

MSC

2.º
CICLO

FCUP
2020

U. PORTO

Utilização do *Eeva test* como ferramenta preditiva
do desenvolvimento embrionário

Marta de Oliveira Couto Ramos

FC

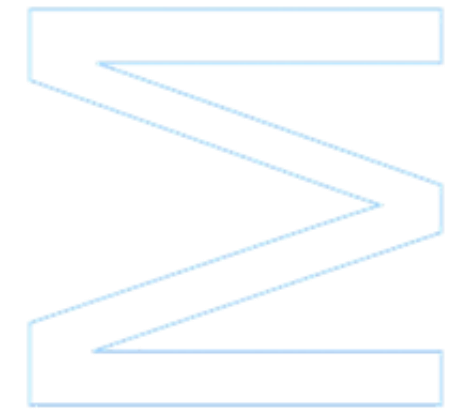


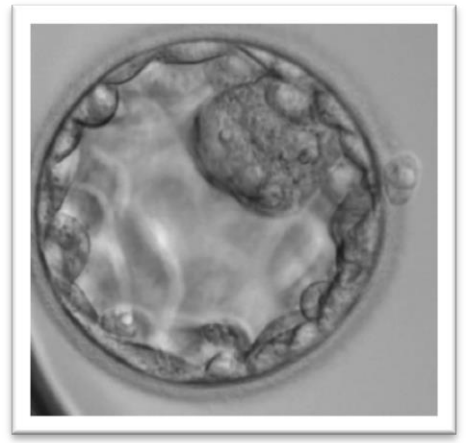
Utilização do *Eeva test* como ferramenta preditiva do desenvolvimento embrionário

Marta de Oliveira Couto Ramos

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto
Mestrado em Biologia Celular e Molecular

2020





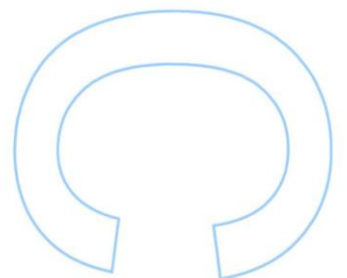
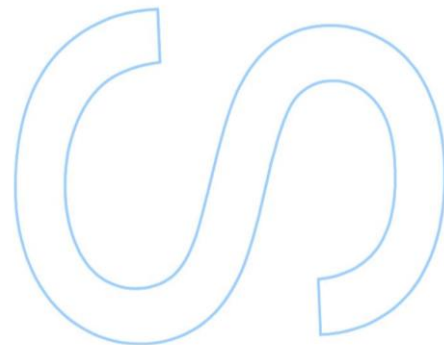
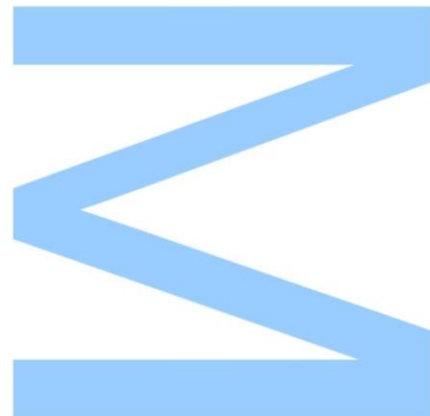
Utilização do *Eeva test* como ferramenta preditiva do desenvolvimento embrionário

Marta de Oliveira Couto Ramos

Mestrado em Biologia Celular e Molecular
Departamento de Biologia
2019/2020

Orientador

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

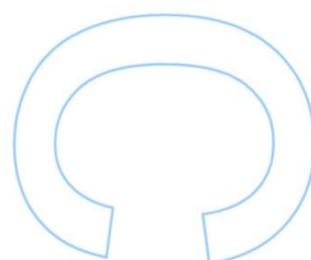
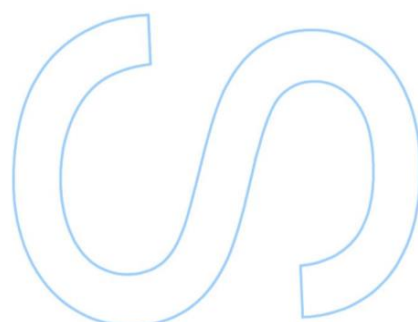
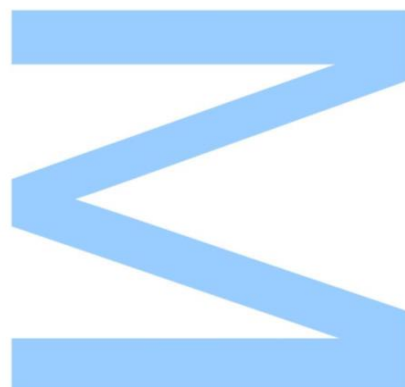




Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Ao longo de todo este ano e deste percurso pela área da Reprodução Humana Assistida, foram várias as pessoas que de uma forma extraordinária me ajudaram e por isso merecem o meu maior agradecimento e gratidão.

Em primeiro lugar agradeço ao Professor Vasco Almeida pela incrível oportunidade que me deu de estagiar no Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade (CEIE) e por todo o apoio, orientação, disponibilidade e prontidão demonstrados em todos os momentos. Agradeço muito a sua simpatia e compreensão e por ter depositado confiança em mim. Muito obrigada.

Um agradecimento muito especial à Dra. Isabel Damião que me acompanhou ao longo de todo o meu estágio, aprendi muito consigo. Agradeço a sua disponibilidade para partilhar todo o seu conhecimento, a sua supervisão, ajuda e pela confiança e incentivo que me deu. Fico-lhe eternamente grata pelo seu carinho e simpatia e pela forma maravilhosa como me acolheu e tratou. Nunca me irei esquecer.

Também um agradecimento muito especial à Dra. Sara Oliveira. Obrigada pelos conselhos valiosos, supervisão e ajuda. Obrigada pelos ensinamentos partilhados, pelo incentivo e simpatia que sempre demonstraste. Acolheram-me de uma forma maravilhosa por isso estou eternamente grata.

Agradeço também ao Dr. Joaquim Gonçalves e ao Dr. Jorge Braga por terem permitido a realização do meu estágio no CEIE, que contribuiu de uma forma valiosa para a minha formação nesta área. A toda a equipa do CEIE com quem tive oportunidade de conviver e de trabalhar, agradeço pela forma extraordinária como me receberam e por me terem dado a oportunidade de trabalharmos em conjunto.

Aos meus colegas de mestrado Catarina Santos, Luís Póvoas, Nádia Lucas e Ana Patrícia Gomes pela amizade e carinho demonstrados ao longo destes dois anos e por me ouvirem e motivarem a não desistir. O meu grande agradecimento ao João Faria pela preciosa ajuda na análise estatística dos dados e pela disponibilidade, prontidão e simpatia com que me ajudou, foi excecional.

E por fim, agradeço imenso aos meus pais e à minha irmã. Sem eles nunca teria conseguido. Foram os meus pilares, aqueles que me ouviram, choraram comigo nos momentos mais difíceis e me deram força e ânimo para chegar até ao fim. Obrigada pela paciência, pelo amor, carinho e pelas orações.

Resumo

A infertilidade, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma doença complexa com importantes implicações médicas, psicossociais, demográficas e económicas, tornando-se assim um problema de saúde pública. Ao longo dos tempos, foram desenvolvidas e aperfeiçoadas várias técnicas de Reprodução Humana Assistida (RHA) de modo a ultrapassar as causas inerentes à infertilidade. Um dos fatores essenciais para o sucesso destas técnicas é a avaliação da qualidade embrionária, uma vez que permite uma correta seleção de embriões para a transferência. Neste sentido, têm sido desenvolvidos sistemas de classificação de embriões que pretendem uniformizar os critérios de observação e classificação associados a cada fase. O Sistema *Eeva test* é um *software* que fornece aos embriologistas uma avaliação automatizada dos parâmetros de qualidade embrionária recorrendo às propriedades preditivas da morfocinética associadas à análise morfológica, indicando qual o embrião com maior potencial de desenvolvimento e implantação ao 5º dia, tendo em conta a cinética de clivagem até ao 3º dia. No entanto, o uso desta tecnologia ainda não está totalmente validado, sendo necessários mais estudos e bibliografia que comprovem os benefícios da sua utilização na prática clínica. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo analisar se a avaliação prevista do desenvolvimento embrionário por este sistema ao 3º dia teria uma relação com a previsão dos melhores embriões para implantar ao 5º dia. Para isso, foram seguidos e analisados 738 embriões de um total de 131 ciclos. Cada embrião foi classificado ao 3º e 5º dias segundo os critérios de Istambul e avaliado pelo sistema *Eeva test*.

Inicialmente observou-se que não há diferenças significativas entre a qualidade média dos embriões para cada técnica, indicando assim que o desenvolvimento embrionário é semelhante para embriões obtidos com FIV ou ICSI. Observou-se também que a relação entre a qualidade dos embriões ao 3º e 5º dia, segundo os critérios morfológicos ($SQ = 35.59$, $p = 2.823e-15$), a relação entre a classificação do *Eeva* e a de 3º dia ($SQ = 91.88$, $p = 2.2e-16$) e a relação entre a classificação do *Eeva* e a de 5º dia segundo os critérios de Istambul ($SQ = 96.79$, $p = 2.2e-16$) apresentam todas elas significância na sua interação. A relação entre a qualidade embrionária e a taxa de gravidez também foi estudada verificando-se uma proximidade à significância da avaliação da qualidade ao 3º dia segundo critérios morfológicos e a taxa de gravidez e um efeito significativo na taxa de gravidez quando os embriões apresentam uma elevada qualidade segundo os critérios de Istambul ao 5º dia e segundo o *Eeva*.

Concluimos assim que o *Eeva test* é um *software* altamente informativo que possibilita a avaliação de embriões segundo o seu potencial de desenvolvimento, permitindo assim selecionar os de melhor qualidade e com maior potencial de implantação. Também concluimos que a combinação da morfologia ao 3º dia com a classificação atribuída pelo *Eeva* resulta em taxas de implantação e gravidez clínica significativamente mais altas.

Palavras-chave: Infertilidade, reprodução humana assistida, *time-lapse*, *Eeva test*, morfocinética, desenvolvimento embrionário, qualidade embrionária, seleção embrionária, taxa de gravidez.

Abstract

Infertility, according to the World Health Organization (WHO), is a complex disease with important medical, psychosocial, demographic and economic implications, thus becoming a public health problem. Over the years, several Assisted Reproductive Technologies (ART) have been developed and improved in order to overcome the inherent causes of infertility. One of the essential factors for the success of these techniques is the evaluation of the embryonic quality, since it allows a correct selection of embryos for transfer. In this sense, embryo classification systems have been developed that aim to standardize the observation and classification criteria associated with each phase. The Eeva test System is a software that provides embryologists with an automated evaluation of embryo quality parameters using the predictive properties of morphokinetics associated with morphological analysis, indicating which embryo has the greatest potential for development and implantation on the 5th day, taking into account the kinetics cleavage until the 3rd day. However, the use of this technology is not yet fully validated and further studies and bibliography are needed to prove the benefits of its use in clinical practice. Therefore, this work aimed to analyze whether the predicted evaluation of embryonic development by this system on the 3rd day would have a relationship with the forecast of the best embryos to implant on the 5th day. For that, 738 embryos from a total of 131 cycles were followed and analyzed. Each embryo was classified on the 3rd and 5th days according to the Istanbul criteria and evaluated by the Eeva test system.

Initially, it was observed that there are no significant differences between the average quality of embryos for each technique, thus indicating that embryonic development is similar for embryos obtained with IVF or ICSI. It was also observed that the relationship between the quality of the embryos at the 3rd and 5th day, according to the morphological criteria ($SQ = 35.59$, $p = 2.823e-15$), the relationship between the Eeva classification and that of the 3rd day ($SQ = 91.88$, $p = 2.2e-16$) and the relationship between the Eeva classification and the 5th day according to the Istanbul criteria ($SQ = 96.79$, $p = 2.2e-16$) all have significance in their interaction. The relationship between embryonic quality and the pregnancy rate was also studied showing a proximity to the significance of the quality assessment on the 3rd day according to morphological criteria and pregnancy rate and a significant effect on the pregnancy rate when the embryos are of high quality according to the Istanbul criteria on the 5th day and according to the Eeva.

We conclude that the Eeva test is highly informative software that allows the evaluation of embryos according to their development potential, thus allowing the selection of the best quality and with the greatest potential for implantation. We also concluded that the combination of morphology on the 3rd day with the classification attributed by Eeva results in significantly higher implantation rates and clinical pregnancy.

Keywords: Infertility, assisted reproduction techniques, time-lapse, Eeva test, morphokinetics, embryo development, embryo quality, embryo selection, pregnancy rate.

