais, apresentaram uma maior dispersão temporal para embriões cuja aneuploidia foi confirmada relativamente a embriões sem aneuploidia, estes que apresentaram uma maior coesão temporal para os parâmetros apresentados no modelo.

#### 4.5. Comparação dos tempos de ocorrência de etapas celulares com recurso à aplicação da morfocinética

É de notar que variados são os autores que afirmam que o primeiro passo na validação de um modelo de seleção universal para o *time-lapse* corresponde à aplicação e à criação de um modelo próprio para cada centro de tratamento de infertilidade, utilizando neste modelo os protocolos convencionalmente empregues, seja de estimulação ovocitária (dose de FSH, antagonista ou agonista, entre outros) ou das técnicas de FIV ou ICSI (meios de cultura, sistema *time-lapse*, entre outros), e considerando as características intrínsecas a cada paciente tratado, visto que o seu historial pode influenciar a qualidade dos embriões criados *in vitro* e, em última instância, o padrão de divisões mitóticas dos mesmos (Chamayou *et al.*, 2013). Estes fatores que influenciam a cinética de desenvolvimento (designados *confounders*) devem ser considerados em todas as análises realizadas pelos parâmetros morfocinéticos, podendo dificultar a partilha e aplicabilidade dos diferentes modelos propostos entre diferentes centros e clínicas (Kirkegaard *et al.*, 2015). Outro aspeto de máxima relevância que pode alterar a dinâmica de divisão pode constituir o dia de transferência e, assim, o tempo de inubação a que os embriões estão sujeitos. Apesar de alguma controvérsia criada a nível da transferência de embriões ao terceiro ou quinto dia de cultura, vários aspetos podem ser apontados como vantajosos ou desvantajosos para as duas situações. O conhecimento detalhado de marcos celulares e a sua determinação precoce pode levar a que haja a determinação prévia de embriões de maior qualidade, de modo a evitar a sua cultura durante longos períodos de tempo (Milewski *et al.*, 2015). Por sua vez, alguns autores apontam que a cultura até ao estado de blastocisto trouxe algumas vantagens no *outcome* do tratamento de infertilidade, como o aumento da taxa de implantação (Gardner *et al.*, 1998 em Fisch *et al.*, 2003),

possivelmente graças ao facto desta estrutura celular encontrar-se com uma maior “*compatibilidade fisiológica*” relativamente à situação *in vivo* (Utsunomiya *et al.*, 2004) e de todas as transformações observadas nesta fase serem já orientadas pelo genoma embrionário, o que reflete, mais fielmente, a capacidade de desenvolvimento intrínseca do embrião (Garner *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2012).

Depois de todos os estudos mais relevantes que abordam o potencial da morfocinética para definir limites corretos e confiáveis para cada etapa de desenvolvimento do embrião serem nomeados e descritos, a compilação de todos os timings abordados por cada publicação pode auxiliar e fornecer um panorama geral das semelhanças e diferenças entre os mesmos. Adicionalmente, este tipo de informação pode criar ao leitor uma espécie de perceção temporal de todos os marcos abordados e significativos, de modo que esta sumarização está apresentada nas tabela seguinte (tabela 7).

Tabela 7- Sumatização dos timings de cada etapa celular consoante os estudos apresentados. hpi representa *hours post-insemination* e h indica o tempo em horas.

	Lemmen et al., 2008	Wong et al., 2010	Meseguer et al., 2011	Cruz et al., 2012	Rubio et al., 2012	Dal Canto et al., 2012	Chamayou et al., 2012
tC-tF0	-	-	-	-	-	-	7,7 – 22,9 hpi
tPNf	24,3 ± 2,5 hpi	-	-	-	-	-	-
tPNa	28,2 ± 1,4 hpi	-	-	-	-	-	-
Duração da 1 <sup>o</sup> citocinese	-	< 33 minutos	-	-	-	-	-
t1	-	-	-	-	-	-	18,4 - 30,9 hpi
t2	-	7,8 – 14,3 h <sup>15</sup>	24,3 - 27,9 hpi	26,8 ± 0,2 hpi	-	-	21,4 - 34,8 hpi
t3	-	0 – 5,8 h <sup>16</sup>	35,4 - 40,3 hpi	39,2 ± 0,4 hpi	-	-	-
t4	-	-	-	39,9 ± 0,4 hpi	-	-	33,1 - 57,2 hpi
t5	-	-	48,8 - 56,6 hpi	-	-	56,5 ± 8,1 hpi	-
t7	-	-	-	-	-	54,9 ± 5,2 hpi	46,1 - 82,5 hpi
t8	-	-	-	-	-	-	46,4 - 97,8 hpi
tSC	-	-	-	-	-	-	-
tM	-	-	≤ 0,76 h	90,6 ± 0,6 hpi	-	-	-
tSB	-	-	-	-	-	-	-
tB	-	-	-	-	-	-	-
s2	-	-	≤ 0,76 h	0,6 ± 0,2 h	-	-	-
s3	-	-	-	-	-	-	0,7 - 30,8 h
cc2	-	-	≤ 11,9 h	12,4 ± 0,3 h	< 5 h	-	-
cc3	-	-	-	-	-	-	9,7 - 21,0 h

<sup>15</sup> Valor referente à duração do estado de dois blastómeros

<sup>16</sup> Valor referente à duração do estado de três blastómeros



Tabela 7 (Cont.): Sumariação do *timings* de cada etapa celular consoante os estudos apresentados. hpi representa hours post-insemination e h indica o tempo em horas.

	Campbell et al., 2013	Herrero et al., 2013	Kirkegaard et al., 2013	Desai et al., 2014	Basile et al., 2015	Liu et al., 2015	Goodman et al., 2016
tC-tF0	-	-	-	-	-	-	-
tPNf	-	-	-	-	-	-	-
tPNa	-	-	-	-	-	-	-
Duração da 1 <sup>o</sup> citocinese	-	-	20 minutos	-	-	-	-
t1	-	-	-	-	-	-	-
t2	-	26,4 hpi	-	-	24,5 - 28 hpi	-	-
t3	-	38,6 hpi	-	-	34 - 40 hpi	-	-
t4	-	-	-	-	36,6 – 41,3 hpi	-	-
t5	-	53,5 hpi	-	-	45 - 55 hpi	-	45,8 - 57 hpi
t7	-	-	-	-	-	-	-
t8	-	58,7 hpi	-	-	-	-	-
tSC	-	-	-	71,4-75,5 hpi	-	-	-
tM	-	89,3 hpi	-	93,3 hpi	-	-	-
tSB	< 96,2 hpi	-	-	-	-	-	< 100 hpi
tB	< 122,9 hpi	104,1 hpi	-	-	-	-	-
s2	-	-	-	-	-	0,9 ± 1,5 h	0,0 – 0,1 h
s3	-	-	-	-	-	5,7 ± 4,8 h	1,4 - 7 h
cc2	-	-	-	-	9-12 h	-	-
cc3	-	14,3 h	-	-	0,01 - 1,29 h	-	-

#### 4.6. Avaliação convencional *versus* avaliação pelo *time-lapse*

A monitorização pós-inseminação é de extrema importância para determinar tanto a qualidade dos embriões como a sua progressão, respeitando algumas regras base pré-definidas para a classificação de vários parâmetros morfológicos embrionários. Adicionalmente, o *timing* de ocorrência de certos eventos celulares é muito importante na avaliação do desenvolvimento de embriões, sendo assim um parâmetro que deve ser considerado.

Após a explicação do conceito de cinética de desenvolvimento, e da ideia de variação temporal de um processo celular que pretende fornecer, é importante perceber todos os componentes de desenvolvimento que o mesmo analisa e, no contexto de uma clínica de reprodução assistida, nos parâmetros em que se baseia para escolher o embrião com mais potencial para chegar ao término de um desenvolvimento normal.

Nos métodos de seleção embrionária, quer o convencional quer o efetuado pelo *time-lapse*, existem determinados eventos celulares refletidos na morfologia que têm obrigatoriamente de ser avaliados. Nesta secção será abordada, assim, a aliança entre a morfocinética e a morfologia, critérios estes que não devem ser dissociados na avaliação da qualidade embrionária, mesmo quando os aparelhos *time-lapse* são empregues.

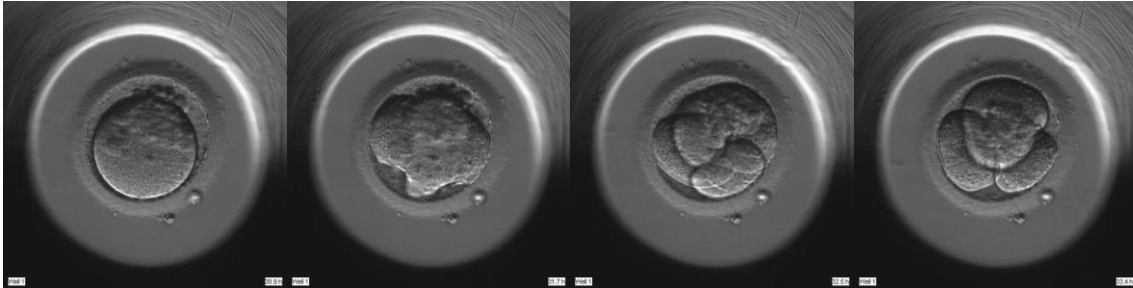
Em termos morfológicos, as diferentes situações e estruturas celulares a serem consideradas podem estar presentes no citoplasma ou podem constituir fatores extracitoplasmáticos. Relativamente ao primeiro grupo, aspetos gerais como a aparência e textura do citoplasma (Balaban e Urman, 2006 em Rienzi *et al.*, 2012) são determinados imediatamente ao observar o embrião, assim como o seu tamanho e forma. A presença de grânulos, vacúolos, fragmentação, multinucleação, inclusões e agregados de órgãos celulares, como os de retículo endoplasmático liso deverão ser tidos em conta durante toda a avaliação do embrião (Rienzi *et al.*, 2012). No grupo de critérios a serem avaliados fora do citoplasma podem ser incluídas características da zona pelúcida, em termos de forma, espessura e tamanho, do espaço perivitelino e de parâmetros associados à morfologia dos pronúcleos<sup>17</sup> (Rienzi *et al.*, 2012).

A clivagem direta e clivagem reversa indicam, certamente, um desenvolvimento embrionário com padrão anormal e são consideradas como critérios de de-seleção dos embriões que os apresentam. Desta forma, o primeiro evento celular corresponde a uma situação em que há a passagem direta de um para três blastómeros (representado na figura 28) em menos de cinco horas ou da mesma situação, contudo passando pelo estado intermédio de duas células. Segundo a comunidade científica, este processo

---

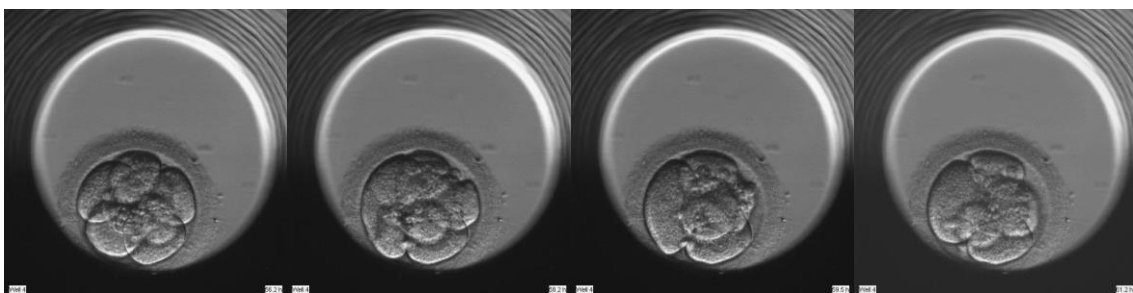
<sup>17</sup> Critérios de avaliação morfológica abordados na secção dos anexos.

inconvenção está identificado como um fator que prejudica a implantação embrionária e que demonstra que embriões onde ocorre podem apresentar uma cinética de divisões mitóticas alterada (Herrero *et al.*, 2013).



**Figura 28-** Representação gradual do processo de clivagem direta, consistindo no fenómeno correspondente à passagem de um blastómero (primeiro *frame*) diretamente para três blastómeros (último *frame*). A sequência de imagens foi captada pelo EmbryoScope® às 30,9 hpi, 31,7 hpi, 32,5 hpi e 33,4 hpi, respetivamente (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Bellisford e Carter, 2015.

Por sua vez, a ocorrência de clivagem reversa (ilustrada por imagens captadas pelo *time-lapse* na figura 29), correspondente a uma regressão de desenvolvimento embrionário, podendo ser explicada por duas razões principais: a conjugação dos blastómeros resultantes de uma divisão após a mesma ter ocorrido ou erros a nível da concretização da citocinese ou separação do citoplasma das células (Liu *et al.*, 2015).



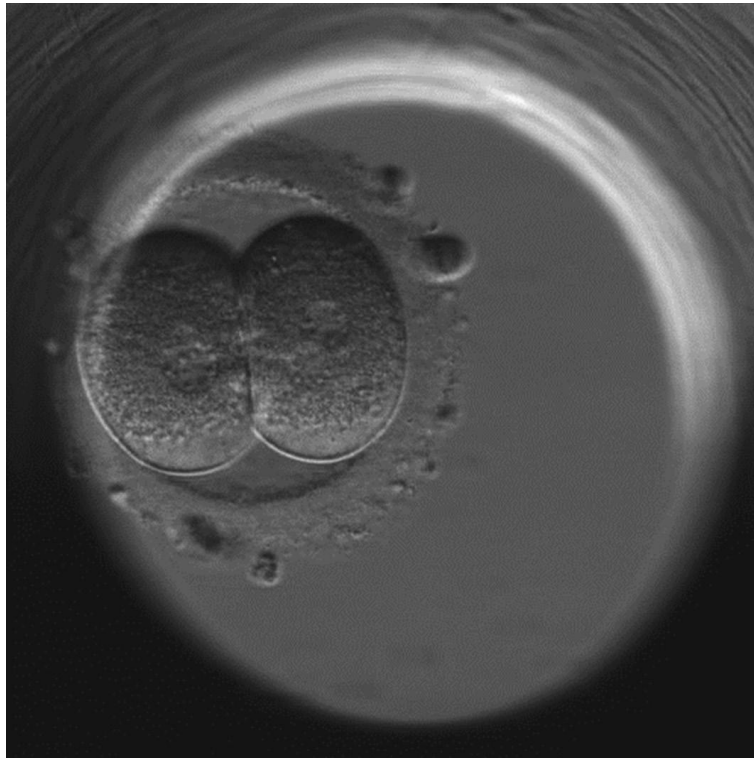
**Figura 29-** Representação do processo de clivagem reversa, consistindo no fenómeno correspondente a uma regressão no processo de desenvolvimento embrionário contínuo e padronizado. É possível verificar, por esta sequência de imagens, que um embrião com blastómeros já individualizados regrediu no desenvolvimento apresentando, no final (último *frame*) um número de blastómeros distinto e inferior relativamente à primeira imagem. A sequência de imagens foi captada pelo EmbryoScope® às 56,2 hpi, 58,2 hpi, 59,5 hpi e 61,2 hpi, respetivamente (hpi- *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Hulme, 2015.

Outro aspeto intracitoplasmático que pode indicar a presença de anomalias genéticas corresponde à multinucleação, presença de um número superior a um núcleo num determinado blastómero. Desde cedo que a ocorrência deste processo é vista como um ponto negativo no desenvolvimento embrionário, indicando uma potencial situação de anormalidades cromossómicas ou morfológicas, refletidas no tamanho e na distribuição dos blastómeros (Kligman *et al.*, 1996). Aparentemente, o tamanho dos blastómeros apresenta uma relação bastante estreita com a presença de anomalias cromossómicas e com a ploidia, de modo que blastómeros maiores que o normal e que apresentem fragmentação podem ser indícios da ocorrência desta situação que, em última instância, leva a uma diminuição drástica do potencial de implantação do embrião em questão (Munné *et al.*, 1994 em Kligman *et al.*, 1996; Van Royen *et al.*, 2003).

Esta é uma ocorrência que deve ser considerada e detetada precocemente e corretamente na área da reprodução humana assistida, visto que qualquer embrião que apresente este tipo de anormalidade cromossómica muito provavelmente apresenta um padrão anormal de divisões celulares e de distribuição equivalente dos cromossomas para as células-filhas (Van Royen *et al.*, 2003).

Existem limites aceitáveis para a incidência de multinucleação em embriões em fase de clivagem, de tal forma que Van Royen *et al.* (2003) definiram que um limite máximo de 16,8 % para embriões de segundo dia e 15,5 % para embriões de terceiro dia. Igualmente, segundo os critérios de uniformidade dados pela Alpha e ESHRE (2011), a multinucleação deve ser determinada às 44 horas após inseminação de modo a detetar a ocorrência deste evento e descartar todos os embriões que apresentem um nível não aceitável de incidência desta propriedade (Alpha e ESHRE, 2011 em Shearer, 2015).

Como mencionado, a incidência da multinucleação em embriões incubados (figura 30) apresenta uma deteção significativamente maior com recurso a aparelhos *time-lapse* (Rubio *et al.*, 2012), já que o detalhe da imagem e a visualização contínua da progressão deste tipo de anomalias é percebido gradualmente com a finalidade de assistir a toda a sua progressão.



**Figura 30-** Representação de uma imagem captada pelo aparelho *time-lapse* EmbryoScope®, onde é possível visualizar, claramente, um embrião no estado de dois blastómeros binucleado (presença de dois núcleos em ambos os blastómeros). Adaptado de Shearer, 2015.

Outra razão subjacente à possibilidade de visualização ininterrupta por parte deste aparelho está associada à observação de todas as fases de transição dos blastómeros de um ciclo para outro e, subsequentemente, de aparecimento e desaparecimento nuclear (Shearer, 2015). Daí estar documentado que a multinucleação pode ser considerada uma característica de aparecimento cíclico, sendo mais visível em determinadas etapas do desenvolvimento embrionário (Ergin *et al.*, 2014). Consequentemente, o estudo de Ergin e colaboradores (2014) permitiu, utilizando como ferramenta de monitorização embrionária o EmbryoScope®, a descoberta de uma relação negativa entre a multinucleação e as taxas de implantação e gravidez, com uma diminuição significativa de aproximadamente 20% entre embriões normais e embriões multinucleados. Igualmente, uma mudança significativa do padrão temporal adequado de ocorrência de determinadas fases celulares entre embriões normais e multinucleados, revelando que o tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de dois (respetivamente,  $26,1 \pm 2,7$  e  $26,9 \pm 3,0$  horas após inseminação,  $P = 0,003$ ), quatro (respetivamente,  $38,1 \pm 3,5$  e  $38,7 \pm 4,0$  horas após inseminação,  $P = 0,04$ ) e seis blastómeros (respetivamente,  $51,7 \pm 5,2$  e  $52,9 \pm 5,6$ ,  $P = 0,02$ ) encontrava-se alterado e com ocorrência mais tardia em embriões que apresentavam multinucleação.

Desta forma, o *time-lapse* é considerada uma ferramenta essencial para a sua completa deteção e em que momentos do desenvolvimento se verifica. Consequentemente, é muito provável que o padrão dos ciclos celulares de um embrião que seja multinucleado não esteja dentro dos limites normais de ocorrência das etapas celulares de desenvolvimento, pelo que o mesmo deve ser imediatamente descartado.

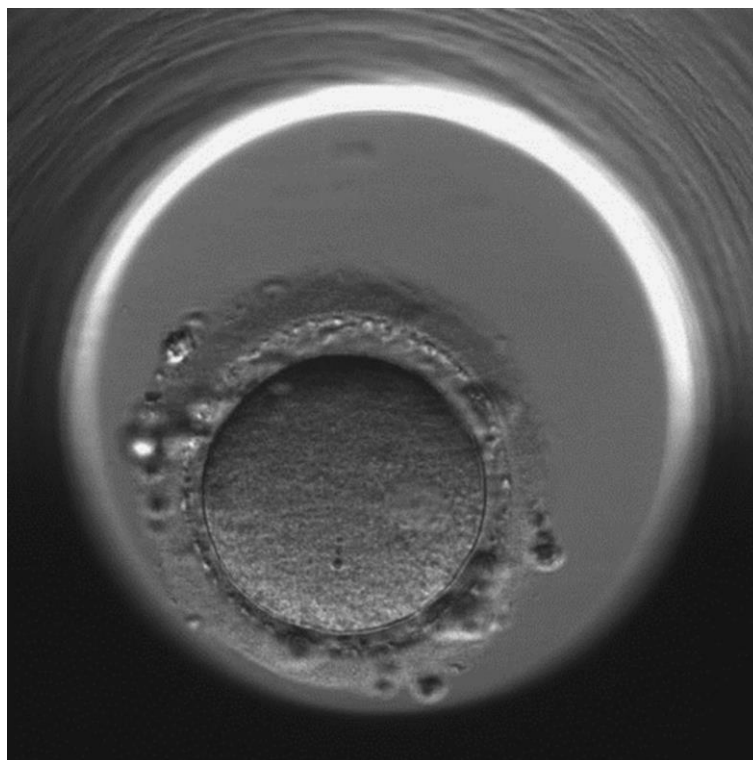
A presença de agregados de retículo endoplasmático liso corresponde a outro fator intracitoplasmático que pode aparecer no embrião monitorizado *in vitro*. Estes agregados aparecem, geralmente, na forma de vacúolos, de modo que podem não ser detetados de imediato como correspondentes a estas estruturas (Drezet, 2015). Contudo, estes agregados podem ser distinguíveis das restantes estruturas celulares pelo facto de não apresentarem membrana celular ou núcleo e o seu aspeto ser, normalmente, translúcido e com uma textura distinta (Van Blerkom, 1990 em Balaban e Urman, 2006; Drezet, 2015). As funções de libertação do ião cálcio no embrião por esta estrutura celular convencional está bem determinada, no entanto, o aparecimento destes agregados no citoplasma de células embrionárias parece indicar uma desregulação no controlo dos níveis de cálcio (Tesarik, 1997 em Balaban e Urman, 2006), potencialmente provocada pela administração da hormona hCG (gonadotrofina coriónica humana) na fase de estimulação ovárica (Otsuki *et al.*, 2004 em Drezet, 2015).

As regras de uniformização da avaliação de características morfológicas propostas por Alpha e ESHRE (2011) descrevem que a presença destes agregados representa uma situação de anormalidade e, desta forma, os embriões em questão não devem ser considerados para processos de transferência.

Vários autores representantes da área da embriologia demonstram que o desenvolvimento embrionário pode ser comprometido em embriões que apresentam este tipo de estrutura celular, concluindo que os potenciais de qualidade e de concretização de uma gravidez podem ser diminutos (Otsuki *et al.*, 2004 em Balaban e Urman, 2006 e Shaw-Jackson *et al.*, 2014).

Diversos foram os estudos analisados por Shaw-Jackson e colaboradores, em 2014, com o objetivo de estabelecer um consenso sobre o significado destes agregados na célula. Assim, diversos autores correspondentes a estas publicações relacionaram uma diminuição das taxas de fertilização (Ebner *et al.*, 2008 e Sá *et al.*, 2011 em Shaw-Jackson *et al.*, 2014), de taxas de implantação e da qualidade de oócitos ou embriões com este tipo de agregados citoplasmáticos, adicionando, ainda, a verificação de um aumento da incidência de malformações cromossómicas na transferência mista deste tipo de embriões e embriões normais (Bielanska e Leveille, 2011 e Mateizel *et al.*, 2013 em Shaw-Jackson *et al.*, 2014).

Mais uma vez, a aplicação do *time-lapse* torna-se indispensável e fundamental (figura 31), de modo a aumentar o poder discriminativo e distinção deste tipo de organização celular.



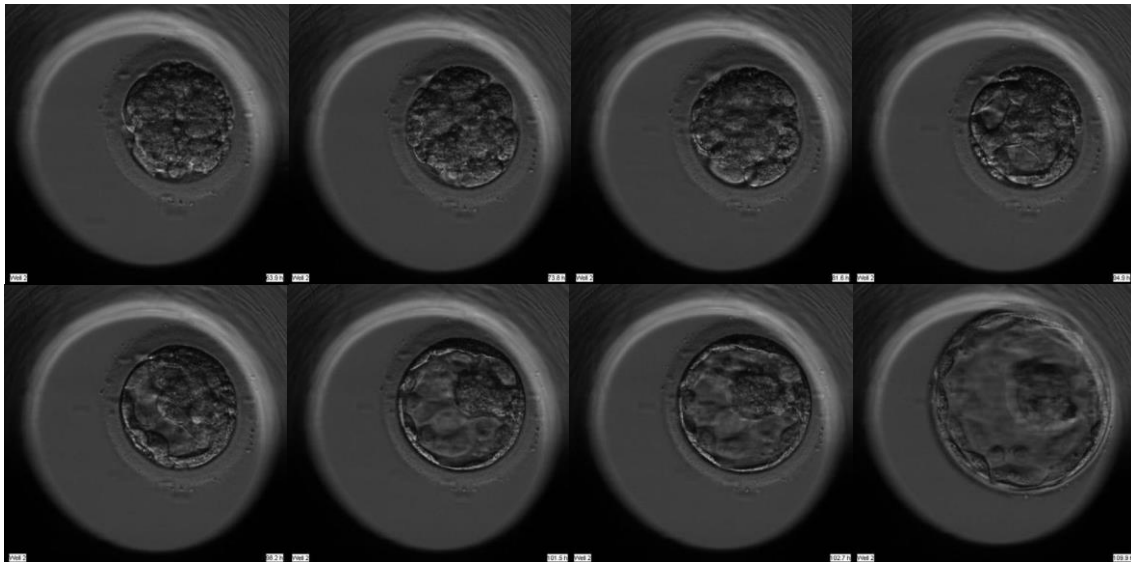
**Figura 31-** Representação de um embrião com a presença de agregados de retículo endoplasmático liso no citoplasma embrionário, evidenciando a presença de uma estrutura com aspeto distinto e granuloso do restante citoplasma (na parte média e do lado direito da imagem apresentada). A fotografia deste embrião foi captada às 30,6 hpi pelo EmbryoScope® (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Drezet, 2015.

A presença de fragmentos é, igualmente, considerada como um critério a ter em conta em qualquer método de avaliação embrionária, constituindo muitas vezes um critério de de-seleção de embriões. Apesar de a fragmentação aparecer comumente neste tipo de células (Trouson *et al.*, 1984 e Sathananthan *et al.*, 1990 em Alikani *et al.*, 1999), o seu nível de aceitação foi discutido e apresentado na convenção da Alpha e ESHRE (2011). Assim, foi acordado que um embrião morfológicamente competente para se desenvolver, em estado de clivagem, deve apresentar um nível de fragmentação de menos de 10%, sendo que qualquer embrião que apresente uma percentagem superior deve ser descartado e não considerado para transferência.

Os fragmentos podem estar presentes numa fase inicial de desenvolvimento ou, inversamente, aparecer em fases mais tardias, como na altura da compactação. Nesta fase, está descrito na literatura a ocorrência de dois destinos distintos para o embrião

que a apresenta: pode dar-se a continuação da presença dos fragmentos e a sua progressão celular ou, contrariamente, os mesmos podem desaparecer na passagem para o estado de blastocisto (Montgomery, 2015c).

Juriscova e colaboradores comentam num artigo publicado sobre este assunto que a fragmentação encontrada nos embriões pode ser fruto de uma tentativa de morte celular programada que, na sua ocorrência, possibilita a formação de pequenos fragmentos no citoplasma de embriões. Níveis elevados de fragmentação em embriões de terceiro dia, especialmente superiores a 35%, mostraram ter um papel prejudicial no desenvolvimento do embrião, verificando-se uma diminuição significativa da possibilidade de implantação e gravidez ( $P < 0,001$ ). A evolução de um episódio de desaparecimento de fragmentos celulares ao longo da formação do blastocisto pode ser determinada a partir da fotografia *time-lapse* (figura 32).



**Figura 32-** Representação de uma sequência de imagens captadas pelo EmbryoScope® correspondentes ao início da fase de blastulação e a evolução da fragmentação ao longo desta etapa, com aparecimento inicial ainda na etapa de mórula. Os tempos de ocorrência correspondentes são 63,9 horas, 73,8 hpi, 81,6 hpi, 94,9 hpi, 96,2 hpi, 101,5 hpi, 102,7 hpi e, por último, 109,9 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). É possível observar, para este caso em específico, a situação descrita anteriormente de diminuição da fragmentação, desde o estado de mórula até ao estabelecimento do estado de blastocisto. Adaptado de Montgomery, 2015a.

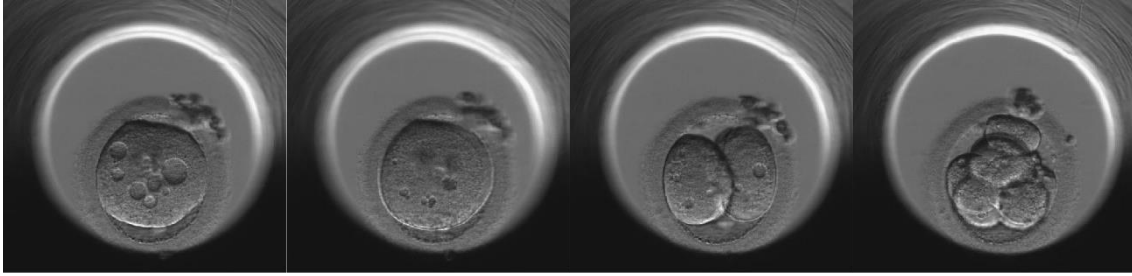
Por fim, uma característica marcante e de aparecimento não desejado corresponde à presença de vacúolos no citoplasma dos embriões. Por definição, os vacúolos são estruturas celulares anucleadas, formadas por fluído no seu interior e circundadas por uma membrana citoplasmática exterior, podendo ser formados por outros órgãos celulares, como o retículo endoplasmático e Complexo de Golgi ou, por outro lado, terem



origem independente dos mesmos e ocorrerem naturalmente no citoplasma dos embriões (Smith, 2015). Considerado como um dimorfismo citoplasmático no embrião, são conhecidos os vários aspetos prejudiciais da presença destas estruturas neste tipo de células, tendo sido reportados casos de diminuição de possibilidade de fertilização de tais embriões, decréscimo da qualidade embrionária e mesmo menor possibilidade de, com um embrião deste tipo, haver uma futura gravidez (Loutradis *et al.*, 1999 e Rienzi *et al.*, 2008 em Fancsovits *et al.*, 2011). Apesar de todas estas evidências negativas por parte da existência de vacúolos, especialmente se tiverem dimensões consideráveis (tamanho superior a 14  $\mu\text{m}$  são documentados como terem impedido a ocorrência de fertilização, Ebner *et al.*, 2005), Fancsovits e colaboradores reportaram um caso real, da própria clínica, em que, embriões de um casal que apresentavam algumas irregularidades (como uma zona pelúcida muito fina de oócitos produzidos por aquela mulher), incluindo a presença de vacúolos com tamanhos divergindo entre 29,2 e 61,0  $\mu\text{m}$ , foram transferidos e resultaram numa gravidez viável, mesmo com todas as hipóteses contra o sucesso deste ciclo.