Índice

Agradecimentos	III
Resumo.....	V
Abstract	VII
Lista de figuras	XIII
Lista de tabelas.....	XVI
Lista de abreviaturas e unidades.....	XIX
1 Introdução	1
1.1 Infertilidade: conceitos e prevalência	1
1.2 Reprodução Humana Assistida.....	3
1.3 Desenvolvimento Embrionário: Avaliação da qualidade embrionária	5
1.3.1 Avaliação da fertilização.....	7
1.3.2 Avaliação dos pronúcleos.....	8
1.3.3 Avaliação dos corpos precursores de nucléolos	12
1.3.4 Avaliação citoplasmática	15
1.3.5 Singamia e Divisão Precoce.....	16
1.3.6 Avaliação de embriões em fase de clivagem: 2º e 3º dia	17
1.3.6.1 Número de blastómeros	18
1.3.6.2 Tamanho e simetria de blastómeros.....	19
1.3.6.3 Fragmentação.....	20
1.3.6.4 Multinucleação.....	21
1.3.6.5 Anomalias citoplasmáticas	22
1.3.7 Avaliação de embriões em fase de mórula: 4º dia.....	24
1.3.8 Avaliação de embriões em fase de blastocisto: 5º dia.....	25
1.3.8.1 Grau de expansão do blastocisto	26
1.3.8.2 Massa celular interna	27
1.3.8.3 Trofoectoderme	28
1.4 Tecnologia <i>time-lapse</i>	30
1.4.1 Geri+	32
1.5 Parâmetros morfocinéticos na avaliação embrionária	34
1.5.1 Parâmetros morfocinéticos absolutos	34
1.5.2 Parâmetros morfocinéticos relativos	37
1.6 Sistema <i>Eeva test</i>	40

2. Objetivos	43
3. Material e Métodos.....	45
3.1. Avaliação espermática (espermograma).....	45
3.1.1 Parâmetros macroscópicos	47
3.1.1.1 Liquefação	47
3.1.1.2 Viscosidade.....	47
3.1.1.3 Aparência visual	47
3.1.1.4 Volume	48
3.1.1.5 pH	48
3.1.1.6 Cheiro	48
3.1.2 Parâmetros microscópicos	49
3.1.2.1 Motilidade	49
3.1.2.2 Vitalidade	49
3.1.2.3 Concentração	50
3.1.2.4 Morfologia.....	50
3.2. Processamento de amostras seminais para tratamentos de RHA.....	51
3.3. Estimulação ovárica.....	52
3.4. Punção folicular.....	53
3.5. Ciclos de Fertilização <i>In Vitro</i> (FIV).....	54
3.6. Ciclos de Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI)	55
3.6.1 Desnudação de ovócitos	55
3.6.2 Avaliação da Maturidade e Qualidade ovocitária	56
3.6.3 Microinjeção de espermatozóides.....	57
3.7. Avaliação da qualidade embrionária: classificação de Istambul.....	59
3.8. Avaliação da qualidade embrionária: Sistema <i>Eeva test</i>	62
3.9. Transferência de embriões.....	62
3.10. Avaliação das taxas de gravidez e de abortamento	63
3.11. Análise estatística.....	63
3.11.1 Variáveis em estudo e preparação dos dados	63
3.11.2 Análises de regressão linear.....	65
4. Resultados	67
4.1. Resultados descritivos da amostra.....	67
4.2. Correlações das variáveis: teste de correlação τ de <i>Kendall</i>	67
4.3. Relações entre a técnica utilizada e qualidade embrionária	68

4.4 Relações entre a classificação do <i>Eeva</i> e os critérios de Istambul.....	69
4.4.1 Relação entre classificação de Istambul ao 3º e 5º dia.....	69
4.4.2 Relação entre a classificação atribuída pelo <i>Eeva</i> e pelos critérios de Istambul ao 3º dia de desenvolvimento embrionário	71
4.4.3 Relação entre a classificação atribuída pelo <i>Eeva</i> e pelos critérios de Istambul ao 5º dia de desenvolvimento embrionário	73
4.5 Relações entre gravidez e qualidade embrionária.....	75
4.5.1 Qualidade embrionária ao 3º dia e sucesso na gravidez	75
4.5.2 Qualidade embrionária ao 5º dia e sucesso na gravidez	76
4.5.3 Classificação atribuída pelo <i>Eeva</i> e sucesso na gravidez.....	76
5. Discussão dos resultados	77
5.1 Qualidade embrionária para as diferentes técnicas de RHA	77
5.2 Classificação do <i>Eeva</i> e classificação morfológica.....	79
5.3 Taxa de gravidez e qualidade embrionária	82
6. Conclusão	84
7. Referências.....	85

Lista de figuras

Figura 1. Imagem ilustrativa de um pré-zigoto ideal, contendo 2GP no EPV e 2PN centrais com os respetivos CPN (Papale *et al.*, 2012).

Figura 2. Imagens de pré-zigotos e avaliação do número de PN. (a) Pré-zigoto com 2PN e 2GP no EPV. (b) Pré-zigoto com 1PN e apenas 1GP no EPV; (c) Pré-zigoto com 4PN e 1GP. Adaptado de (Papale *et al.*, 2012).

Figura 3. Imagens ilustrativas de pré-zigotos com PN de tamanhos diferentes. (a) Pré-zigoto com PN menores do que o normal; (b) Pré-zigoto com um PN de tamanho inferior em relação ao outro de diâmetro normal. Adaptado de (Papale *et al.*, 2012).

Figura 4. Imagens ilustrativas do alinhamento dos PN relativamente ao plano dos GP. (a) Diagrama de pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, paralelos ao plano dos GP; (b) Diagrama de pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, perpendiculares ao plano dos GP (Papale *et al.*, 2012).

Figura 5. Imagens exemplificativas de pré-zigotos com anomalias citoplasmáticas. (a) Pré-zigoto com morfologia citoplasmática normal e 2PN centrais e justapostos mas com um halo citoplasmático posicionado às 3 horas; (b) Pré-zigoto com 2PN localizados na periferia com uma grande agregação de organelos; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, mas com dois grandes vacúolos imediatamente adjacente ao PN e corpos refrateis. Adaptado de (Papale *et al.*, 2012).

Figura 6. Imagens exemplificativas de embriões com número de células específico de cada fase do desenvolvimento. (a) Embrião no 1º dia de desenvolvimento com 2 células de tamanho igual, sem fragmentação; (b) Embrião no 2º dia de desenvolvimento com 4 células de tamanho igual, sem fragmentação; (c) Embrião no 3º dia de desenvolvimento com 8 células de tamanho igual, sem fragmentação. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012). Todos os embriões apresentados são considerados 'ideais' para as diferentes fases de clivagem, sem a presença de fragmentação nem de multinucleação.

Figura 7. Imagens ilustrativas de embriões em fase de clivagem com blastómeros de diferentes tamanhos. (a) Embrião com 3 células de igual tamanho; (b) Embrião com 5 células, 2 de menor tamanho e 3 maiores; (c) Embrião com 7 células, 4 de menor tamanho e 2 maiores. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

Figura 8. Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com diferentes graus de fragmentação. (a) Embrião com 4 células de tamanho igual com fragmentação <10%; (b) Embrião com 4 células de tamanho igual, com fragmentação de 10-20%; (c) Embrião com 8 células de diferentes tamanhos, com fragmentação superior a 25%. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

Figura 9. Imagens ilustrativas de embriões em fase de clivagem com ou sem multinucleação. (a) Embrião de 4 células mononucleadas de igual tamanho; (b) Embrião de 2 células de tamanho diferente com quatro núcleos num dos blastómeros. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

Figura 10. Imagens ilustrativas de embriões em fase de clivagem com anomalias citoplasmáticas. (a) Embrião de 2 células com um halo claro em ambos os blastómeros, caracterizado por granularidade centralizada associada à ausência de organelos no córtex periférico; (b) Embrião de 4 células com uma distribuição anormal de organelos levando a zonas granulosas em cada célula; (c) Embrião de 2 células com grandes vacúolos em ambos os blastómeros e 15% de fragmentação concentrada. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

Figura 11. Imagens ilustrativas de blastocistos em diferentes fases de expansão. (a) Blastocisto inicial (Grau 1) com uma cavidade que ocupa cerca de 50% do volume do embrião; (b) Blastocisto de Grau 2; (c) Blastocisto expandido (Grau 3: 1: 1), mostrando uma MCI composta por muitas células compactadas firmemente; (d) Blastocisto em eclosão (Grau 4: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF; (e) Blastocisto eclodido (Grau 4: 1: 1), completamente livre da ZP. Adaptado de (Hardarson *et al.*, 2012).

Figura 12. Imagens ilustrativas de blastocistos com MCI de diferentes graus. (a) Blastocisto expandido (Grau 3:1:1), mostrando uma MCI proeminente, constituída por muitas células coesas. (b) Blastocisto expandido (Grau 3:2:1) mostrando uma MCI compacta, constituída por poucas células; (c) Blastocisto expandido (Grau 4: 3: 3) sem MCI claramente identificável. A TE é constituída por poucas células dispersas que não formam um epitélio coeso. Adaptado de (Hardarson *et al.*, 2012).

Figura 13. Imagens ilustrativas de blastocistos com TE de diferentes graus. (a) Blastocisto de eclosão precoce (Grau 5: 1: 1), com muitas células formando um epitélio coeso. A MCI não é claramente visível; (b) Blastocisto expandido (Grau 4: 1: 2), com células da TE de vários tamanhos, algumas células bastante grandes sendo particularmente evidentes na borda do blastocisto; (c) Blastocisto de eclosão precoce

(Grau 5: 1: 3) com a TE muito dispersa e com poucas células, não formando um epitélio coeso. Adaptado de (Hardarson *et al.*, 2012).

Figura 14. Imagem esquemática dos parâmetros morfocinéticos absolutos e relativos e a ocorrência destes nas diversas etapas do 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). Adaptado de (Ciray *et al.*, 2014).

Figura 15. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representado por um gráfico com linha de regressão. Está representada a relação entre a classificação da qualidade embrionária ao 3º e 5º dia de desenvolvimento usando uma classificação segundo os critérios de Istambul.

Figura 16. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representado por um gráfico com linha de regressão. Está representada a relação entre a classificação atribuída pelo *software Eeva* e a classificação segundo os critérios de Istambul ao 3º dia de desenvolvimento embrionário.

Figura 17. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representado por um gráfico com linha de regressão. Está representada a relação entre a classificação atribuída pelo *software Eeva* e a classificação segundo os critérios de Istambul ao 5º dia de desenvolvimento embrionário.

Lista de tabelas

Tabela 1. Sistema de classificação de PN de pré-zigotos tendo em conta a sua organização espacial e o número e alinhamento dos CPN, segundo os critérios do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011).

Tabela 2. Sistema de classificação do *Zygote scoring* (*Z-scoring*), no qual o número, tamanho e alinhamento dos CPN são considerados. Adaptado (Scott, 2003b).

Tabela 3. Tempo de observação e respetivo desenvolvimento expectável para cada fase do embrião em cultura (Alpha & ESHRE, 2011).

Tabela 4. Sistema de classificação de embriões no 4º dia de desenvolvimento. Adaptado de (Alpha & ESHRE, 2011).

Tabela 5. Nomenclatura e descrição dos parâmetros morfocinéticos absolutos, desde o estado de clivagem até ao estado de desenvolvimento de mórula, blastocisto e eclosão do blastocisto. Adaptado de (Ciray *et al.*, 2014).

Tabela 6. Nomenclatura e descrição dos parâmetros morfocinéticos relativos, relacionados com a duração (em horas) dos ciclos celulares e sincronização do estado de clivagem. Adaptado de (Ciray *et al.*, 2014).

Tabela 7. Valores mínimos de referência estabelecidos pela OMS para os parâmetros de avaliação da qualidade espermática (WHO, 2010).

Tabela 8. Sistema de classificação da qualidade embrionária ao 3º dia de desenvolvimento segundo os critérios morfológicos do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011).

Tabela 9. Sistema de classificação de blastocistos segundo os critérios morfológicos do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011).

Tabela 10. Sistema de classificação de embriões ao 5º dia de desenvolvimento segundo os critérios morfológicos de Istambul. O sistema baseia-se na classificação de 3 parâmetros em simultâneo: grau de expansão do blastocisto, massa celular interna e trofoectoderme (Alpha & ESHRE, 2011).

Tabela 11. Análise de desviância para prever a qualidade embrionária ao 5º dia a partir da classificação atribuída ao 3º dia. São apresentados a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, a estatística da análise de

anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. A significância é representada por “**”.

Tabela 12. Análise de desviância para comparar com o modelo nulo Im (Istambul 5 ~ 1). São apresentados os graus de liberdade residuais (glR), a soma dos quadrados dos residuais (SQR), os graus de liberdade (gl), a soma dos quadrados (SQ), a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. O símbolo “**” representa significância.

Tabela 13. Análise de desviância para prever a qualidade embrionária ao 3º dia a partir da classificação atribuída pelo *software Eeva*. São apresentados a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. A significância é representada por “**”.

Tabela 14. Tabela da análise de desviância para comparar com o modelo nulo Im (Istambul 3 ~ 1). São apresentados os graus de liberdade residuais (glR), a soma dos quadrados dos residuais (SQR), os graus de liberdade (gl), a soma dos quadrados (SQ), a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. O símbolo “**” representa significância.

Tabela 15. Análise de desviância para prever a qualidade embrionária ao 5º dia a partir da classificação atribuída pelo *software Eeva*. São apresentados a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. A significância é representada por “**”.

Tabela 16. Tabela da análise de desviância para comparar o modelo selecionado com o modelo nulo Im (Istambul 5 ~ 1). São apresentados os graus de liberdade residuais (glR), a soma dos quadrados dos residuais (SQR), os graus de liberdade (gl), a soma dos quadrados (SQ), a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. O símbolo “**” representa significância.

Tabela 17. Tabela com as estimativas previstas conforme o modelo para cada variável em estudo, apresentando os modelos Istambul 5 ~ Istambul 3 (classificação de Istambul ao 5º dia prevista por Istambul ao 3º dia), Istambul 3 ~ *Eeva* (classificação de Istambul ao 3º dia prevista pelo *Eeva*) e Istambul 5 ~ *Eeva* (classificação de Istambul

ao 5º dia prevista pelo *Eeva*). São apresentados os valores mínimos, a média, os valores máximos e a extensão do espectro que é coberto no gráfico.

Lista de abreviaturas e unidades

ANOVA - *ANalysis Of VAriance*

ATP - *Adenosine triphosphate* (adenosina trifosfato)

β HCG - *β -Human chorionic gonadotropin* (β -gonadotrofina coriônica humana)

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*)

CCO - Complexo Cumulus-Ovócito

CEIE - Centro de Estudo de Infertilidade e Esterilidade

CPN - Corpos Precursores de Nucléolos

dB - Duração da fase de blastulação (B - *blastulation*)

dcom - Duração da etapa de compactação (com - *compaction*)

dexp - Duração da fase de expansão do blastocisto (exp - *expansion*)

DGPI - Diagnóstico Genético Pré-Implantação

DNA - *DeoxyriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)

Eeva - *Early Embryo Viability Assessment*

EPV - Espaço Perivitelino

FIV - Fertilização *In Vitro*

FSH - *Follicle-stimulating hormone* (Hormona Folículo-Estimulante)

GnRH - *Gonadotropin-Releasing Hormone* (fator libertador de gonadotrofinas)

GP - Glóbulo polar

hCG - *human Chorionic Gonadotropin* (Gonadotrofina Coriônica humana)

HEPA - *High Efficiency Particulate Air*

ICSI - *Intracytoplasmatic Sperm Injection* (Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóides)

LED - *Light Emitting Diode*

MI - Metafase I

MII - Metafase II

mL - Mililitros

mRNA - RNA mensageiro

nm - nanómetros (unidade de comprimento de onda de radiação)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PN - Pronúcleos

PVP - *Polyvinylpyrrolidone* (polivinilpirrolidona)

RE - Retículo Endoplasmático

Rpm - Rotações por minuto

RHA - Reprodução Humana Assistida

RNA - *Ribonucleic Acid*

rRNA - RNA ribossómico

s1 - Duração da etapa de apenas um blastómero

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

s3 - Parâmetro de sincronização das divisões mitóticas do terceiro ciclo celular, do estado de cinco a oito blastómeros (s - *synchronization*)

t0 - Tempo inicial de inseminação

t2 - Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de um embrião com duas células

t3 - Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de um embrião com três células

t4 - Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de um embrião com quatro células

t5 - Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de um embrião com cinco células

t8 - Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de um embrião com oito células

tB - Tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de blastocisto (B – *blastocyst*)

TE - Trofoectoderme

tEB - Tempo decorrido desde a inseminação até ao início da expansão do blastocisto (EB - *expansion of blastocyst*)

tHD - Tempo decorrido desde a inseminação até à fase de eclosão do blastocisto da zona pelúcida (H - *hatching*)

tM - Tempo decorrido desde a inseminação até à fase de mórula (M - *Morula*)

tMf - Tempo decorrido desde a inseminação até à finalização da compactação (Mf- *fully compacted morula*)

tPB2 - Tempo da extrusão do segundo glóbulo polar (PB - *polar body*)

tPNa - Tempo desde a inseminação até ao aparecimento dos pronúcleos feminino e masculino (PNa - *pronuclear appearance*)

tPNf - Tempo desde a inseminação até ao desaparecimento dos pronúcleos e singamia (PNf - *pronuclear fading*)

tSB - Tempo decorrido desde a inseminação até à fase de início da blastulação (SB - *start of blastulation*)

tSC - Tempo decorrido desde a inseminação até à fase inicial da compactação (SC - *start compaction*)

VG - Vesícula Germinativa

v/v - Percentagem em volume

μL - Microlitros

μm/s - Micrómetros por segundo

ZP - Zona Pelúcida

1 Introdução

1.1 Infertilidade: conceitos e prevalência

A parentalidade é inegavelmente um dos objetivos mais desejados na vida de um casal, tornando-se um projeto gerado muitas vezes pelas expectativas pessoais, interpessoais, sociais e religiosas (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001, Boivin *et al.*, 2007). Deste modo, a incapacidade de conceber filhos é vivenciada como uma experiência frustrante, tendo consequências como repercussões sociais, sofrimento psicológico, *stress*, ansiedade e sofrimento pessoal (Cousineau & Domar, 2007). Todas estas circunstâncias criam um círculo vicioso que afeta adversamente o relacionamento interpessoal e sexual do casal, estando na origem de um tumulto emocional intenso e de inúmeros problemas psicológicos a longo prazo (Seibel & Taymor, 1982, Daniluk, 1988).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é uma doença do sistema reprodutivo e é definida como a incapacidade de um casal atingir uma gravidez após 12 meses ou mais de relações sexuais desprotegidas e regulares (Larsen, 2005). No entanto, se a idade da mulher for igual ou superior a 35 anos o tratamento pode ser iniciado após um período de 6 meses de relações sexuais regulares sem o uso de contraceptivos (Kumar & Singh, 2015).

A reprodução humana é um conjunto de processos interconectados, onde estão incluídas várias etapas cruciais como a formação de gâmetas e respetiva fecundação e todo o desenvolvimento embrionário (Wang *et al.*, 2003). Em comparação com outras espécies, o ser humano é altamente ineficiente em termos de reprodução. A taxa de fertilidade por ciclo é de cerca de 20% e a taxa de gravidez em casais com fertilidade comprovada é de aproximadamente 90% após 12 meses e 94% após 2 anos (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001). Segundo estimativas da OMS, 60 a 80 milhões de casais em todo o mundo sofrem atualmente de infertilidade, estimando-se assim que a infertilidade conjugal atinja, na população, cerca de 8% a 12% dos casais em idade fértil, com uma incidência crescente em função da idade e dependente da região geográfica (Kumar & Singh, 2015).

Após vários estudos populacionais, de modo a estimar a prevalência de infertilidade consoante as diferentes regiões, tem-se verificado que a taxa de prevalência em 12 meses varia de 3,5% a 16,7% nos países mais desenvolvidos e de 6,9% a 9,3% nos países menos desenvolvidos, com uma prevalência média global estimada de 9%

(Roupa *et al.*, 2009). No entanto, as evidências atuais indicam que apenas 56% destes casais procuram atendimento médico (Boivin *et al.*, 2007).

As causas de infertilidade são múltiplas e podem estar associadas tanto a problemas do aparelho reprodutor masculino como feminino (Barbieri, 2019). É importante reconhecer que, apesar de 20 a 25% dos casos o problema ocorrer devido a fatores masculinos e 30 a 40% o problema ser feminino, em aproximadamente 30% as causas são encontradas em ambos os membros do casal e em 15% não existe nenhum fator específico identificado (De Kretser & Baker, 1999, Brugo-Olmedo *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, a percentagem de infertilidade tem vindo a subir devido a causas tão diversas como o adiamento da maternidade, o aumento da prevalência das infeções de transmissão sexual, o sedentarismo, a obesidade, o consumo de tabaco e álcool e a poluição (Larsen, 2005, Agarwal *et al.*, 2015, Kumar & Singh, 2015). Adiar a gravidez é uma escolha comum para os casais na sociedade de hoje, sobretudo nos países desenvolvidos (Leridon & Slama, 2008). O prolongar dos percursos escolares, o estabelecimento das carreiras e a procura de estabilidade social e profissional surgem em primeiro lugar na vida dos casais, havendo assim uma tendência para o adiamento do planeamento familiar (Mills *et al.*, 2011). Um dos fatores mais importantes na avaliação de um casal com problemas de fertilidade é a idade da mulher (Maheshwari *et al.*, 2008, Barbieri, 2019). O declínio da fecundidade feminina com a idade deve-se principalmente à diminuição do número de folículos ovarianos e ao declínio na qualidade ovocitária, fatores que não podem ser controlados ou alterados (Group, 2005, Schmidt *et al.*, 2012). O aumento da idade paterna está associado à diminuição dos níveis de androgénio e à deterioração da qualidade espermática (Schmidt *et al.*, 2012). O desejo de engravidar numa idade mais avançada não implica apenas uma baixa possibilidade de sucesso, mas também um risco aumentado de desenvolver doenças na gravidez, como pré-eclâmpsia, hipertensão e diabetes, além de anomalias cromossómicas e abortos fetais (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001). A probabilidade de uma gravidez aos 40 anos ou numa idade superior é metade em comparação com a de casais mais jovens, enquanto a incidência de aborto espontâneo duplica ou até mesmo triplica (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001).

1.2 Reprodução Humana Assistida

Embora hoje em dia a infertilidade seja um problema cada vez mais comum que afeta profundamente os casais envolvidos, a evolução da ciência médica tem permitido o aparecimento de respostas ao problema com a Reprodução Humana Assistida (RHA) (Roupa *et al.*, 2009). As técnicas de RHA consistem num conjunto de tratamentos e procedimentos que permitem a manipulação *in vitro* tanto de ovócitos e espermatozóides como de embriões, com o objetivo de se atingir uma gravidez viável em casos de infertilidade masculina, feminina ou ambos (Zegers-Hochschild *et al.*, 2009). Deste modo, a reprodução assistida inclui todos os métodos utilizados para a fertilização que não são alcançados através da relação sexual (Roupa *et al.*, 2009).

A Fertilização *In Vitro* (FIV) foi considerada um dos avanços mais significativos no ramo da medicina da reprodução (Kovacs, 2014) e consiste na fertilização dos ovócitos pelos espermatozóides em laboratório (Van Voorhis, 2007). Esta técnica tem como objetivo mimetizar o processo de fertilização natural que ocorre nas trompas de Falópio, permitindo que os espermatozóides progridam até ao ovócito, penetrando nas camadas envoltentes.

A primeira fertilização de ovócitos humanos bem-sucedida em laboratório foi em 1978. Este importante marco ofereceu uma nova esperança aos casais com problemas de fertilidade e o primeiro parto bem-sucedido em 1981, nos EUA, levou a um rápido aumento da aplicação deste método e à criação de centros especializados (Roupa *et al.*, 2009, Biggers, 2012, Kamel, 2013). Desde então, todas as etapas envolvidas neste procedimento têm sido melhoradas, levando a que esta seja atualmente a técnica de RHA mais eficiente no tratamento da infertilidade (Alper, 2011, Wang & Sauer, 2006).

A evolução da ciência e da tecnologia nos últimos anos, particularmente no campo da micromanipulação, permitiu o aparecimento da Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI) (Schoolcraft, 2007). Esta técnica consiste na deposição de um único espermatozóide diretamente no citoplasma do ovócito por micromanipulação (Neri *et al.*, 2017), permitindo assim o sucesso em casos de falha de fertilização ou em casais com um fator masculino grave, como anormal morfologia dos espermatozóides, falhas nos processos de capacitação e posterior reação acrossómica ou na capacidade de penetração no ovócito (Yanagida *et al.*, 1999, Griffiths *et al.*, 2000, Group, 2007). Esta técnica também permitiu a realização de estudos genéticos como o Diagnóstico Genético Pré-Implantação (DGPI) através da aspiração de células da

trofoectoderme (TE), permitindo assim evitar a contaminação por DNA estranho no caso de testes baseados em PCR.

As duas últimas décadas foram marcadas por várias mudanças importantes na prática da infertilidade (Brugo-Olmedo *et al.*, 2001, Bavister, 2002), reflectindo-se na estimulação hormonal da mulher para a recolha de ovócitos, na cultura de embriões e na seleção dos melhores para a transferência (Drakopoulos *et al.*, 2016). A estimulação ovárica controlada foi um dos procedimentos que mudou a prática clínica dos ciclos mono-foliculares naturais para os ciclos de tratamento por múltiplos folículos. O aumento do número de folículos e, conseqüentemente, do número de ovócitos, permitiu melhorar as taxas de gravidez em mulheres submetidas a FIV / ICSI, não apenas aumentando o número de embriões disponíveis, mas também a cultura destes, possibilitando a seleção dos melhores para transferência (Drakopoulos *et al.*, 2016).

1.3 Desenvolvimento Embrionário: Avaliação da qualidade embrionária

A etapa de incubação e monitorização do desenvolvimento embrionário constitui a última e mais importante fase de todo o procedimento laboratorial, visto que na fase de cultura ocorrem todos os marcos de desenvolvimento que determinam a qualidade e o destino dos embriões. Para melhorar as taxas de sucesso de implantação e gravidez têm sido usualmente transferidos dois embriões. No entanto, o estudo e entendimento das necessidades metabólicas dos embriões ao longo do desenvolvimento embrionário têm permitido grandes melhorias nas condições de cultura utilizadas nos laboratórios (Scott, 2003b). Essa cultura e monitorização é uma etapa crucial não só para o sucesso nos ciclos de RHA mas também permite a seleção dos melhores embriões para transferir (Cruz *et al.*, 2011). Este facto tem permitido assim a seleção e transferência de apenas um embrião de alta qualidade e com maior potencial de implantação, o que tem levado a uma diminuição de gravidez múltipla (Kovacs, 2014, Adamson *et al.*, 2016). Associado à gravidez múltipla, existe um risco mais elevado de baixo peso à nascença e prematuridade mas também de complicações na gravidez como a diabetes gestacional, anomalias placentárias e complicações hipertensivas (Bergh, 2005, Grafodatskaya *et al.*, 2013). Assim, torna-se essencial otimizar a seleção de embriões para garantir a transferência de um único que tenha a probabilidade de se desenvolver num feto viável (Aguilar *et al.*, 2014).

O potencial embrionário para implantação e gravidez bem-sucedida tem sido tradicionalmente avaliado através de uma observação ao microscópico com o uso de um sistema de classificação baseado na morfologia (Basile *et al.*, 2015, Goodman *et al.*, 2016). Todas as etapas do desenvolvimento embrionário desde a fertilização até à formação dos pronúcleos, singamia, clivagem precoce, divisões celulares e formação do blastocisto, apresentam uma série de características que são indicadores do potencial de desenvolvimento e de implantação com grande utilidade na seleção dos embriões (Racowsky *et al.*, 2003, Cruz *et al.*, 2011, Herrero & Meseguer, 2013, Desai *et al.*, 2014, Kirkegaard *et al.*, 2015, Adamson *et al.*, 2016). Por outro lado, a existência de fragmentação, multinucleação, vacúolos e anomalias citoplasmáticas também demonstram ter uma relação significativa com o potencial de implantação (Jurisicova *et al.*, 1996, Alikani *et al.*, 1999, Royen *et al.*, 2003, Fancsovits *et al.*, 2011). A avaliação da morfologia embrionária tem sido o método mais utilizado para a seleção de embriões por existirem parâmetros facilmente avaliáveis por um embriologista e preditivos da qualidade embrionária (Racowsky *et al.*, 2003). Neste sentido, foi

desenvolvido um sistema de classificação que relaciona a morfologia dos embriões em cada fase do desenvolvimento com o seu potencial de implantação (Alpha & ESHRE, 2011). Esses critérios foram estabelecidos num consenso realizado em Istambul em 2010 com o objetivo de identificar e padronizar parâmetros e terminologia comuns para a classificação de ovócitos, zigotos e embriões que seriam passíveis de aplicação rotineira em qualquer laboratório (Alpha & ESHRE, 2011, Lagalla *et al.*, 2015).