Como referido, a presença de vacúolos com determinado tamanho pode contribuir para um impedimento da fertilização. As razões propostas para este *outcome* correspondem a uma modificação da posição normal ou da função do fuso acromático na altura de ocorrência da finalização da metáfase II ou a uma associação a uma alteração da estrutura do citoesqueleto da célula (Van Blerkom *et al.*, 1990 em Smith, 2015). Imagens capturadas através do sistema *time-lapse* EmbryoScope® revelam que a presença de vacúolos pode acontecer numa fase mais precoce ou mais tardia de desenvolvimento, podendo haver a possibilidade de monitorização completa do embrião que apresente vacúolos, desde a inseminação até etapas mais avançadas de progressão, de modo a investigar o destino dos embriões em questão.

Para além dos vacúolos poderem permanecer iguais ao longo do tempo em termos de tamanho e número, em alguns casos o contrário pode ser verificado para o mesmo embrião em fase de progressão. Para ilustrar esta última situação, a sequência de imagens (figura 33) captadas pelo *time-lapse* permite demonstrar precisamente esta situação.



**Figura 33-** Representação de uma sequência de imagens capturadas pelo EmbryoScope® evidenciando a evolução da presença de vacúolos ao longo do desenvolvimento do embrião nas fases iniciais de progressão embrionária. Às 20 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação) é possível observar a existência de vários vacúolos com tamanhos distintos, sendo que, cerca de duas horas depois (22,8 hpi) verifica-se a permanência inquestionável dos mesmos, embora com menor tamanho. No estado de dois blastómeros (29 hpi), os vacúolos persistem e continuam a evidenciar a sua presença, aparentemente, até ao estado de oito blastómeros, às 65,9 hpi. Adaptado de Smith, 2015.

Em suma, a avaliação morfológica ainda permanece como um critério fundamental e essencial na avaliação embrionária, aliando-se, assim, à análise detalhada do desenvolvimento temporal dos embriões monitorizados através do *time-lapse*.

Para além dos algoritmos de seleção atualmente existentes, é importante salientar que a reprodutibilidade e passagem inter-clínicas, com pacientes e métodos distintos, ainda constitui um desafio, de modo que é importante que os sistemas pré-existent sejam testados num *set* diferente de casos clínicos.

#### 4.7. *Single Embryo Transfer* (SET) e a sua relevância na reprodução humana assistida

Um dos principais objetivos correntes da aplicação da reprodução assistida em casos de infertilidade consiste no melhoramento de técnicas e métodos que permitam escolher “o” embrião, com o grande desafio de, com apenas este embrião de qualidade máxima, conseguir atingir uma gravidez viável (Milewski *et al.*, 2015).

Recorrendo a este sistema, é possível haver a escolha de biomarcadores significativos de desenvolvimento, próprios para a seleção do melhor embrião para transferência (Basile *et al.*, 2015). Consequentemente, este fator pode ser útil para a transferência de um único embrião (ou SET) visto que, geralmente, em tratamentos de reprodução humana assistida (RHA), poderá estar inerente a probabilidade de 3 a 5 % de ocorrência de uma gravidez múltipla (superior a dois descendentes) (Gerris, 2005), em transferências de dois ou mais embriões. O problema inerente a esta temática é o facto de poder levar a graves problemas de saúde, tanto para a progenitora como para a sua descendência, incluindo, entre outros tópicos, pré-eclampsia, anemia ou hipertensão gestacional e parto prematuro, anormalidades no desenvolvimento ou mesmo morte, respetivamente (Kovacs, 2014). A seleção de um único embrião será, assim, o modo indicado para evitar esta situação (Kirkegaard *et al.*, 2013) e a sua eleição está dependente de vários fatores de avaliação que têm que ser elegidos como os mais significativamente representativos e corretos.

O objetivo dos métodos de seleção abordados e de todo o conjunto de investigações relativas à procura de marcadores que se associem ao aumento de taxas de implantação e gravidez reside, precisamente, na maior incidência desta prática nas clínicas de tratamento de infertilidade, com o grande desafio de obter os mesmos índices de gravidez que se atingia com a transferência dupla de embriões e blastocistos (VerMilyea *et al.*, 2014). Esta técnica recente está a ser alvo de uma tendência crescente da sua utilização entre os centros de tratamento, tendo em vista futura a sua implementação como uma prática rotineira de transferência.

Recorrendo ao sistema *time-lapse*, é possível haver a escolha de biomarcadores significativos de desenvolvimento, mencionados na seção anterior, próprios para a seleção do melhor embrião para transferência (Basile *et al.*, 2015).

Deste modo, a ASRM (*American Society for Reproductive Medicine*) e a SART (*Society for Assisted Reproductive Technology*) (2017) definiu algumas normas para estabelecimento do número ideal de embriões em fase de clivagem ou blastocistos a serem transferidos para cada casal.

# Capítulo V

A criação de um Humano

## 5. Desenvolvimento embrionário humano

As técnicas de reprodução assistida mencionadas iniciam-se com a aplicação de protocolos de estimulação ovárica, que promovem a maturação dos folículos ovários, através de tratamento hormonal específico (ASRM, 2015), possibilitando a recolha de complexos cumulus-oócito por punção folicular (Gilbert e Ringer, 2003). Do mesmo modo, os espermatozóides do casal devem ser recolhidos, devidamente identificados e tratados, de modo a que, posteriormente, haja a realização do tratamento adequado para o casal em questão e, em última instância, a inseminação do oócito.

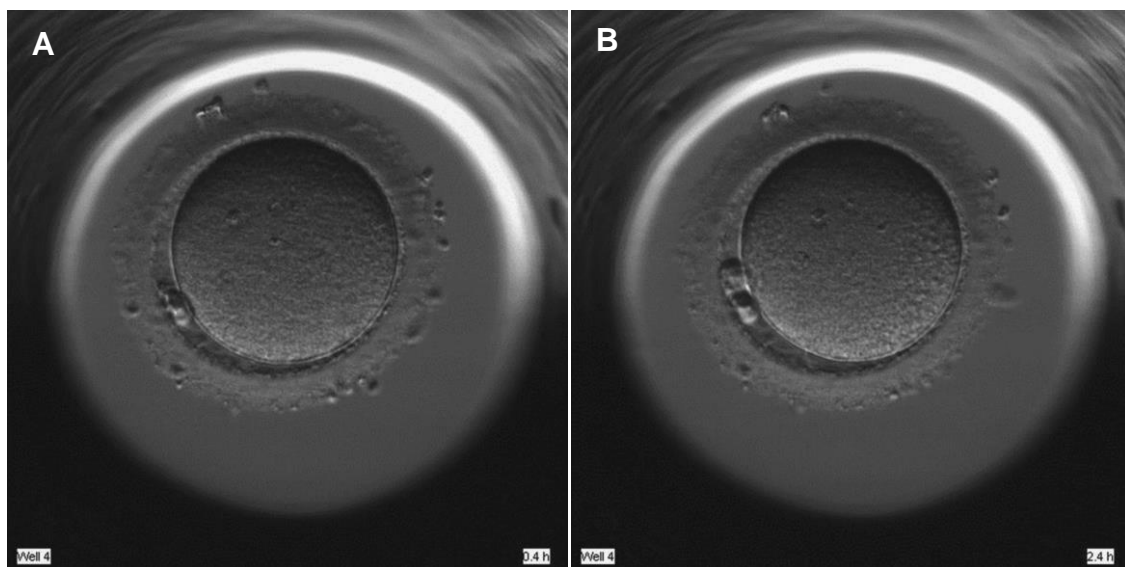
Os oócitos retirados por punção folicular apresentam-se, na maioria das vezes, com um conjunto de cromossomas em metáfase II e possuem, já nesta fase, o primeiro glóbulo polar resultante da primeira divisão meiótica (Rienzi *et al.*, 2012; Lynch e Regueira, 2015), como representado pela figura 34A.

No caso de FIV, o contacto entre o oócito e o espermatozóide constitui a primeira etapa do desenvolvimento embrionário, num processo designado por fertilização. Este compreende a perfuração da zona pelúcida e da membrana citoplasmática do oócito através de enzimas existentes na cabeça do espermatozóide, num acontecimento intitulado de reação acrossómica (Gilbert e Ringer, 2003). Este último processo mencionado é carregado de relevância biológica, já que conta com a perfuração da zona pelúcida do oócito a partir da ligação de glicoproteínas membranares<sup>18</sup> associadas a esta camada celular com proteínas presentes na cabeça dos espermatozoides (estes já capacitados ou móveis e aptos para perfuração do oócito), possibilitando a exocitose de vesículas acrossómicas que digerem a zona pelúcida e a sua membrana (Wassarman, 2008 em Ganguly *et al.*, 2010).

O processo de fertilização permite a finalização da segunda divisão meiótica (Kovačič e Vlaisavljević, 2012), de modo a que o oócito possua metade do número de cromossomas original. A metade restante dos cromossomas do oócito ficam retidos no segundo glóbulo polar (Nikas, 2016), cuja extrusão dá-se graças à finalização da divisão meiótica II, correspondente à ilustração 34B.

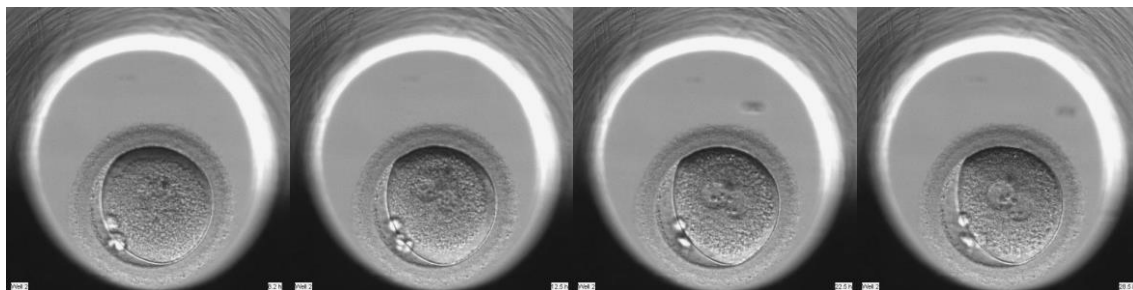
---

<sup>18</sup> Existem quatro tipos de glicoproteínas da zona pelúcida – ZP1, 2, 3 e 4- e está documentada como responsável pela ligação do oócito e do espermatozoide aquando da reação acrossómica a ZP3 (Van Duin *et al.*, 1994 em Ganguly *et al.*, 2010).



**Figura 34-** Representação do processo de extrusão do segundo glóbulo polar após finalização da segunda divisão meiótica induzida pela ocorrência da fertilização. No espaço de duas horas o ócito, constituído pelo primeiro glóbulo polar resultante da primeira divisão meiótica (a), passa de uma situação de paragem na segunda divisão meiótica (em prófase I) para a sua finalização, resultando num ócito com dois glóbulos polares (B). O par de imagens sequenciais foi captado pelo EmbryoScope®, em dois momentos distintos, às 0,4 hpi e 2,4 hpi (em que hpi corresponde a *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Lynch e Regueira, 2015.

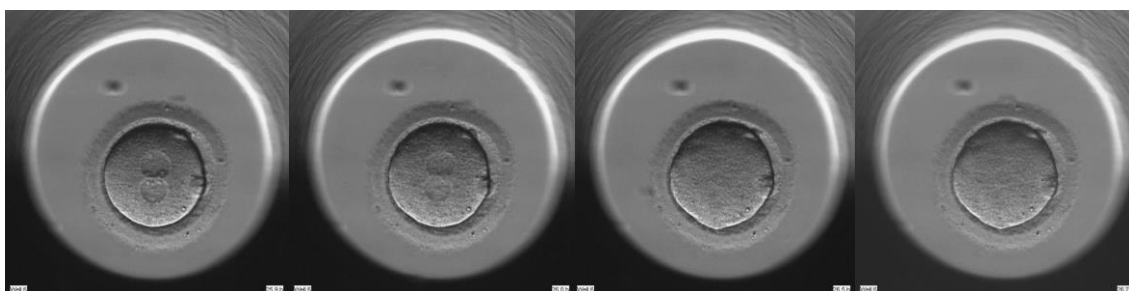
Após estes acontecimentos sucessivos dá-se o aparecimento, quase imediato a estes processos, do pronúcleo masculino, seguido da formação do feminino numa posição próxima do segundo glóbulo polar (Payne *et al.*, 1997). Nesta fase, estabelece-se a formação de um zigoto. A captação de imagens com intervalos de tempo curtos permitiu que, como ilustrado na figura 35, fossem captados todos os momentos contínuos de formação e aparecimento destas duas estruturas.



**Figura 35-** Ilustração do processo de aparecimento dos dois pronúcleos, feminino e masculino, após a ocorrência de fertilização. A extrusão do segundo glóbulo polar já ocorreu, igualmente, devido a este último processo. A sequência representada resultou da compilação de imagens captadas pelo EmbryoScope® em vários momentos do desenvolvimento embrionário (respetivamente às 8,2 hpi, 12,5 hpi, 22,5 hpi e 28,5 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Kellam e Murphy, 2015.

É possível observar pequenas estruturas celulares contidas no interior dos pronúcleos formados entretanto. A estas estruturas celulares dá-se o nome de corpos precursores de nucléolos (visíveis, igualmente, na figura 36), extremamente relevantes no desenvolvimento do embrião até à fase final de progressão e que reaparecem na altura da fertilização (ausentes durante a maturação do oócito). Para além da síntese de RNA ribossomal (rRNA) e de local de junção das duas subunidades ribossomais (maior e menor, para o processo de tradução proteica) em células somáticas, não se sabe ao certo, ainda, a totalidade de funções que estes apresentam para o embrião, no entanto é conhecido que estas estruturas, tal como o nome indica, são responsáveis pela formação dos nucléolos e são responsáveis, na fase seguinte de desenvolvimento, pela formação de rRNA (Kyogok *et al.*, 2014). Esta estruturas apresentam algumas oscilações de aparecimento, de tal forma que, depois do estado de duas células, só reaparecem no estado de mórula (Kyogok *et al.*, 2014).