Os embriões podem ser mantidos em cultura e transferidos ao 2º, 3º ou 5º dia de desenvolvimento, no entanto, os embriões em fase de clivagem, ou seja, ao 2º ou 3º dia, ainda estariam nas trompas de Falópio e não no útero (Gardner & Lane, 1997, Chen *et al.*, 2003). Sendo assim, a transferência ao 5º dia tem sido uma prática mais recorrente, apresentando também maiores taxas de implantação e gravidez (Gardner & Lane, 1997, Balaban *et al.*, 2001, Richter *et al.*, 2001, Kovacs, 2014, Kieslinger *et al.*, 2016). Prolongar o período de cultura até à fase de blastocisto também permite avaliar o desenvolvimento embrionário até à ativação do genoma do zigoto e detetar alterações genéticas ou metabólicas (Gardner & Lane, 1997, Balaban *et al.*, 2001, Hardarson *et al.*, 2012). Contudo, é importante salientar que em todas estas fases do desenvolvimento se observam parâmetros preditivos da qualidade embrionária.

1.3.1 Avaliação da fertilização

Após ocorrer a interação do espermatozóide com o ovócito inicia-se um conjunto de processos dinâmicos e complexos como a fusão das membranas dos gametas, ativação do ovócito, formação dos pronúcleos (PN) masculino e feminino e migração gradual destes para uma posição central no ovócito, que levam à fertilização e à formação do zigoto (Magli *et al.*, 2012, Aguilar *et al.*, 2014, Elder & Dale, 2020). Segundo os critérios de Istambul as características morfológicas do pré-zigoto devem ser avaliadas 17±1 horas após inseminação (Alpha & ESHRE, 2011), apesar de comparativamente esta ocorrer num menor período de tempo com ICSI do que na FIV convencional.

A fertilização é avaliada pela presença de dois glóbulos polares (GP) e de dois PN justapostos, posicionados centralmente, com membranas definidas e de tamanho semelhante (Magli *et al.*, 2012, Aguilar *et al.*, 2014). Para além disso, o pré-zigoto ideal deve apresentar uma morfologia esférica, com citoplasma homogêneo, e os PN devem conter corpos precursores de nucléolos (CPN), com tamanho equivalente e em igual número, idealmente alinhados equatorialmente na região de justaposição das membranas dos PN (Figura 1) (Alpha & ESHRE, 2011).



Figura 1. Imagem ilustrativa de um pré-zigoto ideal, contendo 2 GP no EPV e 2 PN centrais com os respectivos CPN (Papale *et al.*, 2012).

Vários estudos têm demonstrado que nesta fase do desenvolvimento o número, tamanho e alinhamento dos PN no eixo polar, o padrão de distribuição dos CPN e a aparência do citoplasma (Scott *et al.*, 2000, Scott, 2003b, Rienzi *et al.*, 2005) são características fundamentais para a conclusão da primeira divisão de clivagem e para um desenvolvimento normal, apresentando um efeito significativo na taxa de progresso até à fase de blastocisto (Gardner, 1996, Edwards & Beard, 1997, Garelo *et al.*, 1999, Scott *et al.*, 2000, Gardner, 2001). Os embriões que não alcançam uma orientação pronuclear correta podem exibir anomalias de clivagem, sendo traduzidas numa morfologia deficiente, clivagem desigual ou fragmentação (Garelo *et al.*, 1999).

1.3.2 Avaliação dos pronúcleos

Como já vimos anteriormente, a presença de dois PN indica-nos o sucesso da inseminação ovocitária, no entanto, a sua ausência não indica necessariamente uma falha na fertilização (Payne *et al.*, 1997). Em alguns casos, o ovócito pode ter sido corretamente fertilizado, contudo pode apresentar uma alteração no tempo de formação ou fusão dos PN, levando à formação de pré-zigotos com 2GP no espaço perivitelino (EPV) e apenas 1PN (Payne *et al.*, 1997, Magli *et al.*, 2012). Estes casos estão muitas vezes relacionados com alterações endócrinas ou morfológicas dos ovócitos ou má qualidade espermática (Elder & Dale, 2020). Os embriões resultantes podem apresentar um correto desenvolvimento, embora com uma maior incidência de aneuploidias comparativamente aos embriões com 2PN (Magli *et al.*, 2012).

A presença de 1PN também pode ser resultado de erros no processo de fertilização. Nesses casos, o ovócito resultante pode ter origem partenogenética, apresentando um conjunto haplóide de cromossomas e normalmente 1GP no EPV (Figura 2b). Deste modo, estes pré-zigotos não devem ser transferidos por serem haplóides (Munné & Cohen, 1998, Magli *et al.*, 2012). Por outro lado, falhas no processo de fertilização podem dar origem a pré-zigotos triploides com 3 ou mais PN (Figura 2c), sendo que estas falhas estão dependentes da técnica utilizada (Munné & Cohen, 1998). Nos casos de ICSI, a existência de 3PN pode ser devido à falha na extrusão do segundo GP, observando-se assim pré-zigotos com 3PN e 1GP. Quando é realizada FIV, podem ocorrer falhas no bloqueio da polispermia desencadeada pelo ovócito, permitindo a entrada de mais do que um espermatozóide (Sachs *et al.*, 2000). Nestes casos observam-se 2GP no EPV e os zigotos têm capacidade de clivagem, sendo por isso essencial fazer-se a avaliação da fertilização num período de tempo em que seja possível detetar a presença dos PN (Magli *et al.*, 2012). No entanto, também é importante notar que, a presença de vários PN pode ser devido a citocinese com falhas ou à penetração de um espermatozóide binucleado (Magli *et al.*, 2012).

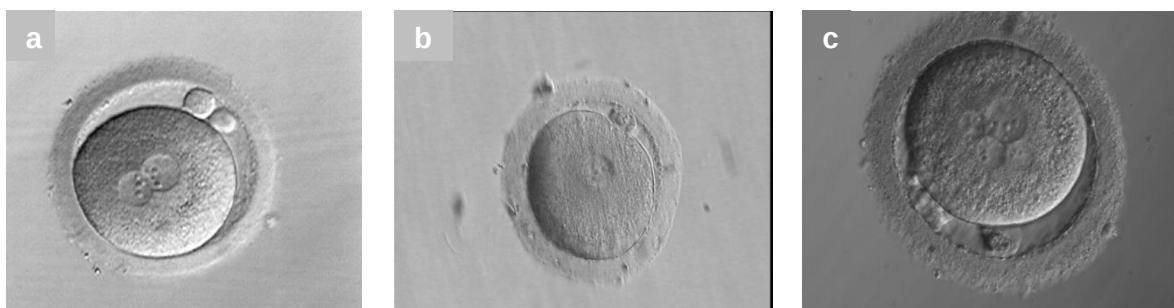


Figura 2. Imagens de pré-zigotos e avaliação do número de PN. (a) Pré-zigoto com 2 PN e 2GP no EPV. (b) Pré-zigoto com 1PN e apenas 1GP no EPV; (c) Pré-zigoto com 4PN e 1GP. Adaptado de (Papale *et al.*, 2012).

Alguns estudos demonstraram que o tamanho dos PN está dependente dos gâmetas. Durante a espermatogénese, o núcleo dos espermatozoides é repleto de protaminas. A associação do DNA nuclear com este aminoácido altamente carregado promove a condensação do núcleo e repressão da sua atividade. No entanto, a descondensação da cromatina é uma etapa crucial na fertilização. Para tal, ocorre a substituição de protaminas por histonas sob o controle de fatores de descondensação do ovócito. Portanto, o tamanho do PN masculino depende tanto da estrutura nuclear do espermatozoide como da capacidade do ovócito de induzir a descondensação ao libertar níveis adequados de glutathione (Elder & Dale, 2020). Os PN normalmente apresentam tamanho semelhante, embora o PN feminino possa ser ligeiramente mais pequeno. A presença de PN com diâmetro menor que o normal (Figura 3a), no momento da verificação da fertilização, pode ser um indicador de um atraso na fertilização, possivelmente devido à imaturidade do ovócito ou a anomalias nos gâmetas, levando a que os embriões resultantes apresentem um baixo potencial de desenvolvimento e um alto grau de aneuploidia (Sadowy *et al.*, 1998, Munné & Cohen, 1998, Scott *et al.*, 2000, Scott, 2003a, Scott, 2003b). Diferenças significativas no tamanho dos PN (Figura 3b), presença de micronúcleos ou PN fragmentados estão associados a anomalias cromossómicas e consequentemente menor potencial de desenvolvimento (Gianaroli *et al.*, 2003).

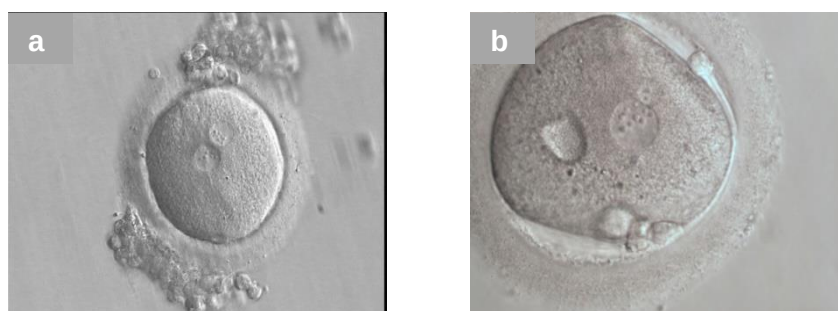


Figura 3. Imagens ilustrativas de pré-zigotos com PN de tamanhos diferentes. (a) Pré-zigoto com PN menores do que o normal; (b) Pré-zigoto com um PN de tamanho inferior em relação ao outro de diâmetro normal. Adaptado de (Papale *et al.*, 2012).

Para que o desenvolvimento embrionário ocorra corretamente, é essencial o alinhamento dos PN relativamente aos GP. Quando se dá a extrusão do segundo GP, após a entrada do espermatozoide e ativação de ovócito, o eixo polar é estabelecido e os microtúbulos, organizados pelos centríolos masculinos (Nagy *et al.*, 2003), promovem o alinhamento dos PN paralelamente ao plano dos GP (Figura 4a) (Scott,

2003b). De seguida, os PN sofrem rotações que os permitem posicionar-se perpendicularmente ao plano dos GP (Figura 4b) (Garello *et al.*, 1999, Gianaroli *et al.*, 2003). Este alinhamento dos PN justapostos e numa posição central é necessário para a formação de eixos polares na singamia e subsequente correta divisão de clivagem e desenvolvimento normal (Edwards & Beard, 1997, Payne *et al.*, 1997, Scott, 2003b).

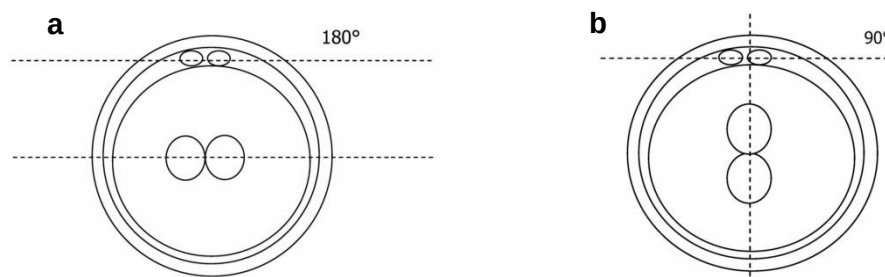


Figura 4. Imagens ilustrativas do alinhamento dos PN relativamente ao plano dos GP. (a) Diagrama de pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, paralelos ao plano dos GP; (b) Diagrama de pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, perpendiculares ao plano dos GP (Papale *et al.*, 2012).

A posição dos PN tem um efeito relevante no primeiro plano de clivagem que normalmente atravessa o eixo pronuclear (Scott, 2003b). Na maioria dos pré-zigotos com PN posicionados centralmente, a primeira clivagem ocorre corretamente, dando origem a embriões com desenvolvimento normal. Devido à dinâmica dos movimentos dos PN no citoplasma, a sua orientação no eixo polar varia dependendo da progressão da rotação em direção ao estado final que determina o primeiro plano de clivagem. Quando os PN não estão sobrepostos e posicionados centralmente no citoplasma ou quando os GP não estão alinhados em relação aos PN pode ocorrer uma clivagem anormal do embrião ou mesmo paragem do desenvolvimento (Gianaroli *et al.*, 2003, Alpha & ESHRE, 2011). Nos casos dos PN estarem posicionados na periferia, a clivagem ocorre de acordo com o eixo pronuclear e resulta frequentemente em morfologia anormal, clivagem e paragem do desenvolvimento (Elder & Dale, 2020).

Deste modo, para que haja um correto desenvolvimento embrionário, os GP devem estar próximos, caso contrário prevê-se um baixo potencial de desenvolvimento com clivagem desigual ou fragmentação, devendo-se sobretudo a uma incorreta orientação dos PN e consequente elevado grau de perturbação do citoplasma (Elder & Dale, 2020).

A avaliação dos PN tem apresentado um importante papel como prognóstico da competência embrionária e vários estudos têm demonstrado que embriões que apresentem o padrão ideal descrito de PN apresentam um maior potencial de implantação e maiores taxas de gravidez clínica (Balaban *et al.*, 2001). Tendo em conta os critérios descritos anteriormente, durante o consenso de Istambul foi desenvolvido um sistema de classificação de PN em três categorias: simétricos, não simétricos e anormais, baseado na morfologia dos PN e CPN (Alpha & ESHRE, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1. Sistema de classificação de PN de pré-zigotos tendo em conta a sua organização espacial e o número e alinhamento dos CPN, segundo os critérios do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011).

Categoria	Classificação	Descrição
1	Simétrico	PN com igual número de CPN de tamanho semelhante quer alinhados na justaposição dos PN, quer igualmente dispersos nos dois PN
2	Não simétrico	Todos os outros arranjos e organizações, tanto dos PN como dos seus CPN, incluindo PN periféricos.
3	Anormal	PN com apenas um CPN ou nenhum

1.3.3 Avaliação dos corpos precursores de nucléolos

O potencial de desenvolvimento embrionário está relacionado com o número, tamanho e posição dos PN mas também com a presença, padrão e número de CPN (Balaban *et al.*, 2001).