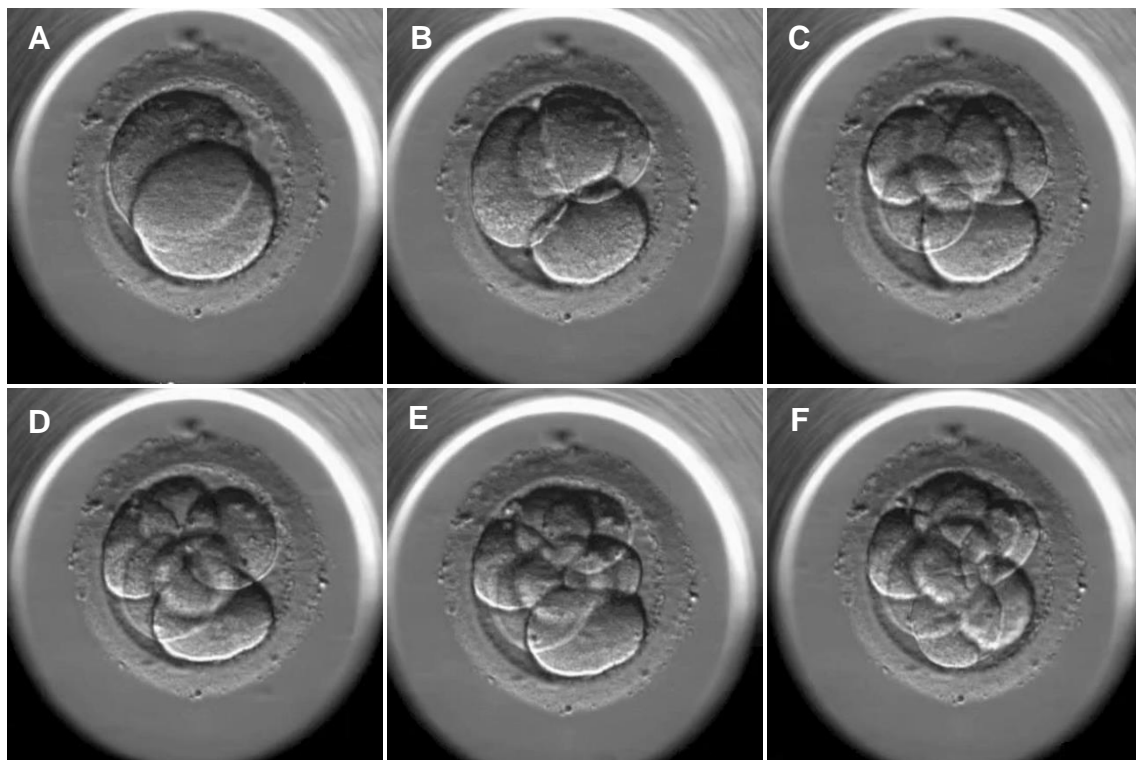
Observações de embriões feitas em curtíssimos intervalos de tempo, por Payne e colaboradores (1997), conseguiram captar a presença de granulações citoplasmáticas periódicas (em intervalos de 20 a 53 minutos), bem como o próximo passo, o processo de singamia, que consiste na deslocação do pronúcleo feminino para o centro do citoplasma e a sua junção posterior com o pronúcleo masculino. Consequentemente, a conjugação dos cromossomas paternos e maternos ocorre (Nikas, 2016), levando a uma etapa designada por desaparecimento pronuclear. A sequência destes eventos pode ser demonstrada com recurso ao *time-lapse*, como se verifica na figura 36.



**Figura 36-** Representação da evolução gradual do processo de desaparecimento pronuclear ou singamia, no qual se verifica a fusão dos dois pronúcleos, feminino e masculino. O embrião econtra-se, aquando da finalização deste fenómeno, em preparação para as sucessivas divisões celulares que se seguem. As fotografias foram obtidas pelo EmbryoScope®, representando quatro momentos sucessivos, incluindo a aproximação dos pronúcleos na zona equatorial do zigoto (às 25,9 hpi, em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação), o começo da fusão dos dois pronúcleos (às 26 hpi) e, por fim, as etapas finais de finalização da singamia e preparação para a primeira divisão mitótica (às 26,5 hpi e 26,7 hpi). Adaptado de Kellam e Murphy, 2015.

No desenvolvimento embrionário normal, formada a célula primordial do embrião, as próximas etapas de progressão baseiam-se em divisões mitóticas, consistindo o

primeiro ciclo celular (cc1) na divisão meridional da mesma em dois blastómeros iguais (Gilbert e Ringer, 2003), esta última etapa com *timing* equivalente ao parâmetro morfocinético t2 (figura 37A). Com a continuidade da progressão dos ciclos celulares, o número de células aumenta progressivamente e duplica nos primeiros dias, de modo que, graças à ocorrência do segundo ciclo celular (cc2), os dois blastómeros dividem-se em duas fases de eventos mitóticos (cc2a e cc2b), levando à formação do estado de quatro células (ocorrência equivalente ao parâmetro morfocinético t4), estado este ilustrado na figura 37B. A terceira divisão celular (cc3), constituída por quatro acontecimentos de mitose correspondentes a cada blastómero (cc3a, cc3b, cc3c e cc3d) permite a obtenção de um embrião com, respetivamente, cinco, seis, sete e oito blastómeros (figura 37C, D, E e F respetivamente), cujos timings de ocorrência são representados, respetivamente, por t5, t6, t7 e t8.

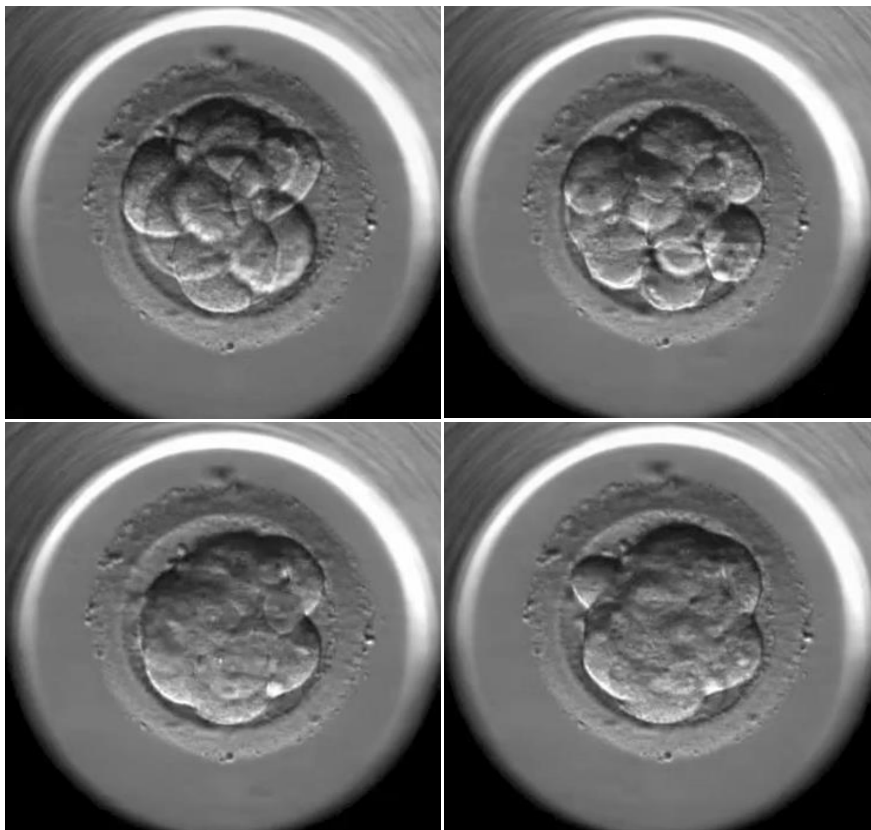


**Figura 37-** Sequência de imagens que traduz o contínuo desenvolvimento de um embrião, obtido por ICSI, em fase de clivagem, obtidas pelo EmbryoScope®. As letras A a E representam, respetivamente, as diferentes fases de clivagem, correspondendo a um embrião com dois, quatro, cinco, seis, sete e oito blastómeros. Por ordem cronológica, os parâmetros morfocinéticos correspondentes a cada fase são t2 de 26,5 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação), t4 de 41,3 hpi, t5 de 53,1 hpi, t6 de 55,3 hpi, t7 de 57,1 hpi e, por fim, t8 de 60,9 hpi. Adaptado de Campbell, 2015b.

Desta forma, ao terceiro dia após inseminação, um embrião com oito células deve ser expectado e, nesta fase, inicia-se um processo celular designado por compactação, que representa uma etapa essencial de mudança na junção dos blastómeros levando à



formação de um embrião coeso e com adesões reforçadas (Kovačič e Vlaisavljević, 2012). O processo de compactação, até ao estabelecimento de mórula (correspondente ao parâmetro morfocinético tM) e a continuidade das mudanças fisiológicas do embrião podem ser visualizadas na figura 38. Ao quarto dia pós-fertilização, este último processo dá-se por concluído e o embrião atinge um estado celular vulgarmente designado por mórula (último *frame* da figura 38 com tempo de ocorrência representado pelo parâmetro morfocinético absoluto tM).

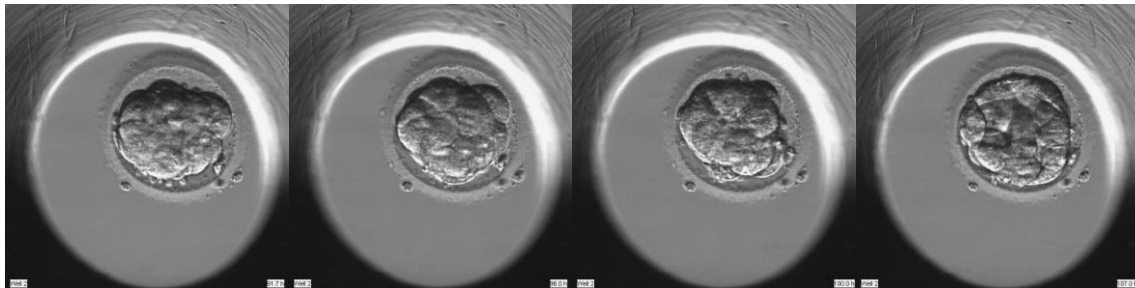


**Figura 38-** Representação do processo de compactação, associado aos parâmetros morfocinéticos de começo deste fenómeno celular (com tSC, em que SC corresponde a *start of blastulation*, de 60,9 hpi, em que hpi corresponde a *hours post-insemination* ou horas após inseminação) e estabelecimento do estado de mórula (com tM, em que M representa *Morula* ou mórula, de 86,9 hpi). As imagens foram obtidas a partir de uma sequência cinematográfica obtida pelo EmbryoScope®. Adaptado de Campbell, 2015b.

Um processo de máxima importância, conhecido por ocorrer nesta fase de desenvolvimento, entre o estado de quatro a dezasseis blastómeros, é a ativação do genoma embrionário. Consequentemente, todos os processos celulares até este ponto temporal eram essencialmente controlados geneticamente pelo genoma materno.

O contínuo desenvolvimento e divisão celular da mórula é seguido de um processo de cavitação, consistindo em processos de diferenciação e início de polarização

celulares (Gilbert e Ringer, 2003). Assim, este último processo compreende a formação de uma cavidade preenchida com fluído, blastocele, e a formação de uma fila de células periféricas, trofoectoderme (TE), e de uma massa de células não diferenciadas e pluripotentes no interior do embrião, a massa celular interna (MCI), estádios estes de desenvolvimento essenciais que contribuem para o começo da blastulação (equivalente ao parâmetro morfocinético tSB) e que, em última instância, têm como resultado final a formação de uma estrutura embrionária designada por blastocisto (Kovačič e Vlaisavljević, 2012). A progressão contínua desde tM até ao estabelecimento total do blastocisto, tB, compreendendo o processo de blastulação é apresentado pela seguinte sequência de imagens captadas pelo *time-lapse* (figura 39). Assim, ao quinto dia, esta estrutura é expectável de estar completamente estabelecida e, a cultura prolongada *in vitro* permite o seu desenvolvimento, de modo que, neste mesmo dia, pode ser realizada a transferência do mesmo para o útero.

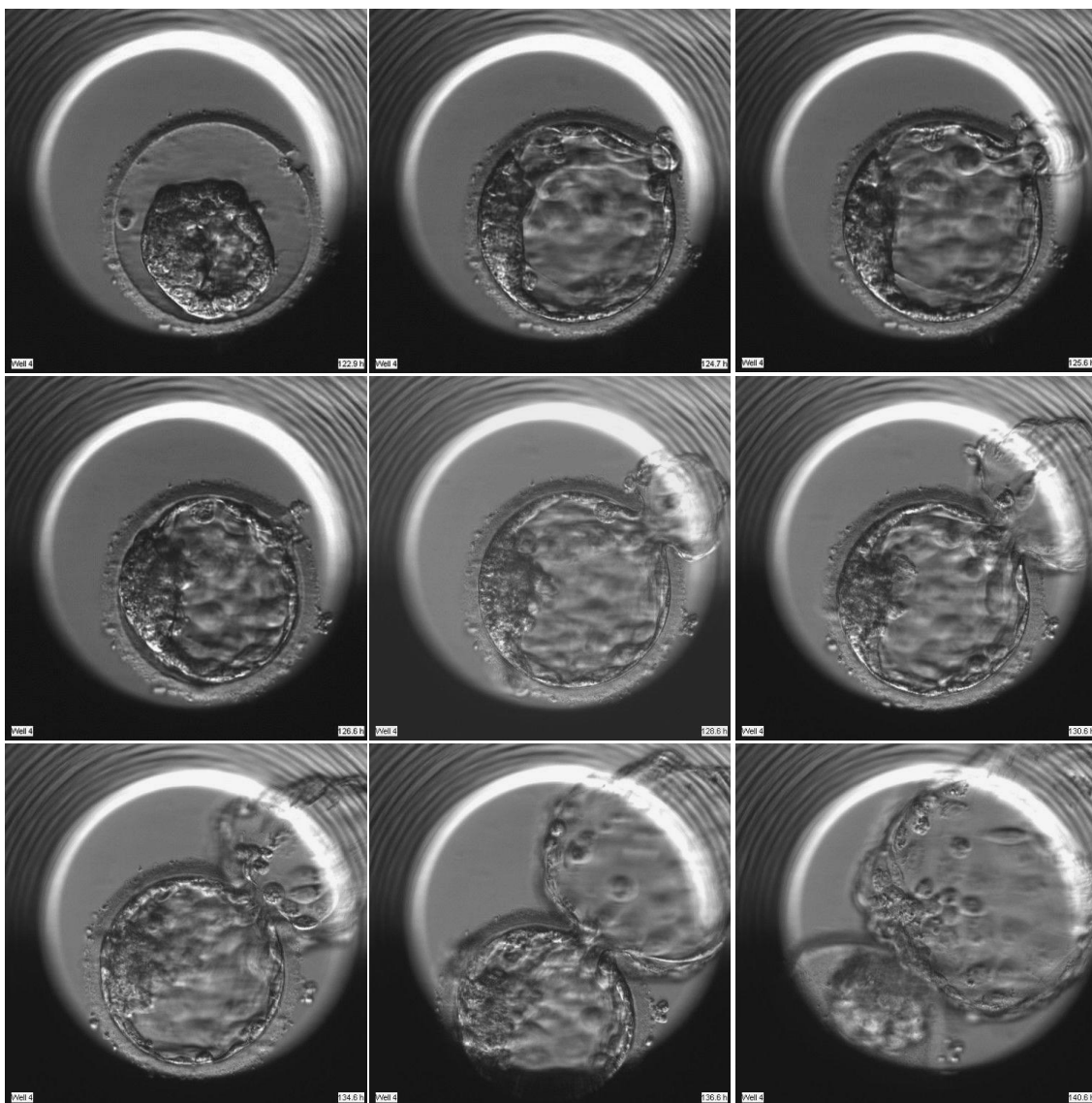


**Figura 39-** Representação sequencial da etapa inicial de blastulação, representativa da transição celular de mórula para blastocisto. É possível observar, gradualmente, o começo da diferenciação das camadas que constituem o blastocisto, trofoectoderme e massa celular interna e da expansão da cavidade blastocística. As imagens sequenciais foram captadas pelo EmbryoScope®, com começo às 91,7 hpi (em que hpi representa *hours post-isemination* ou horas após inseminação) e terminação às 107,0 hpi. Adaptado de Montgomery, 2015b.

O último passo de desenvolvimento corresponde à eclosão (ou *hatching*) do blastocisto. Segundo Sathanathan (2003), este processo peculiar conta com células especializadas, localizadas na camada da TE, que são os fatores biológicos responsáveis por todo este processo celular, visto que, contém microvilosidades e filamentos contráteis que entram em contacto com a zona pelúcida, assim como permitem o contacto de lisossomas que têm uma ação enzimática. Todos estes elementos permitem a criação de um espaço aberto na zona pelúcida, o mais longe possível da MCI, que, com a pressão contínua exercida pelo crescente aumento e expansão da cavidade do blastocele, constitua a zona de saída/libertação desta estrutura celular para o exterior Sathanathan (2003). É importante salientar que o processo de eclosão possui uma base molecular, de modo que é sugerido por Seshagiri *et al.* (2009) que a lise da zona pelúcida, em hamster, seja controlada por moléculas da

classe de citocinina (como o TGF-B) e outras moléculas, como fatores de transcrição (como o NFkB), proteases (catepsinas) e outros reguladores como ER alfa e COX-2 que se pensa constituírem prolongamentos da TE (TEPs ou *Trophectodermal Projections*) que promovem a lise da zona pelúcida e auxiliam a eclosão. No entanto, a transposição destes fatores para humanos não foi, até à data, confirmada, afirmando os mesmos autores que esta experiência constitui a ordenação de potenciais fatores de influência deste processo.

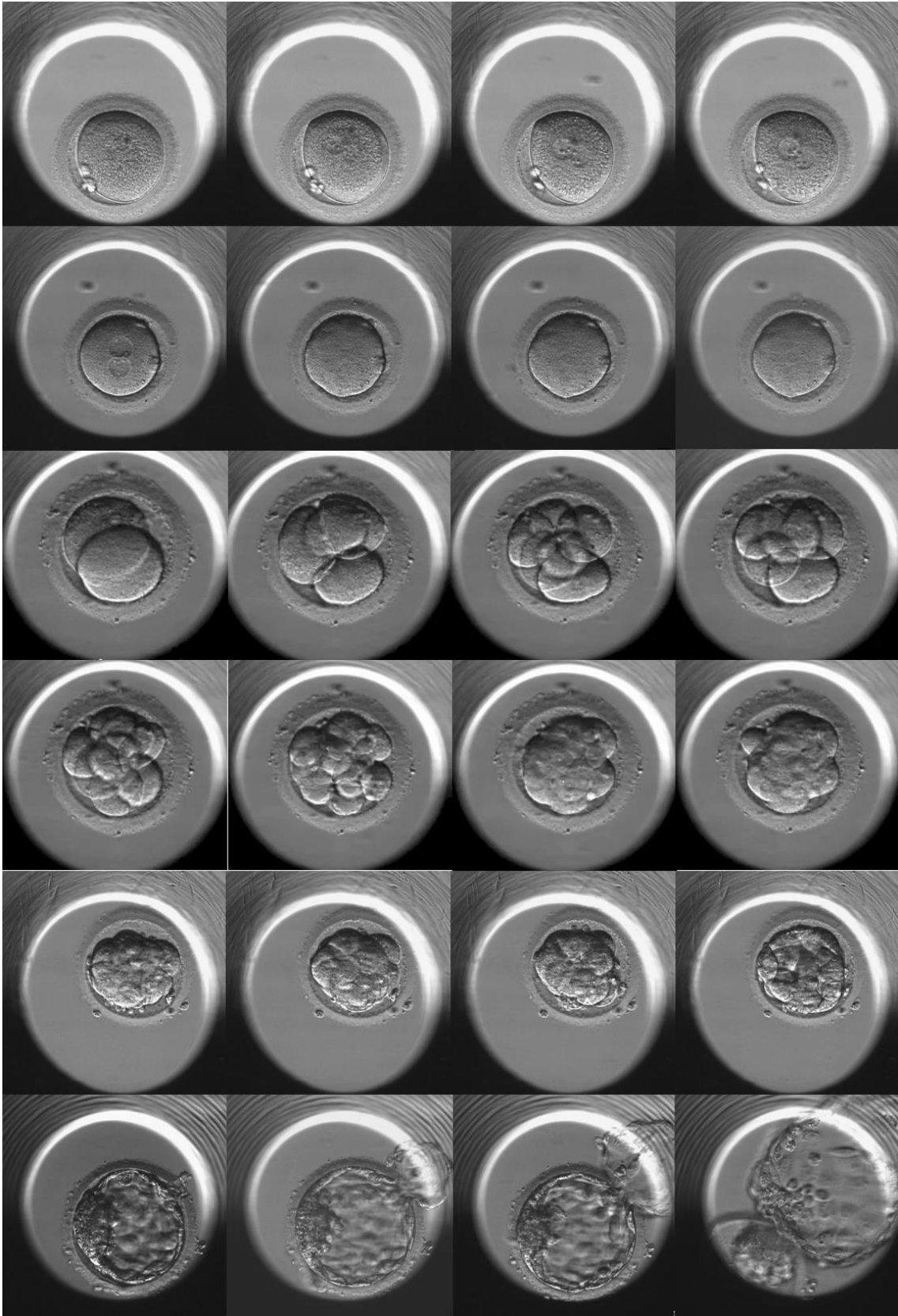
É possível observar a dinâmica temporal deste processo, desde a preparação do blastocisto para a eclosão até à sua finalização e saída/destacamento. Todos estes eventos estão representados na sequência captada pelo sistema *time-lapse* EmbryoScope® (figura 40).



**Figura 40-** Representação sequencial do processo de destacamento do blastocisto da zona pelúcida e sua posterior eclosão. Todas as imagens, desde a ruptura da zona pelúcida até ao começo da saída do blastocisto pela pressão exercida pela constante expansão da sua cavidade e da saída completa, foram obtidas através do sistema *time-lapse* EmbryoScope® num intervalo de tempo entre as 122,9 hpi e as 140,6 hpi (em que hpi representa *hours post-insemination* ou horas após inseminação). Adaptado de Kellam, 2015.

Se todas as imagens estáticas relativas ao desenvolvimento de um embrião com alta qualidade, como as que estão apresentadas nesta secção, forem conjugadas, é possível obter uma espécie de película de crescimento do embrião, relatando todos os eventos celulares possíveis de ocorrerem num padrão normal de desenvolvimento.

O sistema *time-lapse* efetua precisamente esta tarefa de uma forma automatizada, acelerando a velocidade de visualização e criando a ilusão de se tratar de um processo continuamente gravado. Em vez disso, cada imagem, captada por intervalos de tempo muito curtos corresponde a uma ilustração momentânea do momento em questão, momentos estes que constam na análise embrionária. Desta forma, a seguinte ilustração corresponde ao conjunto de todas as etapas de desenvolvimento, desde a fertilização até à eclosão do blastocisto.



**Figura 41-** Compilação das imagens anteriores com a finalidade de criar a ilusão da evolução temporal e ininterrupta do desenvolvimento embrionário, desde o processo de fertilização até à eclosão do blastocisto. Todas as imagens foram adquiridas e adaptadas de Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, Nova Iorque: CRC Press.

## Conclusão

Desta revisão bibliográfica contemplamos a panóplia de estudos importantes que documentam a utilização do *time-lapse* no estudo da embriologia humana e na sua aplicação em laboratórios de RHA. Desde cedo, o Homem revelou interesse na procura de técnicas de conseguissem revelar a curiosidade de ver o que não era possível, o desenvolvimento de um embrião humano. A cinematografia conduzida por nomes como Eadweard Muybridge e James Conandon marcou, não só a história do cinema aplicado à biologia animal, como também permitiu a crescente evolução de sistemas cada vez mais complexos, com o objetivo de ver “mais e melhor”.

Em relação à RHA na sociedade de hoje, a aceitação da ideia de “criar vida” *in vitro* ainda parece ser um assunto delicado, especialmente para os céticos, e muitas barreiras éticas ainda estão para ser quebradas, nomeadamente a adoção destas técnicas por casais homossexuais. No entanto, a legislação nacional referente à Lei n.º 17/2016, artigo 6º<sup>19</sup>, permite que qualquer mulher “... *independentemente do estado civil e da respetiva orientação sexual.*” pode recorrer a técnicas de RHA para atingir o seu objetivo principal, o de ter um descendente. Outro tema muito debatido recentemente inclui a utilização de barrigas de aluguer que levou à criação de uma lei (Lei n.º 6/2017<sup>20</sup>) que possibilita “... *o recurso à gestação de substituição... a título excepcional e com natureza gratuita, nos casos de ausência de útero e de lesão ou doença deste órgão que impeça de forma absoluta e definitiva a gravidez da mulher...*”. Ainda outros temas polémicos abordados recentemente levaram a uma exaltação da sociedade quando embriologistas do Reino Unido viajaram para o México para tratar de um embrião que apresentava uma doença mitocondrial severa, designada de síndrome de Leigh, cujas consequências podem incluir alterações neurológicas e mentais e atrofia do movimento. Assim, estes cientistas, através de um método pioneiro, conseguiram remover o núcleo do oócito e transferi-lo, intacto, para um oócito dador não afetado pela doença (com DNA mitocondrial normal)<sup>21</sup>.

Como referido, a tecnologia de *time-lapse* incorporou-se na embriologia humana no início do século XX e, a partir desse tempo, não parou de progredir. Vários foram os sistemas produzidos que permitem visualizar cada etapa de desenvolvimento do embrião e prever, como base nos tempos específicos das mesmas, a sua progressão e o seu desempenho *in vitro*. Apesar de alguma controvérsia apresentada na utilidade do

<sup>19</sup> Diário da República, 1.ª série- N.º 116- 20 de junho de 2016. Alteração referente à Lei n.º 32/2006 de 26 de julho.

<sup>20</sup> Diário da República, 1.ª série- N.º 146- 31 de julho de 2017

<sup>21</sup> Notícia publicada na BBC NEWS. Fonte: <http://www.bbc.com/news/health-37485263>, acessado a 4/8/2017.

*time-lapse* no melhoramento do sucesso das técnicas de reprodução humana assistida e de haver modelos baseados na morfocinética que pretendem prever precocemente a progressão do embrião, como o de Meseguer *et al.* (2011), ainda permanece na comunidade científica o desafio de ultrapassar alguns obstáculos, como propõe Milewski *et al.* (2015) na produção de modelos para prever a possibilidade de implantação e da taxa de nascimentos viáveis.

O objetivo primordial deste trabalho, consistiu, igualmente, na descrição de toda a temática associada ao *time-lapse*, contemplando o uso da morfocinética e demonstrando a sua aplicação em casos de publicações e de sucesso de reconhecimento científico. Assim, foi demonstrada, de uma maneira geral, as vastas potencialidades e os muitos benefícios que este género de sistema pode oferecer à área de reprodução humana assistida.

Ao longo de todo este percurso, foi possível perceber que todas as contribuições de embriologistas nesta área têm um papel fundamental e essencial com a finalidade de perceber quais as mudanças principais que o embrião humano sofre, criar técnicas que permitem a sua observação detalhada e contínua e, acima de tudo, compreender a dinâmica adequada de desenvolvimento para prevenir nascimentos de bebés com malformações. O avanço da tecnologia é inegável e, aliado ao mesmo, os métodos de observação embrionária acompanham esta evolução, com apenas um objetivo em vista: dar ao grupo de casais inférteis uma nova oportunidade de ter o tão desejado filho/a e, de preferência, que este/a seja viável e nasça saudável.

## Referências bibliográficas

Agarwal, A. (2005). Oxidative stress and its implications in female infertility – a clinician’s perspective. *Reproductive biomedicine online*, 11 (5): 641-650.

Alikani, M.; Cohen, J.; Tomkin, G.; Garrisi, J.; Mack, C.; Scott, R. T. (1999). Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and sterility*, 71 (5): 836-842.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine; ESHRE Special Interest Group of Embryology. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human reproduction*, 26 (6): 1270–1283.

American Society for Reproductive Medicine (2004). Smoking and infertility. *Fertility and sterility*, 81 (4): 1181- 1186.

American Society for Reproductive Medicine (2012). Infertility: na overview. Disponível em [https://uams-wpengine.netdna-ssl.com/upload/docs/Clinics/OB-GYN/ASRM%20infertility\\_overview.pdf](https://uams-wpengine.netdna-ssl.com/upload/docs/Clinics/OB-GYN/ASRM%20infertility_overview.pdf). (27 de agosto de 2017).

American Society for Reproductive Medicine (2015). Assisted Reproductive Technology- A Guide for Patients. Disponível em: [https://www.asrm.org/BOOKLET\\_Assisted\\_Reproductive\\_Technologies/](https://www.asrm.org/BOOKLET_Assisted_Reproductive_Technologies/). (22 dezembro 2016).

Armstrong, S.; Arroll, N.; Cree, L. M.; Jordan, V.; Farquhar, C. (2015). *Time-lapse* systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *CochraneDatabase of Systematic Reviews*, 2. doi: 10.1002/14651858.CD011320.pub2.

Armstrong, S.; Vail, A.; Mastenbroek, S.; Jordan, V.; Farquhar, C. (2015). *Time-lapse* in the IVF-lab: how should we assess potential benefit? *Human reproduction*, 30 (1): 3-8.

Austin, C. R. (1951), Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Australian journal of scientific research*, 4 (4): 581-596.



Baczowski, T.; Kurzawa, R.; Glabowski, W. (2004). Methods of embryo scoring in *in vitro* fertilization. *Reproductive biology*, 4 (1): 5-22.

Baczowski, T.; Kurzawa, R.; Glabowski, W. (2004). Methods of embryo scoring in *in vitro* fertilization. *Reproductive biology*, 4 (1): 5-22.