As células que estão em mitose têm no seu núcleo nucléolos. Estes são locais de síntese de pré-rRNA e estão localizados nas regiões dos cromossomas que contêm os genes que codificam o RNA ribossómico (rRNA), sendo este necessário para o processo de tradução quando o genoma embrionário se torna totalmente ativado (Gianaroli *et al.*, 2003, Kyogoku *et al.*, 2014). Os nucléolos formam-se a partir de centros funcionais, os corpos precursores de nucléolos (CPN) (Elder & Dale, 2020, Scott, 2003b). No momento da formação dos PN, os CPN começam a surgir e, à medida que a cromatina se distribui de forma polarizada, estes alinham-se. Durante o processo de divisão celular, os CPN variam em número, tamanho e distribuição, acabando por se fundirem num único nucléolo que é responsável pela síntese de pré-rRNA, essencial na tradução do genoma embrionário (Scott, 2003b, Elder & Dale, 2020).

Assim, qualquer alteração nestes eventos pode comprometer o desenvolvimento embrionário. Apesar dos CPN não formarem nucléolos funcionalmente ativos durante a fase de zigoto (Kyogoku *et al.*, 2014), eles são utilizados como fator preditivo da viabilidade e qualidade do embrião (Tesarik & Greco, 1999, Elder & Dale, 2020). Sendo assim, foi desenvolvido um sistema de classificação de pronúcleos de Scott (Scott, 2003b, Scott, 2003a), ou *Zygote scoring* (*Z-scoring*), que tem por base parâmetros como o tamanho e alinhamento dos PN mas também avalia o número, tamanho e posição relativa dos CPN (Tabela 2).

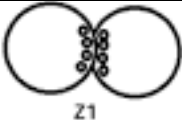
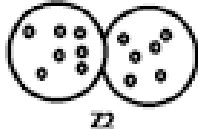
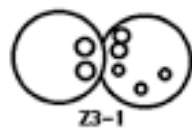
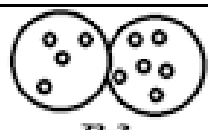
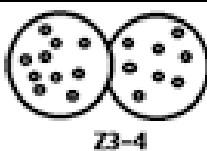
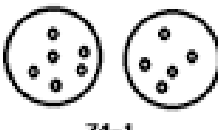
Idealmente um pré-zigoto deve ter entre 5 a 7 CPN em cada PN, com a mesma distribuição em cada um. Pelo *Z-scoring*, PN iguais e justapostos no centro do ovócito são classificados de Z1 a Z3, dependendo do padrão definido pelos CPN. A melhor classificação (Z1) é atribuída a PN com o mesmo número de CPN, do mesmo tamanho, e alinhados na zona de justaposição das membranas dos PN. A Z2 é atribuída quando os CPN são iguais, mas não estão alinhados nos dois pronúcleos. Todas as outras configurações dos CPN, relativamente ao alinhamento, número e tamanho destes, que sejam diferentes nos dois PN, obtêm a classificação Z3. Os pronúcleos sem CPN são designados PN “fantasma”. Por fim, é atribuída a classificação Z4, que é a de menor qualidade, aos PN de tamanho diferente, afastados ou na periferia do ovócito (Scott, 2003b).

Durante a progressão do ciclo celular é esperado que os CPN mudem em número, tamanho e distribuição, devendo ser sempre semelhantes entre os dois PN, quer se encontrem alinhados na região de justaposição ou dispersos de forma uniforme, e finalmente desapareçam pouco antes da singamia e do início da primeira divisão (Scott, 2003b). Os pré-zigotos que apresentem CPN de tamanho e número iguais alinhados na zona de junção dos dois PN ou dispersos são considerados de boa qualidade, estando relacionados com um correto desenvolvimento embrionário. Por outro lado, qualquer forma de desigualdade em tamanho e número de CPN ou no padrão de alinhamento, está associada a uma menor qualidade e consequentemente menor potencial de implantação e gravidez (Scott, 2003b).

No entanto, qualquer outra alteração nos CPN é considerada assimétrica, segundo a classificação do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011). CPN pequenos ou de diferentes tamanhos podem ser indicativos de defeitos funcionais nos nucléolos, com consequente síntese diminuída ou ineficaz de rRNA (Elder & Dale, 2020). PN com CPN em diferente número estão associados a alterações cromossômicas severas. No caso de se verificar apenas um ou nenhum CPN, os PN são classificados como anormais, estando associados a anomalias epigenéticas e de desenvolvimento (Scott, 2003b, Alpha & ESHRE, 2011, Elder & Dale, 2020).

Vários estudos têm demonstrado que a desigualdade em número, tamanho ou distribuição de CPN está correlacionada com o desenvolvimento anormal sendo assim dados que auxiliam na seleção de embriões. Por outro lado, a distribuição polarizada foi relacionada com uma incidência significativamente menor de anomalias cromossômicas, em comparação com a distribuição dispersa ou desigual (Balaban *et al.*, 2001, Coskun *et al.*, 2003, Ebner *et al.*, 2003).

Tabela 2. Sistema de classificação do *Zygote scoring* (Z-scoring), no qual o número, tamanho e alinhamento dos CPN são considerados. Adaptado (Scott, 2003b).

Score	Representação	Descrição
Z1		CPN alinhados na junção dos PN e em igual número e tamanho
Z2		CPN de tamanho e número igual, no entanto dispersos nos PN
Z3-1		Um dos PN com 1 ou 2 CPN não alinhados e o outro PN com 4 a 6 CPN dispersos
Z3-2		CPN alinhados num PN e no outro dispersos
Z3-3		Em cada PN há um número desigual de CPN
Z3-4		Dispersos pelos PN existe uma elevada quantidade de CPN mas de pequeno tamanho
Z4-1		PN afastados
Z4-2		PN de tamanho diferente
Z4-3		PN localizados na periferia do ovócito

1.3.4 Avaliação citoplasmática

Os pré-zigotos devem apresentar um citoplasma homogêneo, no entanto, a existência de um citoplasma heterogêneo é ainda de significância desconhecida não apresentando evidências suficientes que suportem um prognóstico negativo (Ebner *et al.*, 2003). Portanto, embora alguns estudos tenham relatado que anomalias citoplasmáticas graves afetem adversamente o potencial de desenvolvimento e implantação do embrião resultante (Kahraman *et al.*, 2000), ainda não há evidências claras que apoiem estes estudos. Da mesma forma, a presença de uma estrutura translúcida na periferia do citoplasma do ovócito fertilizado, conhecida como halo, ou de dimorfismos menores, como detritos no EPV ou ainda a presença de corpos refrateis no citoplasma, não demonstraram ser de valor prognóstico para o desenvolvimento dos embriões (Figura 5a) (Ebner *et al.*, 2003, Ebner *et al.*, 2005).

No entanto, a existência de anomalias mais severas, como agrupamentos de organelos (Figura 5b) pode ser indicativo de aneuploidias (Van Blerkom & Henry, 1992), sendo assim um preditor negativo das taxas de implantação e gravidez, embora a qualidade do embrião no estágio de clivagem aparentemente não seja afetada (Meriano *et al.*, 2001). Esta desorganização citoplasmática grave pode estar associada a um pH intracitoplasmático mais baixo e a um menor conteúdo de ATP (Ebner *et al.*, 2003).

A presença de pequenos vacúolos não está associada a nenhuma consequências biológica, no entanto, a existência de vacúolos de grandes dimensões pode interferir nos planos de clivagem, resultando num anormal desenvolvimento embrionário (Figura 5c) (Ebner *et al.*, 2005, Fancsovits *et al.*, 2011). Por este motivo, estes embriões não são considerados para transferência. No momento da verificação da fertilização e, especialmente, após a FIV, é extremamente importante avaliar cuidadosamente o citoplasma quanto à presença de agregados do retículo endoplasmático (RE) uma vez que estão associados a anomalias graves no embrião (Otsuki *et al.*, 2004, Ebner *et al.*, 2005).



Figura 5. Imagens exemplificativas de pré-zigotos com anomalias citoplasmáticas. (a) Pré-zigoto com morfologia citoplasmática normal e 2PN centrais e justapostos mas com um halo citoplasmático posicionado às 3 horas; (b) Pré-zigoto com 2PN localizados na periferia com uma grande agregação de organelos; (c) Pré-zigoto com 2PN centrais e justapostos, mas com dois grandes vacúolos imediatamente adjacente ao PN e corpos refrateis. Adaptado de (Papale *et al.*, 2012).

1.3.5 Singamia e Divisão Precoce

Como já foi referido neste trabalho, a avaliação da qualidade embrionária é essencial para selecionar os melhores embriões para transferir. Para atingir esse objetivo, muitos sistemas de classificação baseados nas características morfológicas do embrião em divisão foram desenvolvidos (Bączkowski *et al.*, 2004, Holte *et al.*, 2007). Esses sistemas de classificação são baseados na velocidade das divisões e em parâmetros morfológicos como o número de blastómeros, grau de fragmentação, simetria dos blastómeros, presença de multinucleação e grau de compactação (Rienzi *et al.*, 2005, Aguilar *et al.*, 2014).

Após a entrada do espermatozóide, os dois PN migram um para o outro e ocorre a quebra das membranas nucleares algumas horas antes do início da primeira divisão de clivagem (Elder & Dale, 2020). Assim, 23 ± 1 horas após a inseminação ocorre um processo designado por singamia que corresponde à conclusão da fertilização e à fusão dos PN tendo como resultado a formação de um zigoto diplóide que sofrerá a primeira divisão mitótica (Bączkowski *et al.*, 2004). O centrossoma astral contendo dois centríolos divide-se e posiciona-se em pólos opostos para estabelecer a bipolarização que controla a divisão celular (Elder & Dale, 2020). Os cromossomas dispõem-se na placa metafásica, seguindo-se a anáfase e telófase completando assim a primeira divisão mitótica, processo conhecido como divisão precoce (Bączkowski *et al.*, 2004, Basile *et al.*, 2015). Quando este processo ocorre antes das 26 ± 1 horas após ICSI ou antes das 28 ± 1 horas após FIV indica-nos que o embrião tem boa qualidade, elevada capacidade de desenvolvimento até à fase de blastocisto e elevadas taxas de gravidez (Elder & Dale, 2020). Após esta etapa, o zigoto continua a dividir-se por mitose, entrando na fase de clivagem (Iwata & Mio, 2016).

1.3.6 Avaliação de embriões em fase de clivagem: 2º e 3º dia

Os embriões na fase de clivagem variam do estágio de 2 células a mórula compactada composta por 8 a 16 células. A avaliação da qualidade embrionária nesta fase é feita através da observação dos embriões 43 a 45 horas após a inseminação, que corresponde ao 2º dia de desenvolvimento, e 67 a 69 horas após a inseminação, correspondendo ao 3º dia (Elder & Dale, 2020). O sistema de classificação de embriões na fase de clivagem é baseado no número, simetria e tamanho dos blastómeros, no grau de fragmentação e na presença de multinucleação (Rienzi *et al.*, 2005, Machtinger & Racowsky, 2013). De todas as características morfológicas avaliadas no estado de clivagem, o número de blastómeros é a característica com maior valor preditivo (Lundqvist *et al.*, 2001, Machtinger & Racowsky, 2013).

Embriões que apresentem taxas de divisão muito lentas ou muito rápidas poderão estar relacionados com anomalias cromossómicas, como mosaicismo ou aneuploidias, tendo assim um menor potencial de implantação (Rienzi *et al.*, 2005, Machtinger & Racowsky, 2013). Por outro lado, clivagens mais rápidas tendem a ter uma maior taxa de implantação e a seleção com base na velocidade de clivagem tem demonstrado aumentar a eficiência da implantação (Balaban *et al.*, 2001, Rienzi *et al.*, 2005).

Tabela 3. Tempo de observação e respetivo desenvolvimento expectável para cada fase do embrião em cultura (Alpha & ESHRE, 2011).

Processo observado	Horas após inseminação	Fase desenvolvimento esperada
Fertilização	17±1	Pronúcleos
Singamia	23±1	50% em singamia
Clivagem precoce	26 ± 1 (ICSI) 28 ± 1 (FIV)	2 Células
Embrião Dia 2	44 ± 1	4 Células
Embrião Dia 3	68 ± 1	8 Células
Embrião Dia 4	92 ± 1	Mórula
Embrião Dia 5	116 ± 1	Blastocisto

1.3.6.1 Número de blastómeros

Os embriões de boa qualidade devem exibir uma cinética e sincronia apropriadas nas divisões, ocorrendo estas a cada 18 a 20 h (Prados *et al.*, 2012, Elder & Dale, 2020). Estudos recentes demonstraram que o momento de cada clivagem e o tempo entre cada divisão celular são extremamente importantes e preditivos de uma boa qualidade embrionária (Machtinger & Racowsky, 2013). Sendo assim, o número de blastómeros que o embrião apresenta em cada fase do desenvolvimento é um fator preditivo essencial da capacidade de implantação e gravidez. Segundo os critérios definidos no consenso de Istambul, um embrião de boa qualidade deve apresentar 2 células no 1º dia (clivagem precoce) (26 ± 1 h pós-ICSI, 28 ± 1 h pós-FIV) (Figura 6a), 4 células no 2º dia (44 ± 1 h) (Figura 6b) e 8 células no 3º dia (68 ± 1 h) (Figura 6c) (Alpha & ESHRE, 2011). Alterações a este padrão, isto é, embriões com taxas de clivagem mais ou menos rápidas, apresentam menor potencial de sucesso de implantação e gravidez, como resultado de maior incidência de anomalias cromossômicas (Rienzi *et al.*, 2005, Magli *et al.*, 2007).



Figura 6. Imagens exemplificativas de embriões com número de células específico de cada fase do desenvolvimento. (a) Embrião no 1º dia de desenvolvimento com 2 células de tamanho igual, sem fragmentação; (b) Embrião no 2º dia de desenvolvimento com 4 células de tamanho igual, sem fragmentação; (c) Embrião no 3º dia de desenvolvimento com 8 células de tamanho igual, sem fragmentação. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012). Todos os embriões apresentados são considerados 'ideais' para as diferentes fases de clivagem, sem a presença de fragmentação nem de multinucleação.