Baird, D. T.; Collins, J.; Egozcue, J.; Evers, L. H.; Gianaroli, L.; Leridon, H. Sunde, A.; Templeton, A.; Van Steirteghem, A.; Cohen, J.; Crosignani, P. G.; Devroey, P.; Diedrich, K.; Fauser, L.; Glasier, A.; Liebaers, I.; Mautone, G.; Penney, G.; Tarlatzis, B.; ESHRE Capri workshop group. (2005). *Human reproduction update*, 11 (3): 261-276.

Basile, N.; Vime, P.; Florensa, M.; Ruiz, B. A.; Velasco, J. A. G.; Remohí, J.; Meseguer, M. (2015). The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Human reproduction*, 30 (2): 276-283.

Bavister, B. D. (2002). Early history of *in vitro* fertilization. *Reproduction*, 124: 181-196.

Best, L. (2015) Equipment Required for Time Lapse Observations in *In Vitro* Fertilization em Campbell, A.; Fishel, S., eds, *Atlas of Time Lapse Embryology*, New York: CRC Press, 1-6.

Berrisford, K.; Cater, E. (2015). Irregular cleavages em Campbell, A.; Fishel, S., eds, *Atlas of time lapse embryology*, New York: CRC Press, 65-68.

Bishop, R. (2010). Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience horizons*, 3 (1): 85-95.

Bonah, C.; Laukötter, A. (2009). Moving pictures and medicine in the first half of the 20th century: some notes on international historical developments and the potential of medical film research. *Gesnerus*, 66: 121-146.

Braude, P.; Pickering, S.; Flinter, F.; Ogilvie, C. M. (2002). Preimplantation genetic diagnosis. *Nature reviews genetics*, 3: 941-953.

Breithaupt, H. (2002). Rhythm 'n' biology. *EMBO reports*, 3 (9): 813 -815.

Bulleti, C.; Coccia, M. E.; Battistoni, S.; Borini, A. (2010). Endometrisis and infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27 (8): 441-447.

Campbell, A.; Fishel, S.; Bowman, N.; Duffy, S.; Sedler, M.; Thornton, S. (2013). Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reproductive biomedicine online*, 27 (2): 140-146.

Campbell, A. (2015a) Clinical Aspects of Time lapse imaging em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of Time Lapse Embryology, New York: CRC Press, 7-11.

Campbell, A. (2015b) Time Lapse, the Cell Cycle, Distribution of Morphokinetic Timings, and Known Implantation Data em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of Time Lapse Embryology, New York: CRC Press, 13-17.

Chen, A. A.; Tan, L.; Suraj, V.; Pera, R. R.; Shen, S. (2013). Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertility and sterility*, 99 (4): 1035- 1043.

Cruz, M.; Gadea, B.; Garrido, N.; Pedersen K. S.; Martínez, M.; Pérez-Cano, I.; Muñoz, M.; Meseguer, M. (2011). Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by *time-lapse* imaging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28 (7): 569-573.

Cruz, M.; Garrido, N.; Herrero, J.; Pérez-Cano, I.; Muñoz, M.; Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive biomedicine online*, 25 (4): 371-381.

Desai, N.; Ploskonka, S.; Goodman, L. R.; Austin, C.; Goldberg, J.; Falcone, T. (2014). Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous *time-lapse* monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive biology and endocrinology*, 12: 54.

De Vos, A.; Van Steirteghem, A. (2001). Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis. *Prenatal diagnosis*, 21 (9): 767-780.

Devroey, P.; Steirteghem, A. V. (2004). A review of ten years experience of ICSI. *Human reproduction update*, 10 (1): 19-28.

Drezet, C. (2015). Smooth endoplasmic reticulum clusters em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, New York: CRC Press, 71-73.

Ebner, T.; Moser, M.; Sommergruber, M.; Gaiswinkler, U.; Shebl, O.; Jesacher, K.; Tews, G. (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and sterility*, 83 (6): 1635-1640.

Edwards, R. G.; Steptoe, P. C. (1983). Current status of in-vitro fertilisation and implantation of human embryos. *Lancet*, 2: 1265-1269.

Ergin, E. G.; Çalışkan, E.; Yalçinkaya, E.; Öztel, Z.; Çökelez, K.; Özay, A.; Özörnek, H. M. (2014). Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertility and sterility*, 102 (4): 1029-1033.e1.

ESCO medical (2017) Miri TL- time lapse incubator for IVF. Disponível em: <http://www.escoglobal.com/products/download/art-equipment-miri-tl-brochure-vc-lr.pdf>. (3 janeiro 2017).

Feuer, S.; Rinaudo, P. (2012). Preimplantation Stress and Development. Birth defects research. *Part C, Embryo Today*, 96 (4): 299-314.

Fisch, J. D.; Sher, G.; Adamowicz, M.; Keskintepe, L. (2003). The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertility and sterility*, 80 (6): 1352-1358.

Fragouli, E.; Alfarawti, S.; Daphnis, D. D.; Goodall, N. N.; Mania, A.; Griffiths, T.; Gordon, A.; Wells, D. (2011). Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Human reproduction*, 26 (2): 480-490.

Fréour, T.; Le Fleuter, N.; Lammers, J.; Spingart, C.; Reignier, A.; Barrière, P. (2015). External validation of a *time-lapse* prediction model. *Fertility and sterility*, 103 (4): 917- 922.

Frischknecht, F.; Gunzer, M.; Shorte, S. L. (2009). Retrospective: Birth of the cool - imaging and microbiology from Ibn al-Haytham to Jean Comandon. *Biotechnology journal*, 4 (6): 787-790.

Ganguly, A.; Sharma, S. K.; Gupta, S. K. (2008). Bonnet monkey (*Macaca radiata*) ovaries, like human oocytes, express four zona pelúcida glycoproteins. *Molecular reproduction and development*, 75 (1): 156-166.

Ganguly, A.; Bansal, P.; Gupta, T.; Gupta, S. K. (2010). 'ZP domain' of human zona pellucida glycoprotein-1 binds to human spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Reproductive biology and endocrinology*, 8: 110.

Gardner, D. K. (1994). Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell biology internacional*, 18 (12): 1163-1180.

Gardner, D. K.; Lane, M. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?. *Human reproduction update*, 3 (4): 367-382.

Gardner, D. K.; Vella, P.; Lane, M.; Wagley, L.; Schlenker, T.; Schoolcraft, W. B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and sterility*, 69 (1): 84-88.

Gardner, D. K.; Balaban, B. (2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important?. *Molecular human reproduction*, 22 (10): 704-718.

Gardner, D. K.; Phil, D.; Vella, P.; Lane, M.; Wagley, L.; Schlenker, T.; Schoolcraft, W. B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and sterility*, 69 (1): 84-88.

Genea BIOMEDX Pty Ltd. Geri user manual. Patente australiana de aplicação No. QFRM422-11.

Gerris, J. M. (2005). Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Human reproduction update*, 11 (2): 105-121.

Gianaroli, L.; Magli, M. C.; Ferraretti, A. P.; Fiorentino, A.; Garrisi, J.; Munné, S. (1997). Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertility and sterility*, 68 (6): 1128-1131.

Gilbert, S. E.; Ringer, S. R. (2003). *Biologia do Desenvolvimento*. Fundação Calouste Gulbenkian, tradução Catarina Prista, Lisboa.

Gilbert, R. S.; Nunez, B.; Sakurai, K.; Fielder, T.; Ni, H.-T. (2016). Genetic mouse embryo assay: improving performance and quality testing for assisted reproductive technology (ART) with a functional bioassay. *Reproductive biology and endocrinology*, 14: 13.

Gnoth, C.; Godehardt, E.; Frank-Hermann, P.; Friol, K.; Tiggers, J.; Freundl, G. (2005). Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Human reproduction*, 20 (5): 1144- 1147.

Gonzales, D. S.; Pinheiro, J. C.; Bavister, B. D. (1995). Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle. *Journal of reproduction and fertility*, 105 (1): 1-8.

Goodman, L. R.; Goldberg, J.; Falcone, T.; Austin, C.; Desai, N. (2016). Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertility and sterility*, 105 (2): 275-285.e10.

Gosden, R. G.; Hunter, R. H. F.; Telfer, E.; Torrance, C.; Brown, N. (1988). Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *Journal of reproduction and fertility*, 82 (2): 813-825.

Gozzetti, A.; La Beau, M. M.; (2000). Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. *Seminars in hematology*, 37 (4): 320-333.

Grisart, B.; Massip, A.; Dessy, F. (1994). Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *Journal of reproduction and fertility*, 101 (2): 257-264.

Gouyon, J. (2016). Science and film-making. *Public understanding of science*, 25 (1): 17-30.

Hardarson, T.; Caisander, G.; Sjögren, A.; Hanson, C.; Hamberger, L.; Lundin, K. (2003). A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Human reproduction*, 18 (2): 399-407.

Handyside, A. H.; Kontogianni, E. H.; Hardy, K.; Winston, R. M. (1990). Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344 (6268): 768-770.

Harton, G. L.; Magli, M. C.; Lundin, K.; Montag, M.; Lemmen, J.; Harper, J. C. (2011). ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human reproduction*, 26 (1): 41-46.

Herrero, J.; Meseguer, M. (2013). Selection of high potential embryos using *time-lapse* imaging: the era of morphokinetics. *Fertility and sterility*, 99 (4): 1030-1034.

Herrero, J.; Tejera, A.; Albert, C.; Vidal, C.; de los Santos, M. J.; Meseguer, M. (2013). A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertility and sterility*, 100 (6): 1602-1609.e4.

Hugues, J.-N.; Cédric-Durnerin, I. (2009) Endocrine characteristics of ART cycles. Em Gardner, D. K.; Weissman, A.; Howles, C. M.; Shoham, Z., eds, Reproductive technologies Laboratory and clinical perspectives. 3ª edição, informa healthcare, Reino Unido, 511-527.

Hulme, D. (2015). Reverse cleavage/blastomere fusion em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, New York: CRC Press, 69-70.

Juriscova, A.; Varmuza, S.; Casper, R. F. (1996). Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular human reproduction*, 2 (2): 93-98.

Kabisch, M.; Ruckes, C.; Seibert-Grafe, M.; Blettner, M. (2011). Randomized control trials. *Deutsches ärzteblatt international*, 108 (39): 663–668.

Kamel, R. M. (2013). Assisted Reproductive Technology after the birth of Louise Brown. *Journal of reproduction and infertility*, 14 (3): 96-109.

Kaser, D. J.; Racowsky, C. (2014). Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with *time-lapse* monitoring: a systematic review. *Human reproduction update*, 20 (5): 617–631.

Kellam, L.; Murphy, L. (2015). Fertilization: Pronuclear Formation and Fading em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, New York: CRC Press, 25-32.

Kellam, L. (2015) Hatching of the human blastocyst em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, New York: CRC Press, 59-64.

Kieslinger, D. C.; De Gheselle, S.; Lambalk, C. B.; De Sutter, P.; Kosteljik, E. H.; Twisk, J. W. R.; van Rijswijk, J.; Van den Abbeel, E.; Vergouw, C. G. (2016). Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Human reproduction*, 31 (11): 2450-2457.

Kirkegaard, K.; Agerholm, I. E.; Ingerslev, H. J. (2012). *Time-lapse* monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human reproduction*, 27 (5): 1277-1285.

Kirkegaard, K.; Kesmodel, U. S.; Hindkjær, J. J.; Ingerslev, H. J. (2013). *Time-lapse* parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Human reproduction*, 28 (10): 2643-2651.

Kirkegaard, K.; Sundvall, L.; Erlandsen, M.; Hindkjær, J. J.; Knudsen, U. B.; Ingerslev, H. J. (2015). Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Human reproduction*, 31 (2): 324-331.

Kligman, I.; Benadiva, C.; Alikani, M.; Munné, S. (1996). The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Human reproduction*, 11 (7): 1492-1498.

Knight, P. G.; Glister, C. (2006). TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132 (2): 191-206.

Kong, X.; Yang, S.; Gong, F.; Lu, C.; Zhang, S.; Lu, G.; Lin, G. (2016). The Relationship between Cell Number, Division Behavior and Developmental Potential of Cleavage Stage Human Embryos: A *Time-lapse* Study. *PLoS One*, 11 (4): e0153697.

Kovačič, B.; Vlaisavljević, V. (2012). Importance of Blastocyst Morphology in Selection for Transfer, In: Wu, B. *Advances in Embryo Transfer, In Tech*, disponível em: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-embryo-transfer/importance-of-blastocyst-morphology-inselection-for-transfer>.

Kovacs, P. (2014). Embryo selection: the role of *time-lapse* monitoring. *Reproductive biology and endocrinology*, 12: 124.

Kumar, N.; Singh, A. K. (2016). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: a review of literature. *Journal of human reproductive sciences*, 8 (4): 191-196.

Kyogoku, H.; Kitajima, T. S.; Miyano, T. (2014). Nucleolus Precursor Body (NPB): a distinct structure in mammalian oocytes and zygotes. *Nucleus*, 5 (6): 493-498.

La Fianza, A.; Dellafore, C.; Travaini, D.; Broglia, D.; Gambini, F.; Scudeller, L.; Tinelli, C.; Caverzasi, E.; Brondino, N. (2014). Effectiveness of a single education and counseling intervention in reducing anxiety in women undergoing hysterosalpingography: a randomized controlled trial. *The scientific world journal*, 2014: 1-7.

Lagalla, C.; Barberi, M.; Orlando, G.; Sciajno, R.; Bonu, M. A.; Borini, A. (2015). A quantitative approach to blastocyst quality evaluation: morphometric analysis and related IVF outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32 (5): 705-712.

Landecker, H. (2005). Cellular features: microcinematography and film theory. *Critical inquiry*, 31: 903-937.

Landecker, H. (2006). Microcinematography and the history of science and film. *Isis*, 97 (1): 121-132.



Landecker, H. (2009). Seeing things: from microcinematography to live cell imaging. *Nature methods*, 6 (10): 707-709.

Landecker, H. (2012). The life of movement: from microcinematography to live-cell imaging. *Journal of visual culture*, 11: 378-399.

Lanska, D. J. (2016). The Dercum-Muybridge Collaboration and the Study of Pathologic Gaits Using Sequential Photography. *Journal of the History of the Neurosciences*, 25 (1): 23-28.

Lefebvre, T. (2003). Jean Comandon et les débuts de la microcinématographie. *La revue du praticien*, 53: 1502-1505.

Lewis, W. H.; Gregory, P. W. (1929). Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 69 (1782): 226-229.

Lichter, P.; Joos, S. (1996). Non-isotopic In situ Hybridization to Metaphase Chromosomes and Interphase Nuclei. EMBO practical course at the german cancer research center.

Liu, J.; Van den Abbeel, E.; Van Sterirteghem, A. (1993). The in-vitro and in-vivo developmental potential of frozen and non-frozen biopsied 8-cell mouse embryos. *Human reproduction*, 8 (9): 1481-1486.

Liu, Y.; Chapple, V.; Feenan, K.; Roberts, P.; Matson, P. (2015b). Clinical significance of intercellular contact at the four-cell stage of human embryos, and the use of abnormal cleavage patterns to identify embryos with low implantation potential: a time-lapse study. *Fertility and sterility*, 103 (6): 1485-1491.e1.