1.3.6.2 Tamanho e simetria de blastómeros

O tamanho dos blastómeros depende da fase de clivagem mas também da regularidade e sincronismo das divisões celulares. A clivagem celular é considerada um indicador da qualidade do embrião e capacidade de desenvolvimento (Rienzi *et al.*, 2005). Assim, é esperado que os embriões com divisões simétricas e sincronizadas apresentem 2, 4, 8 ou 16 células de tamanho idêntico, sendo o tamanho das células progressivamente menor (Alpha & ESHRE, 2011). No entanto, os embriões podem apresentar outro número de células, sendo estas de tamanhos diferentes, pelo facto da fase de clivagem não estar completa por existir uma assincronia nas divisões. Esta clivagem desigual pode resultar numa distribuição desigual de moléculas citoplasmáticas, como proteínas e mRNAs, apresentando assim uma maior incidência de multinucleação e aneuploidias e consequentemente uma menor taxa de implantação (Hardarson *et al.*, 2001, Magli *et al.*, 2001, Rienzi *et al.*, 2005, Hardarson *et al.*, 2012).



Figura 7. Imagens ilustrativas de embriões em fase de clivagem com blastómeros de diferentes tamanhos. (a) Embrião com 3 células de igual tamanho; (b) Embrião com 5 células, 2 de menor tamanho e 3 maiores; (c) Embrião com 7 células, 4 de menor tamanho e 2 maiores. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

1.3.6.3 Fragmentação

Durante a divisão celular pode ocorrer a saída de pequenas porções de citoplasma, resultando na formação de fragmentos anucleados envolvidos por uma membrana celular, sendo este processo designado por fragmentação (Keltz *et al.*, 2006, Machtinger & Racowsky, 2013). Pela sua natureza, os fragmentos são difícil de se distinguir dos pequenos blastómeros, pelo que foi estabelecido que um fragmento deve ser considerado quando apresentar um diâmetro inferior a 45µm ou 40µm, para embriões de 2º ou 3º dia, respetivamente. A fragmentação é considerada um parâmetro essencial da avaliação do desenvolvimento embrionário e foi incluída em quase todos os sistemas de classificação de embriões (Keltz *et al.*, 2006). O grau de fragmentação é mais frequentemente expresso como a percentagem que este ocupa relativamente ao volume citoplasmático total. O grau relativo de fragmentação pode ser definido como leve quando a fragmentação é inferior a 10%; moderado quando a fragmentação tem valores entre 10 e 25% e severo quando superior a 25% do volume total (Alikani *et al.*, 1999, Machtinger & Racowsky, 2013).

Embriões com elevado grau de fragmentação apresentam taxas mais baixas de implantação e gravidez, presumivelmente devido à redução do citoplasma disponível para a divisão celular normal ou pela comunicação intercelular reduzida (Racowsky *et al.*, 2003, Keltz *et al.*, 2006, Holte *et al.*, 2007), enquanto que a presença de pequenas quantidades de fragmentação não têm um impacto negativo (Alikani *et al.*, 1999, Rienzi *et al.*, 2005). No entanto, embriões que apresentem um aumento de fragmentação durante o desenvolvimento podem não conseguir atingir a fase de blastocistos, bem como esse aumento de fragmentação pode influenciar a alocação de células durante a diferenciação (Garello *et al.*, 1999, Hardy *et al.*, 2003). A distribuição espacial dos fragmentos no espaço perivitelino (EPV) pode ser diferenciada em dois padrões, isto é, dispersa ou concentrada. Verificou-se que a aparência dispersa está correlacionada com um aumento da incidência de anomalias cromossómicas (Racowsky *et al.*, 2003, Magli *et al.*, 2007). A fragmentação é assim considerada um parâmetro essencial na avaliação dos embriões em desenvolvimento, pois a elevada e persistente fragmentação está relacionada com embriões de menor qualidade (Richter *et al.*, 2001).



Figura 8. Imagens exemplificativas de embriões em fase de clivagem com diferentes graus de fragmentação. (a) Embrião com 4 células de tamanho igual com fragmentação <10%; (b) Embrião com 4 células de tamanho igual, com fragmentação de 10-20%; (c) Embrião com 8 células de diferentes tamanhos, com fragmentação superior a 25%. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

1.3.6.4 Multinucleação

Durante o desenvolvimento embrionário também é de extrema importância a observação e avaliação dos núcleos dos blastómeros (Rienzi *et al.*, 2005). Idealmente, cada blastómero embrionário deve possuir um único núcleo, no entanto, podem surgir outros estados de nucleação. A multinucleação é definida pela presença de mais do que um núcleo em pelo menos um dos blastómeros (Jackson *et al.*, 1998, Royen *et al.*, 2003, Rienzi *et al.*, 2005) e pode ser avaliada tanto no embrião de 1º dia no estado de divisão precoce, como no 2º ou 3º dia durante a fase de clivagem, embora nesta fase a observação seja dificultada pela existência de um maior número de células com menor tamanho (Royen *et al.*, 2003, Alpha & ESHRE, 2011).

As possíveis causas de multinucleação incluem alteração nos mecanismos de citocinese, fragmentação parcial dos núcleos ou migração defeituosa dos cromossomas na anáfase mitótica. No entanto, a multinucleação de blastómeros também pode ser induzida por deficientes condições de cultura (Rienzi *et al.*, 2005).

A presença de multinucleação está associada a um anormal desenvolvimento embrionário e dimorfismos e também associada a uma taxa de formação de blastocistos significativamente mais baixa (Alikani *et al.*, 2000, Richter *et al.*, 2001). Embriões multinucleados estão associados a um nível aumentado de anomalias cromossómicas (Hardarson *et al.*, 2001, Agerholm *et al.*, 2008), bem como um risco aumentado de aborto espontâneo (Scott *et al.*, 2007). Esta anomalia é mais frequente em blastómeros de embriões com clivagem desigual do que em embriões com

blastómeros uniformemente clivados, uma vez que, a clivagem celular desigual pode resultar numa distribuição não equitativa do material genético e, assim, afetar negativamente as taxas de implantação e gravidez (Munné & Cohen, 1998, Jackson *et al.*, 1998, Hardarson *et al.*, 2001, Royen *et al.*, 2003).

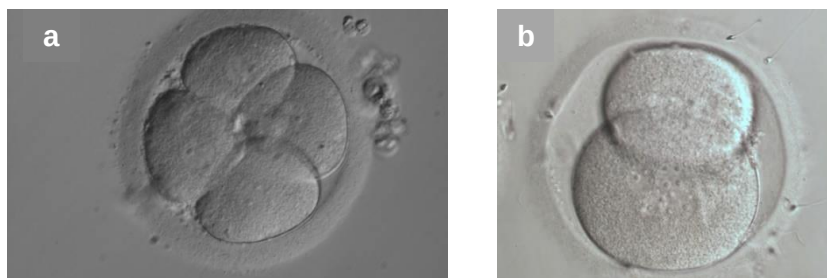


Figura 9. Imagens ilustrativas de embriões em fase de clivagem com ou sem multinucleação. (a) Embrião de 4 células mononucleadas de igual tamanho; (b) Embrião de 2 células de tamanho diferente com quatro núcleos num dos blastómeros. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

1.3.6.5 Anomalias citoplasmáticas

O citoplasma dos embriões em clivagem é normalmente homogêneo e de aparência clara ou finamente granular (Rienzi *et al.*, 2005, Elder & Dale, 2020). Anomalias citoplasmáticas, como granularidade citoplasmática ou a presença de vacúolos, podem ocorrer ocasionalmente, sendo um parâmetro que deve estar presentes na avaliação morfológica dos embriões de 2º e 3º dia (Elder & Dale, 2020). No entanto, o valor preditivo destas características para a qualidade do embrião ou para o potencial de implantação ainda não é claro (Desai *et al.*, 2000, Rienzi *et al.*, 2005, Ebner *et al.*, 2005).

Quando o citoplasma dos blastómeros se torna excessivamente escurecido por granulosidades centralizadas associadas a um halo cortical (Figura 10a), vários estudos sugerem que esses embriões têm um reduzido potencial de implantação podendo ocorrer degeneração. Da mesma forma, embriões com áreas alternadas de granulosidades e zonas claras dentro dos blastómeros são ainda mais propensos a degenerar (Figura 10b) (Veeck, 1999, Prados *et al.*, 2012). A vacuolização citoplasmática é provavelmente o dimorfismo citoplasmático mais comum em embriões, no entanto pouco se sabe sobre a sua incidência e papel no desenvolvimento embrionário. No entanto, acredita-se que a ocorrência de alguns vacúolos de pequenas dimensões não tenham importância significativa mas em casos

de extensa vacuolização pode ser prejudicial, principalmente para o desenvolvimento do embrião (Figura 10c) (Ebner *et al.*, 2005, Elder & Dale, 2020). Por outro lado, tem sido demonstrado que aglomerados de retículo endoplasmático liso são as características citoplasmáticas mais prejudiciais e que poderão estar relacionadas com menor taxa de implantação e gravidez (Ebner *et al.*, 2005).

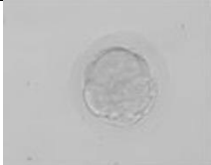


Figura 10. Imagens ilustrativas de embriões em fase de clivagem com anomalias citoplasmáticas. (a) Embrião de 2 células com um halo claro em ambos os blastómeros, caracterizado por granularidade centralizada associada à ausência de organelos no córtex periférico; (b) Embrião de 4 células com uma distribuição anormal de organelos levando a zonas granulosas em cada célula; (c) Embrião de 2 células com grandes vacúolos em ambos os blastómeros e 15% de fragmentação concentrada. Adaptado de (Prados *et al.*, 2012).

1.3.7 Avaliação de embriões em fase de mórula: 4º dia

No 4º dia do desenvolvimento embrionário começam a surgir adesões entre as células devido à ativação de uma proteína de adesão celular, a E-caderina, iniciando-se o processo de compactação (Rienzi *et al.*, 2005, Elder & Dale, 2020). Este processo permite que o embrião se torne numa massa indistinguível de células, designada de mórula. Uma mórula de boa qualidade deve ser composta por 16 a 32 blastómeros e todos eles devem ser incluídos no processo de compactação (Tao *et al.*, 2002, Fabozzi *et al.*, 2016). Este processo está associado à ativação do genoma embrionário (Desai *et al.*, 2000), portanto, quando ocorre, é considerado um bom sinal, demonstrando que o embrião apresenta capacidade de continuar o seu desenvolvimento (Tao *et al.*, 2002, Hardarson *et al.*, 2012). De seguida, a mórula entra no processo de blastulação, que consiste no aparecimento de uma cavidade com fluido e no processo de diferenciação celular. Foi estabelecido no consenso de Istambul que um embrião de 4º dia é considerado de boa qualidade se todas as células forem incluídas na mórula. Já os embriões nos quais algumas células ou fragmentos são excluídos são considerados de menor qualidade e consequentemente têm uma probabilidade mais reduzida de implantação (Alpha & ESHRE, 2011, Fabozzi *et al.*, 2016). Na tabela 4 estão apresentados os diferentes graus atribuídos aos embriões em fase de mórula, segundo os critérios definidos pelo consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011), com a respetiva descrição.

Tabela 4. Sistema de classificação de embriões no 4º dia de desenvolvimento. Adaptado de (Alpha & ESHRE, 2011).

Grau	Classificação	Descrição	Imagem da mórula
1	Boa qualidade	Compactação que envolveu todo o volume do embrião	
2	Qualidade razoável	Compactação que envolveu a maioria do volume do embrião.	
3	Má qualidade	Compactação desproporcional, que envolveu menos de metade do embrião, com 2 ou 3 blastómeros distinguíveis.	

1.3.8 Avaliação de embriões em fase de blastocisto: 5º dia

Após a compactação do embrião, começa a ocorrer uma acumulação de fluido que irá provocar o aparecimento de uma cavidade, dando origem ao blastocélio. À medida que o fluido no interior aumenta, ocorre simultaneamente um aumento do número de células, e esta combinação permite a expansão progressiva do blastocisto e consequentemente uma diminuição da espessura da zona pelúcida (ZP). Deste modo, por volta do 5º dia, o embrião atinge a fase de blastocisto (Hardarson *et al.*, 2012).

A transferência de embriões no estágio de clivagem era a prática mais comum quando realizadas as técnicas de RHA devido às dificuldades em cultivar embriões até à fase de blastocisto, pois os meios de cultura utilizados não eram complexos e não apoiavam completamente o normal desenvolvimento. No início dos anos 90, o conhecimento dos requisitos metabólicos do embrião em desenvolvimento aumentou e foram introduzidas as técnicas de co-cultura e o meio sequencial (Rienzi *et al.*, 2005, Hardarson *et al.*, 2012). Isso aumentou drasticamente a proporção de embriões que se mantinham em cultura até ao 5º dia de desenvolvimento. O principal objetivo da cultura de blastocistos foi permitir uma melhor seleção de embriões após a ativação genómica (Balaban *et al.*, 2006) e assim selecionar o melhor embrião com uma consequente redução no número de embriões transferidos e a correspondente redução na incidência de várias gestações (Balaban *et al.*, 2000, Hardarson *et al.*, 2012).

A avaliação da qualidade do embrião em fase de blastocisto deve ser realizada 116 ± 2 horas após inseminação e deve ser avaliado o grau de expansão do blastocisto e morfologia, organização da massa celular interna (MCI) e da trofoectoderme (TE) (Alpha & ESHRE, 2011, Hardarson *et al.*, 2012). A formação de blastocistos é um processo muito dinâmico, sendo que o tempo de desenvolvimento até ao estágio expandido é indicativo da viabilidade (Rienzi *et al.*, 2005). Foi assim desenvolvido um sistema de classificação de blastocistos que permite uma melhor seleção de embriões com maior potencial de implantação (Balaban *et al.*, 2006).