Liu, Y.; Copeland, C.; Stevens, A.; Feenan, K.; Chapple, V.; Myssonski, K.; Roberts, P.; Matson, P. (2015a). Assessment of human embryos by time-lapse videography: A comparison of quantitative and qualitative measures between two independent laboratories. *Reproductive biology*, 15 (4): 210-216.

Loutradis, D.; Drakakis, P.; Kallianidis, K.; Milingos, S.; Dendrinou, S.; Michalas, S. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility*, 72 (2): 240-244.

Ly, K. D.; Agarwal, A.; Nagy, Z. P. (2011). Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28 (9): 833-849.

Lynch, C.; Rigueira, M. (2015). "Polar-Body Extrusion" in Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of Time Lapse Embryology, New York: CRC Press, 21-24.

Mandawala, A. A.; Harvey, S. C.; Roy, T. K.; Fowler, K. E. (2016). Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: Towards a general characterisation of embryogenesis. *Animal reproduction science*, 174: 2-10.

Meseguer, M.; Herrero, J.; Tejera, A.; Hilligsøe, K. M.; Ramsing, N. B.; Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction*, 26 (10): 2658-2671.

Meseguer, M. 2016, eds, Time-lapse microscopy in In-Vitro fertilization, Cambridge university press, Reino Unido.

Michaelis, A. R. (1966). E. J. Marey- physiologist and first cinematographer. *Medical history*, 10 (2): 201-203.

Milewski, R.; Kuć, P.; Kuczyńska, A.; Stankiewicz, B.; Łukaszuk, K.; Kuczyński, W. (2015). A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32 (4): 571-579.

Montag, M.; van der Ven, K.; van der Ven, H. (2009). Polar body biopsy em Harper, J. C. (eds). Preimplantation genetic diagnosis, Universidade Cambridge Press, 160-174.

Montag, M. (2015). How a decision support tool based on known implantation data can enhance embryo selection. Vitrolife, disponível em <http://blog.vitrolife.com/togetheralltheway/how-a-decision-support-tool-based-on-known-implantation-data-can-enhance-embryo-selection>. (4 de setembro de 2017).

Montag, M. (2016). *Time-lapse imaging: why are there so few randomized controlled trials?. Journal of Fertilization: in vitro, reproductive medicine, genetics & stem cell biology*, 4 (2): e123.

Montgomery, S. (2015a). Clinical results: dynamic aspects- fragmentation em Campbell, A.; Fishel, S., eds, *Atlas of time lapse embryology*, New York: CRC Press, 33-37.

Montgomery, S. (2015b). Dynamic aspects: compaction em Campbell, A.; Fishel, S., eds, *Atlas of time lapse embryology*, New York: CRC Press, 43-48.

Montgomery, S. (2015c). Blastulation em Campbell, A.; Fishel, S., eds, *Atlas of time lapse embryology*, New York: CRC Press, 49-57.

Munné, S.; Alikani, S.; Grifo, J.; Cohen, J. (1994). Monospermic polyploidy and atypical embryo morphology. *Human reproduction*, 9: 506-510.

Munné, S.; Sultan, K. M.; Weier, H. U.; Grifo, J. A.; Cohen, J.; Rosenwaks, Z. (1995). Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in pre-implantation human embryos before transfer. *American journal of obstetrics and gynecology*, 172 (4 Part1): 1191-1199.

Muybridge, E. (1887). *Animal locomotion: an electro-photographic investigation of consecutive phases of animal movements, 1872–1885*, Universidade da Pensilvânia.

Nikas, Y. (2016). *The Reproductive System*. Em Sherwood, L., eds, *Human Physiology- From Cells to Systems*, Graphic World Inc, Canada, 754.

Nikon. (2017). BioStation CT Cell culture observation system. Disponível em [https://www.nikoninstruments.com/en\\_EU/Products/Live-Cell-Screening-Systems/BioStation-CT](https://www.nikoninstruments.com/en_EU/Products/Live-Cell-Screening-Systems/BioStation-CT). (7 de setembro de 2017).

Payne, D.; Flaherty, S. P.; Barry, M. F.; Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using *time-lapse video cinematography*. *Human reproduction*, 12 (3): 532–541.

Pellestor, F. (1995). The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos. *Human reproduction update*, 1 (6): 581-585.

Polis, C. B.; Cox, C. M.; Tunçalp, Ö.; McLain, A. C.; Thoma, M. E. (2017). Estimating infertility prevalence in low-to-middle-income countries: an application of a current duration approach to Demographic and Health Survey data. *Human reproduction*, 32 (5): 1064-1074.

Progyny. Dezembro, 2016. Eeva™: Instructions for use. Eeva™ System 3.0 Model: EVS3000. Patente europeia de aplicação No. IFU 3600 RevA.

Pruitt, S (2014). The Lumière brothers, pioneers of cinema. History stories. Disponível em <http://www.history.com/news/the-lumiere-brothers-pioneers-of-cinema> (a 5 de setembro de 2017).

Rienzi, L.; Ubaldi, F. M.; Lacobelli, M.; Minasi, M. G.; Romano, S.; Ferrero, S.; Sapienza, F.; Baroni, E.; Litwicka, K.; Greco, E. (2008). Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and sterility*, 90 (5): 1692-1700.

Rienzi, L.; Balaban, B.; Ebner, T.; Mandelbaum, J. (2012). "The oocyte", em Magli, M.; C.; Jones, G. M.; Lundin, K.; Van den Abbeel, E. Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos, *Human reproduction*, 27, Suppl. 1: i1. doi: 10.1093/humrep/des229.

Rienzi, L.; Capalbo, A.; Stoppa, M.; Romano, S.; Maggiulli, R.; Albricci, L.; Scarica, C.; Farcomeni, A.; Vajta, G.; Ubaldi, F. M. (2015). No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: a longitudinal cohort study. *Reproductive biomedicine online*, 30 (1): 57-66.

Ries, J. (1910). Chronophotographie de la fécondation et de la segmentation. *Travaux de l'Association de l'Institut Marey*, 2: 225-228.

Rock, J.; Menkins, M. F. (1944). In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Science*, 100 (2598): 105-107.

Roupa, Z.; Polikandrioti, M.; Sotiropoulou, P.; Faros, E.; Koulouri, A.; Wozniak, G.; Gourni, M. (2009). Causes of infertility in women at reproductive age. *Health science journal*, 3 (2): 80-87.

Rubio, I.; Gálan, A.; Larreategui, Z.; Ayerdi, F.; Bellver, J.; Herrero, J.; Meseguer, M. (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and sterility*, 102 (5): 1287-1294.

Rutsein, S.; Shah, I. H. (2004). Infecundity, Infertility, and childlessness in developing countries. Organização Mundial de Saúde, DHS comparative reports nº 9, Maryland.

Sanyo E & E Europe BV. (2007). InCu-VIEW Live™ In vitro live cell imaging. Sanyo, publicação nº 21451. Disponível em <http://www.panasonic-biomedical.co.uk/PDF/InCu-VIEW.pdf> (7 de setembro de 2017).

Sathananthan, A. H.; Bongso, A.; Ng, S. C.; Ho, J.; Ratnam, S. (1990). Ultrastructure of preimplantation human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Human reproduction*, 5 (3): 309-318.

Sathananthan, A. H. (2003). Mechanics of human blastocyst hatching *in vitro*. *Reproductive biomedicine online*, 7 (2): 228-234.

Schulz, K. F.; Altman, D. G.; Moher, D. (2010). CONSORT 2010 statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMC medicine*, 340: c332.

Scott, L.; Alvero, R.; Leondires, M.; Miller, B. (2000). The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human reproduction*, 15 (11): 2394-2403.

Serdarogullari, M.; Findikli, N.; Goktas, C.; Sahin, O.; Ulug, U.; Yagmurb, E.; Bahceci, M. (2014). Comparison of gender-specific human embryo development characteristics by *time-lapse* technology. *Reproductive biomedicine online*, 29 (2): 193-199.

Shaw-Jackson, C.; Van Beirs, N.; Thomas, A.; Rozenberg, S.; Autin, C. (2014). Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? A systematic mini-review. *Human reproduction*, 29 (7): 1380-1386.

Shearer, C. (2015) Multinucleation em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, New York: CRC Press, 75-78.

Silber, S. J.; Kato, K.; Aoyama, N.; Yabuuchi, A.; Skaletsky, H.; Fan, Y.; Shinohara, K.; Yatabe, N.; Kobayashi, T. (2017). Intrinsic fertility of human oocytes. *Fertility and sterility*, 107 (5): 1232-1237.

Silverman, M. E. (1996). Etienne-Jules Marey: 19th century cardiovascular physiologist and inventor of cinematography. *Clinical cardiology*, 19 (4): 339-341.

Siristatidis, C.; Komitopoulou, M. A.; Makris, A.; Sialakouma, A.; Botzaki, M.; Mastorakos, G.; Salamalekis, G.; Bettocchi, S.; Palmer, G. A. (2015). Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32 (4): 563-570.

Smith, R. (2015). Vacuolation em Campbell, A.; Fishel, S., eds, Atlas of time lapse embryology, New York: CRC Press, 79-88.

Stephens, S. M.; Arnett, D. M.; Meacham, R. B. (2013). The use of in vitro fertilization in the management of male infertility: what the urologist needs to know. *Reviews in urology*, 15 (4): 154-160.

Step toe, P. C.; Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 2 (8085): 366.

Sutton, E. J.; Henning, T. D.; Pichler, B. J.; Bremer, C.; Daldrup-Link, H. E. (2008). *European radiology*, 18: 2021-2032.

Swain, J. E. (2013). Could *time-lapse* embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS?. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30 (8): 1081-1090.

Tejera, A.; Basile, N.; Caiazza, M.; Meseguer, M. (2016). Embryo quality (classification and selection) em Meseguer, M., eds, Time-lapse microscopy in in-vitro fertilization, Reino Unido: Cambridge university press, 104-127.

Trouson, A.; Sathanathan, A. H. (1984). The application of electron microscopy in the evaluation of two- to four-cell human embryos cultured in vitro for embryo transfer. *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer*, 1 (3): 153-156.

Van Duin, M.; Polman, J.; De Breet, I. T.; van Ginneken, K.; Bunschoten, H.; Grootenhuis, A.; Brindle, J., Aitken, R. J. (1994). Recombinant human zona pellucida protein ZP3 produced by Chinese Hamster Ovary cells induces the human sperm acrosome reaction and promotes sperm-egg fusion. *Biology reproduction*, 51: 607-617.

Van Royen, E.; Mangelschots, K.; Vercruyssen, M.; De Neubourg, D.; Valkenburg, M.; Ryckaert, G.; Gerris, J. (2003). Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human reproduction*, 18 (5): 1062-1069.

Verlinsky, Y.; Ginsberg, N.; Lifchez, A.; Valle, J.; Moise, J.; Strom, C. M. (1990). Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human reproduction*, 5 (7): 826-829.

Verlinsky, Y.; Kuliev, A. (1996). Preimplantation diagnosis of common aneuploidies in infertile couples of advanced maternal age. *Human reproduction*, 11 (10): 2076-2077.

VerMilyea, M. D.; Tan, L.; Anthony, J. T.; Conaghan, J.; Ivani, K.; Gvakharia, M.; Boostanfar, R.; Baker, V. L.; Suraj, V.; Chen, A. A.; Mainigi, M.; Coutifaris, C.; Shen, S. (2014). Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multicenter study. *Reproductive biomedicine online*, 29 (6): 729-736.

Vitrolife (2015a) Primo vision™ time-lapse system. Disponível em: <http://www.vitrolife.com/en/Products/Primo-Vision-Time-lapse-System/>. (28 janeiro 2017).

Vitrolife (2015b) EmbryoScope® time-lapse system. Disponível em <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/>. (7 de setembro de 2017).

Vitrolife (2015c) Embryoscope+ time-lapse incubator. Disponível em <http://www.vitrolife.com/en/Products/EmbryoScope-Time-Lapse-System/EmbryoScope-PLUS-time-lapse-incubator/>. (7 de setembro de 2017).

Voorhis, B. J. V. (2007). In Vitro Fertilization. *The New England journal of medicine*, 356: 379-386.

Wang, J.; Sauer, M. V. (2006). In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and clinical risk management*, 2 (4): 355-364.

World Health Organization (2016). Infertility definitions and terminology. Disponível em <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>. Acedido em dezembro de 2016.

Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G. D.; de Mouzon, J.; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren, K.; Sullivan, E.; van der Poel, S. (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human reproduction*, 92 (5): 1520-1524.

Ziebe, S.; Lundin, K.; Loft, A.; Bergh, C.; Andersen, A. N.; Selleskog, U.; Nielsen, D.; Grøndahl; Kim, H.; Arce, J.-C. (2003). FISH analysis for chromosomes 13, 16, 18, 21, 22, X and Y in all blastomeres of IVF pre-embryos from 144 randomly selected donated human oocytes and impact on pre-embryo morphology. *Human reproduction*, 18 (12): 2575-2581.



# Anexos

## 1. Sistema de avaliação morfológica convencional de oócitos, zigotos e blastocistos

A avaliação convencional, realizada pela observação microscópica num microscópio invertido de alta resolução ligados a um sistema computacional, segue muitos critérios, dos quais podem-se destacar alguns, tais como características morfológicas e estruturais associadas aos glóbulos polares e pronúcleos (como tamanho, posição, simetria, entre outros), estruturas citoplasmáticas (como aglomerados de retículo endoplasmático, vacúolos ou inclusões), multinucleação, espessura e aspeto da zona pelúcida e número, tamanho e simetria dos blastómeros (Raczkowski *et al.*, 2004).

Com o objetivo de universalizar todos os critérios de avaliação, em termos de chegar a um consenso sobre os momentos ideais para que a monitorização pós-inseminação pelo método tradicional seja realizada, o grupo Alpha (ALPHA *Scientists*) e a Sociedade europeia de reprodução e embriologia humana (*European Society of Human Reproduction and Embryology*, ESHRE) realizaram, em 2011, uma conferência de modo a discutir este mesmo assunto. Assim, vários aspetos associados a todos os parâmetros morfológicos de avaliação, bem como os tempos de ocorrência dos marcos de desenvolvimento foram determinados e especificados.

Primeiramente, a monitorização pós-inseminação tem uma razão para ser diária no intervalo de tempo de cultura embrionária. A razão principal corresponde ao facto de que, em cada dia, existe um fenómeno celular que tem que ser visualizado e registado, de modo a que o embriologista reconheça se o embrião está a seguir um bom caminho de desenvolvimento. A tabela 8 representa os momentos de monitorização convencional pós-inseminação definidos e fixos para avaliação embrionária, desde a ocorrência de singamia até à expansão do blastocisto.

**Tabela 8-** Tempos de monitorização (em horas após inseminação) e avaliação embrionárias nas práticas convencionais antes do *time-lapse*. Cada etapa de desenvolvimento é visualizada em tempos específicos após a realização da técnica de RHA. São apresentados, igualmente, os estados celulares expectáveis para cada tempo de visualização. Adaptado de Alpha e ESHRE, 2011.