1.3.8.1 Grau de expansão do blastocisto

O blastocisto pode apresentar diferentes fases de expansão, podendo encontrar-se mais ou menos expandido. O grau de expansão do blastocisto pode ser dividido em blastocisto inicial (1) (Figura 11a), blastocisto (2) (Figura 11b), blastocisto expandido (3) (Figura 11c) e blastocisto em eclosão ou eclodido (4) (Figura 11d e 11e). Um blastocisto de grau 1 apresenta o blastocélio pouco desenvolvido; no de grau 2 o blastocélio preenche completamente o embrião; no de grau 3 o blastocélio é maior do que o volume inicial do embrião apresentando uma ZP mais fina e por fim, um blastocisto de grau 4 encontra-se em eclosão ou completamente eclodido (Alpha & ESHRE, 2011, Hardarson *et al.*, 2012). O grau de expansão do blastocisto está intimamente associado ao sucesso da transferência, sendo que quanto maior o grau de expansão do blastocisto maior será o potencial de implantação (Shapiro *et al.*, 2001, Balaban *et al.*, 2006, Shapiro *et al.*, 2008, Lagalla *et al.*, 2015).

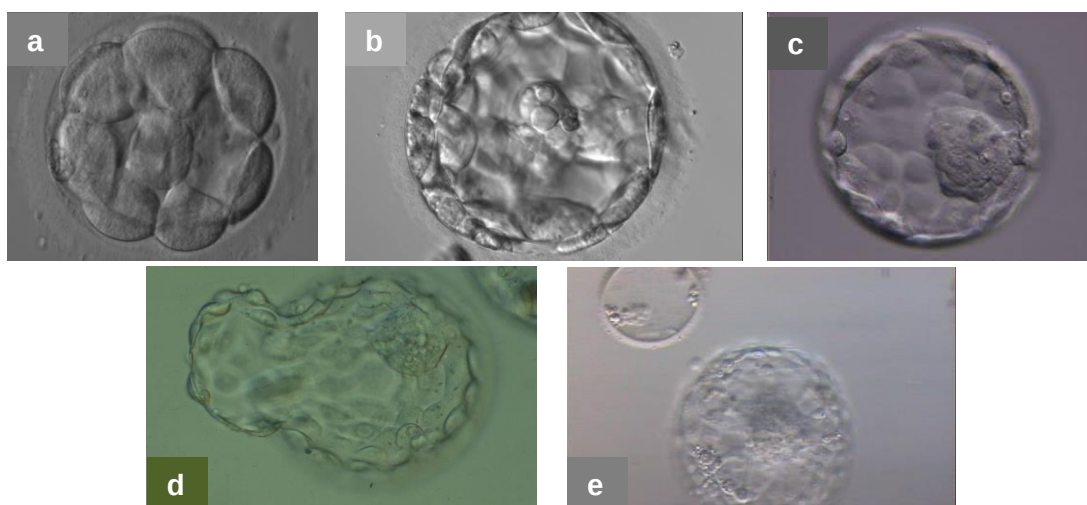


Figura 11. Imagens ilustrativas de blastocistos em diferentes fases de expansão. (a) Blastocisto inicial (Grau 1) com uma cavidade que ocupa cerca de 50% do volume do embrião; (b) Blastocisto de Grau 2; (c) Blastocisto expandido (Grau 3: 1: 1), mostrando uma MCI composta por muitas células compactadas firmemente; (d) Blastocisto em eclosão (Grau 4: 1: 1), evidenciando uma boa MCI e TF; (e) Blastocisto eclodido (Grau 4: 1: 1), completamente livre da ZP. Adaptado de (Hardarson *et al.*, 2012).

1.3.8.2 Massa celular interna

Quando o blastocisto atinge um maior grau de expansão, pode ser feita uma distinção clara entre as duas populações celulares recém-formadas (Hardarson *et al.*, 2012). As células externas do blastocisto são chamadas células da trofoectoderme (TE) e as células localizadas no interior, geralmente formando um aglomerado celular num dos pólos, constituem a massa celular interna (MCI). A MCI vai dar origem ao embrião propriamente dito e às estruturas embrionárias associadas (Hardarson *et al.*, 2012). Morfologicamente, a MCI pode variar de muito grande com células compactadas a quase inexistente com células pouco ligadas. Deste modo, esta estrutura pode ser classificada em três categorias morfológicas: categoria 1 ou boa se for proeminente, bem definida, com muitas células compactadas e ligadas entre si (Figura 12a); categoria 2 ou razoável se for bem definida, mas com muitas células mal agrupadas (Figura 12b) e por fim de categoria 3 ou má se for mal definida e com poucas células (Figura 12c) (Alpha & ESHRE, 2011, Hardarson *et al.*, 2012).

O número de células que compõem a MCI pode variar, bem como a sua morfologia. Vários estudos têm mostrado uma correlação positiva entre a aparência morfológica da MCI, como o seu tamanho e forma, e o desfecho clínico, com a hipótese de que quanto maior a MCI, maior a probabilidade de a implantação ser bem-sucedida (Balaban *et al.*, 2000, Richter *et al.*, 2001, Shapiro *et al.*, 2001). Estudos também indicam que áreas necróticas nos blastocistos e, em particular na MCI, estão associadas a um potencial de implantação menor e que a forma “ideal” da MCI em relação ao potencial de implantação é a forma mais oval do que a mais redonda ou mais alongada (Richter *et al.*, 2001).



Figura 12. Imagens ilustrativas de blastocistos com MCI de diferentes graus. (a) Blastocisto expandido (Grau 3:1:1), mostrando uma MCI proeminente, constituída por muitas células coesas. (b) Blastocisto expandido (Grau 3:2:1) mostrando uma MCI compacta, constituída por poucas células; (c) Blastocisto expandido (Grau 4: 3: 3) sem MCI claramente identificável. A TE é constituída por poucas células dispersas que não formam um epitélio coeso. Adaptado de (Hardarson *et al.*, 2012).

1.3.8.3 Trofoectoderme

As células da TE vão ficando claramente diferenciadas das células da MCI à medida que o blastocisto começa a expandir. O papel da TE na fase inicial do desenvolvimento do blastocisto ainda não é totalmente conhecido, contudo desempenha uma função importante na determinação da MCI (Elder & Dale, 2020). No entanto, a função da TE é melhor compreendida durante e após a implantação, pois desempenha um papel fundamental na aposição, adesão e invasão do endométrio, permitindo assim que o blastocisto se implante no útero (Hardarson *et al.*, 2012). Por outro lado, as células funcionais da TE estão ativamente envolvidas na saída do embrião da ZP, permitindo a eclosão (Sathananthan *et al.*, 2003). Estas células irão dar origem às membranas extra-embrionárias fetais como a placenta (Hardarson *et al.*, 2012). A TE também é avaliada de uma forma semelhante à MCI, ou seja, pelo número e coesão das células de acordo com três categorias diferentes. Pode ser considerada de categoria 1 ou boa se apresentar um elevado número de células formando um epitélio coeso (Figura 13a), categoria 2 ou razoável se apresentar poucas células formando um epitélio disperso (Figura 13b) ou categoria 3 ou má se apresentar poucas células (Figura 13c) (Alpha & ESHRE, 2011, Hardarson *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstraram que a classificação das células da TE pode estar associada à taxa de implantação (Zaninovic *et al.*, 2001, Ahlström *et al.*, 2011), enquanto outras publicações não encontraram relação entre o grau e a viabilidade da TE (Richter *et al.*, 2001).

Deste modo, o blastocisto “ideal” deve apresentar-se expandido, com uma MCI proeminente, bem definida, com as células bem compactadas, e uma TF com um número elevado de células, formando um epitélio coeso. Sendo assim, segundo o sistema de classificação de Istambul, um embrião com estas características é classificado como 3:1:1 (Alpha & ESHRE, 2011). Os blastocistos podem também apresentar ciclos de contração e de reexpansão. (Alpha & ESHRE, 2011). De acordo com a literatura, a contração do blastocisto afeta negativamente o processo natural de eclosão, existindo assim uma correlação negativa entre ciclos de contração e taxa de implantação (Basile *et al.*, 2015).

Muitos investigadores têm mostrado que a transferência de blastocistos com classificação máxima, isto é, avaliações altas para todos os três parâmetros, apresentam as maiores taxas de implantação (Gardner *et al.*, 2000, Balaban *et al.*, 2001, Balaban *et al.*, 2006, Ahlström *et al.*, 2011).

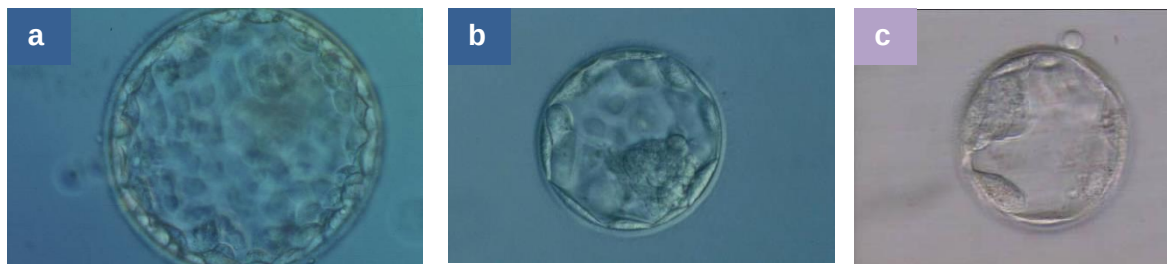


Figura 13. Imagens ilustrativas de blastocistos com TE de diferentes graus. (a) Blastocisto de eclosão precoce (Grau 5: 1: 1), com muitas células formando um epitélio coeso. A MCI não é claramente visível; (b) Blastocisto expandido (Grau 4: 1: 2), com células da TE de vários tamanhos, algumas células bastante grandes sendo particularmente evidentes na borda do blastocisto; (c) Blastocisto de eclosão precoce (Grau 5: 1: 3) com a TE muito dispersa e com poucas células, não formando um epitélio coeso. Adaptado de (Hardarson *et al.*, 2012).

1.4 Tecnologia *time-lapse*

A monitorização diária pós-inseminação é de extrema importância para determinar tanto a qualidade dos embriões como a sua progressão, tendo em conta critérios pré-definidos para a classificação em vários parâmetros. Como demonstrado no capítulo anterior, a classificação de embriões tem sido tradicionalmente feita através de uma observação ao microscópico com o uso de um sistema de classificação baseado na morfologia (Basile *et al.*, 2015, Goodman *et al.*, 2016, Armstrong *et al.*, 2019). Este método de avaliação embrionária permite somente a obtenção de imagens estáticas no tempo, podendo estas não ser inteiramente representativas de todos os acontecimentos celulares ocorridos até àquele momento (Racowsky *et al.*, 2015). Por outro lado, o desenvolvimento embrionário segue uma sequência coordenada de eventos e fenómenos celulares marcantes em intervalos de tempo muito específicos, tornando assim limitada uma avaliação baseada apenas em aspetos morfológicos (Kirkegaard *et al.*, 2013, Aguilar *et al.*, 2014, Kovacs, 2014). Para além disso, a observação microscópica exterior à estufa de incubação pode afetar o desenvolvimento embrionário e introduzir um fator de *stress* que pode levar à alteração de determinadas funções fisiológicas do embrião (Feuer & Rinaudo, 2012) por provocar variações das condições físico-químicas ótimas de cultura, como alterações ao nível da temperatura e pH, mas também das percentagens de CO₂ e O₂, não permitindo assim um número elevado de observações diárias (Kirkegaard *et al.*, 2012, Montag *et al.*, 2013, Desai *et al.*, 2014, Kovacs, 2014, Racowsky *et al.*, 2015). Tendo como objetivo a monitorização mais frequente dos embriões e o estudo de marcos importantes durante o desenvolvimento embrionário (Ciray *et al.*, 2014), mantendo um ambiente ideal de cultura, começaram a ser desenvolvidos sistemas de cultura especializados e tecnologias de aquisição de imagens que permitem uma monitorização contínua e o estudo combinado da morfologia e cinética (morfocinética) (Kaser & Racowsky, 2014, Kirkegaard *et al.*, 2015, Basile *et al.*, 2015, Armstrong *et al.*, 2015, Kieslinger *et al.*, 2016).

O conceito de morfocinética pode ser definido como a conjugação entre a duração precisa de um determinado evento do desenvolvimento embrionário com a morfologia do próprio embrião nesse momento (Monitoring, 2015, Armstrong *et al.*, 2019). Existem várias etapas que podem ser nomeadas, como a formação dos pronúcleos, singamia, clivagem precoce, divisões celulares mas também nas fases mais tardias de mórula ou blastocisto (Meseguer *et al.*, 2012, Desai *et al.*, 2014). Estes parâmetros morfocinéticos podem ser usados para estimar a viabilidade embrionária e

complementar os métodos atuais de seleção de embriões para aumentar as taxas de implantação e consequentemente de gravidez clínica (Meseguer *et al.*, 2012).

Deste modo surgiu a tecnologia de *time-lapse* que consiste num sistema de captura de imagens em intervalos de tempo curtos e definidos e em diferentes planos de focagem, por uma câmara fotográfica e microscópio incorporado (Kovacs, 2014). As imagens são posteriormente processadas e armazenadas, através de *softwares* disponibilizados em cada sistema, permitindo a formação de um vídeo que possibilita fazer uma análise retrospectiva detalhada de todos os eventos celulares e dos parâmetros morfocinéticos do embrião (Kirkegaard *et al.*, 2013, Kovacs, 2014, Racowsky *et al.*, 2015).

Sendo assim, este método de monitorização não invasivo permite diminuir a manipulação humana de embriões, bem como manter todas as condições ótimas de cultura (Racowsky *et al.*, 2015, Armstrong *et al.*, 2019), minimização a introdução de fatores de *stress* ambiental provocados pela exposição a condições diferentes das de incubação (Swain, 2013).