<b>Etapas de desenvolvimento</b>	<b>Tempo de observação pós-inseminação (h)</b>	<b>Etapas de desenvolvimento esperada</b>
Fertilização	17 ± 1	Pronúcleos
Singamia	23 ± 1	Singamia (20% a entrar em estado de dois blastómeros)
Estado de clivagem inicial	26 ± 1 (ICSI) 28 ± 1 (FIV)	Estado de dois blastómeros
Embrião de 2º dia	44 ± 1	Estado de quatro blastómeros
Embrião de 3º dia	68 ± 1	Estado de oito blastómeros
Embrião de 4º dia	92 ± 1	Mórula
Embrião de 5º dia	116 ± 1	Blastocisto

Desta forma, o primeiro marco situa-se a 17 horas após inseminação, quando é observada a verificação da fecundação (Armstrong *et al.*, 2015a) pelo estado apresentado pelos pronúcleos (Alpha/ESHRE, 2011) em termos de número, simetria e tamanho (Baczowski *et al.*, 2004). Às 23 horas pós-inseminação é aconselhável a verificação da ocorrência de singamia e 26 horas (para ICSI) e 28 horas (no caso de FIV), após inseminação, é observada a ocorrência de divisão precoce (Gardner e Balaban, 2016). Esta diferença entre as duas técnicas deve-se ao facto de alguns processos iniciais, incluindo a penetração do espermatozoide no oócito com a perfuração da zona pelúcida, não ocorrerem no caso de ICSI, o que faz com que, neste caso, a monitorização seja realizada mais cedo. Adicionalmente a esta observação, outros parâmetros poderão ser igualmente verificados, como a simetria dos blastómeros e fragmentação presente no citoplasma. A monitorização destes mesmos parâmetros deve ser considerada, igualmente, ao 2º dia de cultura embrionária, às 44 horas, fase esta em que os embriões deverão já ter passado por duas divisões mitóticas adicionais (4 células) e ao 3º dia de cultura, às 68 horas, possuindo o embrião, em desenvolvimento normal, um total de 8 blastómeros. No caso de a transferência dos embriões se estender para o 5º dia após inseminação terá que ser feita uma verificação do estado embrionário às 92 horas, para embriões de 4º dia, normalmente já em estado de mórula. Ao 5º dia,

o estado do blastocisto formado esperado deve ser verificado às 116 horas após o procedimento (Armstrong *et al.*, 2015a). A importância de criar pontos de concordância e uniformidade dos regulamentos de avaliação convencional é o facto de, internacionalmente, haver critérios próprios de cada país para esta prática.

Neste segmento irão ser abordados alguns exemplos da classificação da sociedade americana SART (*Society of Assisted Reproductive Technology*), bem como de alguns esquemas conhecidos de classificação. Pode-se definir que, do oócito ao blastocisto, vários aspetos têm que ser considerados em diferentes fases, enumeradas de seguida.

#### **A.** Avaliação morfológica na fase de oócito

A avaliação do oócito deve ter em conta, primeiramente, o grau de maturação e a presença de anomalias celulares intracitoplasmáticas e extracitoplasmáticas. No primeiro grupo poderão estar incluídos vacúolos ou a presença de granulações e, no segundo, características da zona pelúcida, do primeiro glóbulo polar ou da forma celular.

Segundo o consenso (Alpha e ESHRE, 2011), um oócito perfeito tem que ser avaliado com base em variados aspetos, começando pela sua observação morfológica, sendo que um oócito normal defini-se com base em variados critérios: uma forma essencialmente esférica, citoplasma translúcido isento de anomalias, primeiro glóbulo polar com tamanho normal (porque um tamanho anormal pode indicar anomalias cromossómicas, como aneuploidia), espaço perivitelino sem inclusões, ausência de agregados de retículo endoplasmático liso e, idealmente uma ausência de vacúolos (desde que estes não se encontrem presentes no citoplasma depois da ocorrência de fertilização).

#### **B.** Avaliação morfológica na fase de zigoto

A fase seguinte inclui a avaliação da fertilização que, como mencionado, promove a finalização da meiose II do oócito, levando à formação do segundo glóbulo polar e de dois pronúcleos. Nesta fase, de estabelecimento de um zigoto, é importante que sejam observados o tamanho, forma e simetria dos pronúcleos (que, idealmente, deverão apresentar-se com um tamanho muito semelhante e simétricos).

Os corpos precursores de nucléolos parecem ter uma importância extrema na avaliação do estado pronuclear, considerando como características ideais para este aspeto o seu número (sempre com diferença entre os dois pronúcleos menor que três), polarização (ambos polarizados ou ambos não polarizados) e, por último o ângulo entre eixo médio de ambos os pronúcleos com o glóbulo polar mais afastado deste eixo que não deverá ultrapassar os 50° (Gardner e Balaban, 2016). Um esquema de análise de

zigotos proposto por Scott e colaboradores, em 2000, permitiu estudar se a avaliação do zigoto pode indicar indícios de desenvolvimento, podendo promover a maior probabilidade de selecionar um embrião ou blastocisto com maior chance de implantação. Para isso, o esquema proposto pelos autores consistia numa classificação Z (Z-score) para análise da qualidade de zigotos, de acordo com quatro categorias principais, Z1 a Z4 (sendo Z1 a de maior qualidade). Os principais critérios, para este esquema, incluíram os tamanhos e distribuições do núcleo e dos nucléolos. Os autores verificaram, entre outros resultados, que o sistema de categorização utilizado e renovado de um sistema mais antigo permitiu que fosse exercida a sua influência no grau de desenvolvimento até blastocisto, já que zigotos Z1 e Z2 obtiveram, para além de um maior número de blastocistos derivados dos mesmos (para o caso de Z1,  $P < 0,001$ ), um potencial estatisticamente significativo de desenvolvimento em relação às outras categorias (de Z2 em relação a Z3,  $P < 0,05$ ). Os scores Z1 e Z2 mostraram estar, adicionalmente, ligados à probabilidade de transferência, implantação e gravidez, visto que se verificou um aumento significativo destas três variáveis ( $P < 0,01$ ) com a utilização deste sistema inicial de classificação. Adicionalmente, a presença de agregados de retículo endoplasmático liso e a presença de um halo que, por sua vez, não se sabe se é ou não determinante para descartar o oócito e classificá-lo corretamente, parecem ser critérios relevantes a ter em conta. Segundo Gardner e Balaban, um zigoto perfeito morfologicamente deve apresentar ausência de multinucleação, tamanho semelhante de blastómeros e fragmentação reduzida (menos de 20%).

### C. Avaliação morfológica na fase de embrião em clivagem







Seguidamente, numa fase de um embrião já em clivagem, a visualização e seguimento de todos os processos celulares parecem ser de máxima importância visto que o padrão de divisões mitóticas é um indicativo da presença ou ausência de anomalias no embrião. O número e tamanho de células, a fragmentação e multinucleação parecem ser variáveis a ser consideradas, podendo sumarizar todos estes critérios com uma hierarquização de três categorias (considerando que a categoria 1 consiste em embriões de qualidade aceitável, com menos de 10 % de fragmentação, tamanho específico dos blastómeros para o estado em questão e isento de multinucleação; a categoria 2, um embrião de qualidade intermédia, com 10 a 25 % de fragmentação, tamanho apropriado em alguns blastómeros e sem evidência de multinucleação; e, por fim, categoria 3, embrião de qualidade não aceitável, com o maior grau de fragmentação (superior a 25 %), tamanho inadequado de todos os blastómeros

e com a existência de multinucleação). Aparentemente, os primeiros dias de avaliação parecem ser determinantes na descoberta do potencial de desenvolvimento do oócito e, a avaliação em estado de clivagem mais tardios indica outras propriedades relevantes do embrião, já que o nível de desenvolvimento e diferenciação apresentam um grande controlo genético que é capaz de traduzir a competência do embrião. Assim, quaisquer indícios de que o embrião não esteja a efetuar de uma forma normal as suas clivagens ou evidenciar a presença de anormalidades citoplasmáticas deverá, de imediato, ser excluído, não só pelo baixo potencial que apresenta, como também pela evidência de possíveis anormalidades a nível cromossomal. Para embriões de quatro blastómeros e de terceiro dia, os blastómeros devem conter apenas um núcleo principal (mononucleados), tamanho semelhante de todos os blastómeros, fragmentação reduzida (menos de 20%), pelas regras ditadas por Gardner e Balaban (2016) para um estado de clivagem morfológicamente perfeito.

Para embriões de quarto dia, há outros indícios que parecem ser importantes, como a iniciação da compactação para a passagem para mórula, apresentando os embriões nesta fase pelo menos sete blastómeros, ausência de multinucleação e de fragmentação (Gardner e Balaban, 2016).

### D. Avaliação morfológica na fase de blastocisto

Para a última etapa, blastocisto, o conhecido esquema de Gardner e Schoolcraft (1999), ilustrado na figura 42, constitui uma referência na classificação morfológica nesta etapa de desenvolvimento.

<b>1</b> <b>Early blastocyst</b> <i>Blastocoel less than half of the blastocyst</i>	 1AA		
<b>2</b> <b>Blastocyst</b> <i>Blastocoel more than half of the blastocyst</i>	 2AA		
<b>3</b> <b>Blastocyst</b> <i>Blastocoel fills the blastocyst</i>	 3AA		
<b>4</b> <b>Expanded blastocyst</b> <i>The embryo is large and the zona is thin</i>	 4AA	 4BB	 4CC
<b>Inner cell mass</b>	<b>A</b> <i>Numerous and tightly packed cells</i>	<b>B</b> <i>Several and loosely packed cells</i>	<b>C</b> <i>Few cells</i>
<b>Trophoectoderm</b>	<b>A</b> <i>Many cells organized in epithelium</i>	<b>B</b> <i>Several cells organized in loose epithelium</i>	<b>C</b> <i>Few cells</i>

**Figura 42-** Esquema proposto por Gardner e Schoolcraft (1999) para a avaliação da qualidade de blastocistos com base em três critérios principais: grau de expansão (categorias 1 a 4), características da massa celular interna (categorias de A a C) e da trofoectoderme (categorias de A a C). A classificação 4AA corresponde à categorização de excelência de qualidade para a classificação de um blastocisto.

O grau de expansão do blastocisto é uma variável a ter com conta neste esquema, incluindo quatro categorias (1 a 4) hierarquizadas de acordo com o seu grau de expansão, desde a sua formação até à sua máxima expansão. Igualmente, a sua interpretação considera as características das duas partes diferenciadas de um blastocisto, a massa celular interna e a trofoectoderme, dividindo as suas características celulares em três categorias (A, B e C) por ordem decrescente dos caracteres ótimos das células que as constituem. Assim, um blastocisto 4AA, por exemplo, corresponderá

a um blastocisto totalmente expandido, com MCI e TE normais, apresentando, respetivamente, numerosas células coesas e um epitélio com células bem organizadas e coesas.

Baseando-se, então, na hierarquização de Gardner e Schoolcraft, embriologistas de Alpha e ESHRE (2011) criaram um esquema consensos para a avaliação de blastocistos adaptado do esquema anterior e, assim, considerando os mesmos parâmetros de análise. A hierarquização adaptada apresenta-se sumarizada na tabela 9.

**Tabela 9-** Adaptação do esquema de Gardner e Schoolcraft (1999) em relação a critérios e sistema de classificação definidos pela Alpha e ESHRE (2011). Adaptado de Alpha e ESHRE (2011).

	<b>Estado de expansão</b>	<b>Massa celular interna</b>	<b>Trofoectoderme</b>
<b>1</b> (Alta qualidade)	Inicial	Células compactas e aderentes	Epitélio coeso com numerosas células
<b>2</b> (Média qualidade)	Blastocisto	Células pouco distinguíveis e aderentes	Epitélio menos coeso com poucas células
<b>3</b> (Baixa qualidade)	Expandido	Células pouco numerosas e perceptíveis	Muito poucas células
<b>4</b> (Eclosão)	Eclodido ou a eclodir	-	-

Assim, cada um destes parâmetros apresenta uma classificação de 1 a 3 (com exceção do estado de expansão que é de 1 a 4), sendo que 1 é considerada a característica mais apropriada e 3 o exemplo de estrutura não aceitável (no caso dos estados de expansão, os mesmos são divididos pelas quatro categorias). O estado de expansão varia de precoce até à última fase, que corresponde à eclosão do blastocisto da zona pelúcida para posterior implantação do útero. A massa celular interna, no caso de um embrião de excelente qualidade, deve ser composta por células coesas, numerosas e distinguíveis entre si. O mesmo acontece com as células da trofoectoderme, que deverão formar uma camada uniforme, numerosa e coesa.

O estudo de Lagalla e colaboradores (2015) permitiu o desenvolvimento de um método de seleção baseado em características morfológicas da fase de blastocisto, incluindo os mesmos parâmetros de avaliação do modelo de Gardner e Schoolcraft (1999), através de um sistema digital<sup>22</sup>. O objetivo subjacente a este plano era obter um

<sup>22</sup> (Nikon, modulação de contraste Hoffmann, com aplicação de x200)

sistema de classificação não invasivo que se pudesse correlacionar com o potencial de implantação do blastocisto analisado. Ao medir a área total com recurso ao sistema digital e, posteriormente a *software* especializado, os autores descobriram que existe uma relação desta variável com o potencial de implantação, já que blastocistos que apresentam uma área inferior a  $18500 \mu\text{m}^2$  (micrómetros quadrados) e diâmetro de  $140,0 \pm 9 \mu\text{m}$  apresentavam um potencial de implantação estatisticamente menor do que embriões que apresentam uma área superior a 24000 e diâmetro  $190,0 \pm 9,0$  ( $P < 0,02$ ). Este resultado mostra que o grau de expansão do blastocisto tem influência na capacidade do mesmo de implantar. Relativamente à área da MCI, houve diferenças significativas ( $P$  igual a 0,047) da mesma na análise de blastocistos completamente expandidos, já que esta também era superior para este grau de expansão. Assim, apenas esta variável se relacionou com o potencial de implantação, mostrando, mais uma vez, a influência secundária do estado de expansão do blastocisto (não foram encontradas diferenças significativas na comparação entre as áreas isoladas da MCI em blastocistos que implantaram e que não implantaram). Por último, em relação à área total da TE, foram, igualmente para MCI, verificadas diferenças significativas ( $P$  igual a 0,04) no potencial de implantação quando esta variável foi testada juntamente com o grau de expansão, revelando uma maior taxa de implantação em blastocistos totalmente expandidos. Consequentemente, com base nestes resultados, os autores determinaram que tanto a área das diferentes zonas do blastocisto, conjugada com o nível de expansão, são parâmetros fundamentais a ter em conta na sua análise morfológica e, em última instância, desenvolveram um método não invasivo com possíveis e fortes indícios para prever a competência de um blastocisto para implantar no útero.

Em suma, os critérios de avaliação convencionais de oócitos, embriões em clivagem e blastocistos foram aprofundados e aperfeiçoados durante vários anos para que, atualmente, todas estas conclusões fossem retiradas quanto aos aspetos positivos e negativos de uma determinada situação celular.