A implementação do *time-lapse* permite uma monitorização diária, contínua e sem perturbações de todas as etapas do desenvolvimento, oferecendo novos avanços no conhecimento da embriologia humana (Kaser & Racowsky, 2014, Milewski *et al.*, 2015) e a obtenção de mais informações sobre o momento das clivagens e a dinâmica das mudanças morfológicas (Kovacs, 2014). Esta tecnologia veio assim, revolucionar a transferência de embriões, permitindo a seleção e transferência de apenas um embrião que apresente maior qualidade, traduzindo-se assim num maior potencial de implantação (Kirkegaard *et al.*, 2012, Kovacs, 2014, Desai *et al.*, 2014).

Desta forma, estes sistemas avançados que integram condições de incubação estritamente controladas e estáveis com imagens ininterruptas e monitorização do desenvolvimento embrionário podem melhorar o resultado dos tratamentos de RHA, fornecendo condições de desenvolvimento estáveis, menos manuseio e mais informações para facilitar a seleção do embrião. (Meseguer *et al.*, 2012, Kieslinger *et al.*, 2016).

Vários estudos já têm demonstrado que, associado às vantagens desta tecnologia, a cultura e seleção de embriões nestes sistemas de monitorização melhoraram as taxas de implantação e gravidez (Meseguer *et al.*, 2012, Kirkegaard *et al.*, 2012, Kirkegaard *et al.*, 2013, Kovacs, 2014).

1.4.1 Geri+

Existem múltiplos aparelhos de *time-lapse* comercializados para a observação e monitorização do desenvolvimento embrionário (Kovacs, 2014). O sistema Geri+ consiste numa incubadora independente, com um sistema de *time-lapse* incorporado, que apresenta seis compartimentos individualizados com câmara própria, permitindo o desenvolvimento dos embriões de cada caso clínico de forma separada e proporciona também a manutenção de todas as condições ótimas de cultura, desde a fertilização até ao momento da transferência. Deste modo, as condições de cultura são mantidas de uma maneira mais constante e controlada (Kieslinger *et al.*, 2016). Este sistema utiliza iluminação de campo escuro permitindo assim observações mais precisas das membranas dos blastómeros (Kovacs, 2014, Racowsky *et al.*, 2015) e uma monitorização embrionária mais detalhada. Sendo assim, o sistema Geri+ é considerado um excelente modelo de monitorização embrionária, apresentando todos os seus componentes automatizados e bem organizados.

A cultura dos embriões neste aparelho é feita nos discos Geri+ que apresentam dezasseis micro-poços onde são inseridos os embriões para cultura e monitorização. Para que haja uma boa qualidade da captação das imagens e consequentemente uma boa monitorização embrionária é de elevada importância que os discos Geri+ sejam posicionados de forma correta no interior das câmaras de incubação. O interior de cada câmara apresenta um ambiente controlado de 6% de CO₂, 5% de O₂ e 37°C de temperatura. Este sistema tem a capacidade de restabelecer rapidamente os valores de temperatura e composição de gases, demorando apenas um minuto a repor a temperatura e três minutos a concentração de CO₂ após a abertura da câmara. Caso haja alguma alteração acentuada nestes parâmetros é acionado um sistema de sinalização que emite um alerta sonoro. Este aparelho também apresenta filtros HEPA que permitem uma filtração adequada das partículas de gases para um ambiente o mais estéril possível (Podsiadly *et al.*, 2016, Picou *et al.*, 2019).

Através da página inicial do Geri+ é possível aceder a cada uma das câmaras individualmente e deste modo visualizar com mais pormenor os embriões em desenvolvimento. Cada câmara de incubação está identificada com o nome da paciente e permite uma visão detalhada dos dezasseis micro-poços e dos respetivos embriões de cada caso.

A câmara fotográfica deste sistema é altamente especializada, apresentando uma resolução de dois *pixels* por μm e iluminação LED (*Light Emitting Diode*) com um comprimento de onda de 591 nm que não prejudica os embriões. As *frames* de cada

etapa do desenvolvimento embrionário são captadas em intervalos de tempo de cinco minutos e em onze planos focais distintos. Neste dispositivo também é possível alterar o número de planos focais a serem considerados na captação da imagem e ajustar algumas propriedades como o contraste e o alinhamento da câmara em relação à posição do disco (Wininger *et al.*, 2019).

Ao introduzir os dados da paciente no aparelho Geri+ é fundamental indicar o tipo de tratamento que a paciente está a realizar, se uma FIV ou ICSI, uma vez que o tempo de início da inseminação apresenta uma pequena variação. Deste modo, é possível comparar a cinética de embriões de ciclos diferentes com maior relevância, visto que todos os tempos de ocorrência de uma determinada fase do desenvolvimento estão associados ao mesmo momento inicial.

Este sistema também permite retroceder ou avançar nas imagens fotografadas, permitindo visualizar de forma clara e precisa o momento celular que se pretende analisar (Wininger *et al.*, 2019). Na mesma página é apresentado o tempo em horas ocorrido após inseminação para mostrar o tempo em que ocorreram determinados eventos do desenvolvimento, tornando possível a avaliação embrionária com base nos tempos após inseminação e, ao mesmo tempo, uma avaliação morfológica baseada em critérios pré-determinados.

O sistema Geri+ também apresenta a possibilidade de estar associado a um *software* de classificação de embriões ao terceiro dia, denominado *Eeva Test* (*Early Embryo Viability Assessment Test*).

1.5 Parâmetros morfocinéticos na avaliação embrionária

Como já vimos anteriormente, o estudo da cinética do desenvolvimento embrionário tem permitido a identificação de marcos específicos no desenvolvimento que são preditivos da qualidade embrionária mas também das taxas de implantação e gravidez (Desai *et al.*, 2014, Armstrong *et al.*, 2015, Basile *et al.*, 2015).

Os parâmetros morfocinéticos podem ser divididos em duas categorias: os absolutos e relativos. Os parâmetros morfocinéticos absolutos são obtidos pela leitura direta a partir da análise no *time-lapse*, como por exemplo o momento em que ocorrem as etapas de clivagem ou momentos específicos do desenvolvimento na fase de mórula ou blastocisto. Os parâmetros morfocinéticos relativos são obtidos através do conhecimento prévio do tempo dos parâmetros absolutos, como é o caso da duração dos ciclos celulares ou o intervalo de tempo entre eles, sendo assim obtidos por um método indireto (Ciray *et al.*, 2014). De uma forma muito sumária, os próximos dois capítulos irão abordar os parâmetros morfocinéticos inseridos nestes grupos e as suas nomenclaturas.

1.5.1 Parâmetros morfocinéticos absolutos

Os parâmetros utilizados na avaliação embrionária com recurso ao *time-lapse* são designados de acordo com as várias etapas do desenvolvimento e os tempos (t) específicos nos quais elas ocorrem (Ciray *et al.*, 2014).

Quando realizada uma FIV, t0 é o tempo de início da inseminação. No caso de uma ICSI, t0 indica o tempo médio decorrido entre o início e o fim da injeção do espermatozóide no citoplasma do ovócito. Após ocorrer a fertilização, dá-se a extrusão do segundo GP, apresentando-se com a terminologia tPB2 (PB2 significa *second polar body* ou segundo glóbulo polar). De seguida ocorre o aparecimento dos PN feminino e masculino, sendo este parâmetro representado por tPNa (PNa significa *pronuclear appearance* ou aparecimento de pronúcleos) (Ciray *et al.*, 2014, Basile *et al.*, 2015).

Posteriormente ocorre a fusão dos PN que leva ao desaparecimento pronuclear. O tempo de desaparecimento dos PN é representado por tPNf (PNf significa *pronuclear fading*) (Ciray *et al.*, 2014). Todos estes eventos levam à formação de um zigoto diplóide que sofrerá a primeira divisão mitótica, dando origem a dois blastómeros

iguais. O tempo desde o início da inseminação (t_0) até ao momento da divisão de duas células embrionárias designa-se por t_2 (Basile *et al.*, 2015). Após esta etapa, o zigoto continua a dividir-se por mitose, entrando na fase de clivagem. O tempo de finalização de cada divisão apresenta uma terminologia genérica que é designada de t_n (n corresponde ao número de blastómeros obtidos depois das divisões mitóticas) (Ciray *et al.*, 2014). Deste modo, o t_8 indica o tempo decorrido desde a inseminação até ao estado de oito blastómeros. Após sucessivas divisões mitóticas inicia-se o processo de compactação e formação da mórula. O tempo decorrido desde a inseminação até à fase de mórula define-se por t_M . O início da compactação representa-se por t_{SC} (tempo desde t_0 até ao início da compactação). A finalização do processo de compactação define-se pelo parâmetro morfocinético t_{Mf} (tempo desde t_0 até ao estabelecimento do estado de mórula) (Ciray *et al.*, 2014). A formação do blastocisto inicia-se com o processo de blastulação t_{SB} (tempo desde t_0 até ao início da blastulação). A partir deste momento, começa a expansão do blastocisto. Durante este processo ocorre o crescimento e desenvolvimento das suas camadas celulares, a trofoectoderme e a massa celular interna. O tempo desde t_0 até à expansão celular do blastocisto caracteriza-se pelo parâmetro t_{EB} . O tempo desde a inseminação até à formação de um blastocisto completamente formado corresponde ao parâmetro t_B . Por fim, o processo de eclosão do blastocisto corresponde ao parâmetro morfocinético t_{HD} (tempo desde t_0 até à eclosão do blastocisto) (Ciray *et al.*, 2014, Basile *et al.*, 2015).

Tabela 5. Nomenclatura e descrição dos parâmetros morfocinéticos absolutos, desde o estado de clivagem até ao estado de desenvolvimento de mórula, blastocisto e eclosão do blastocisto. Adaptado de (Ciray *et al.*, 2014).

Parâmetros morfocinéticos	Descrição dos parâmetros morfocinéticos
t0	Tempo (em horas) do início da FIV ou meio-termo no caso de ICSI
tPB2	Tempo (em horas) de extrusão do segundo glóbulo polar
tPNa	Tempo (em horas) decorrido desde a inseminação até ao aparecimento dos dois pronúcleos
tPNf	Tempo decorrido desde a inseminação até ao desaparecimento dos glóbulos polares
t2	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com dois blastómeros
t3	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com três blastómeros
t4	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com quatro blastómeros
t5	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com cinco blastómeros
t6	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com seis blastómeros
t7	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com sete blastómeros
t8	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de embrião com oito blastómeros
tM	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de mórula
tSC	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até à fase inicial da compactação
tMf	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao final da compactação
tSB	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até à fase de início da blastulação
tEB	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao início da expansão do blastocisto
tB	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até ao estado de blastocisto
tHD	Tempo decorrido, em horas, desde a inseminação até à fase de eclosão do blastocisto da zona pelúcida

1.5.2 Parâmetros morfocinéticos relativos

Os parâmetros relativos são definidos através da determinação prévia dos tempos dos parâmetros absolutos e inclui a duração dos ciclos celulares, eventos de sincronização das divisões e diferenças temporais entre etapas de desenvolvimento absolutas. Estes parâmetros têm-se revelado essenciais na avaliação embrionária (Herrero & Meseguer, 2013, Desai *et al.*, 2014).

O primeiro ciclo celular (cc1 ou ECC1) corresponde ao intervalo de tempo desde o desaparecimento dos pronúcleos até ao momento em que o embrião apresenta dois blastómeros (Ciray *et al.*, 2014). A duração da primeira citocinese também é um parâmetro relevante na avaliação embrionária e corresponde ao intervalo de tempo entre o aparecimento do fuso acromático para o início da primeira divisão mitótica e o final da citocinese (Kirkegaard *et al.*, 2012). Os dois blastómeros formados sofrem uma segunda divisão mitótica, iniciando o segundo ciclo celular (cc2 ou ECC2). Neste ciclo, como cada uma das células embrionárias se está a dividir, pode ser feita uma subdivisão em dois grupos: cc2a, para a divisão de um dos blastómeros, originando um embrião com três células, e cc2b, para o outro blastómero, formando um embrião com quatro células. Sendo assim, a duração do segundo ciclo celular corresponde ao intervalo de tempo entre o estado de duas (t2) e de quatro células (t4) (Ciray *et al.*, 2014).

Da mesma forma, no terceiro ciclo celular (cc3 ou ECC3), os quatro blastómeros iniciam os seus respetivos ciclos celulares, verificando-se assim, quatro divisões mitóticas separadas: cc3a, originando um embrião com cinco blastómeros, cc3b, originando um embrião com seis blastómeros, cc3c, um embrião de sete blastómeros e, por fim, cc3d, um embrião com oito blastómeros. A duração de cc3 pode ser calculada por esta diferença de t8 e t4 (Ciray *et al.*, 2014).

Como já foi referido no capítulo 1.3.6, a duração dos ciclos celulares é um critério de seleção embrionária de elevada importância e que se reflete na qualidade dos embriões (Herrero & Meseguer, 2013). Ciclos mais curtos sugerem maior qualidade embrionária, já ciclos mais prolongados podem estar relacionados com reparações do DNA ou rearranjos celulares antes da clivagem podendo indicar anomalias cromossómicas e consequentemente menor qualidade dos embriões (Ciray *et al.*, 2014).

A duração dos ciclos mitóticos é também um parâmetro morfocinético relativo de elevada importância e corresponde ao intervalo de tempo entre o início de uma divisão

celular e o início da divisão seguinte (Kirkegaard *et al.*, 2012). Podem ser considerados três parâmetros associados a três ciclos celulares iniciais: s1, s2 e s3. O parâmetro s1 corresponde à duração da etapa em que existe apenas um blastómero. O parâmetro s2 corresponde ao intervalo de tempo entre as fases de dois e quatro blastómeros e pode ser calculada pela diferença entre os tempos de t4 e t3 (t4-t3). Por fim, s3 corresponde ao intervalo de tempo entre as etapas de cinco e oito blastómeros, e pode ser calculada pela diferença de tempos de dois parâmetros morfocinéticos absolutos t8-t5 (Ciray *et al.*, 2014). Ainda podem ser indicados outros parâmetros morfocinéticos relativos como a duração da compactação (dcom), duração da blastulação (dB) e a duração da expansão do blastocisto (dexp) (Ciray *et al.*, 2014). Na tabela 6 encontra-se a descrição e nomenclatura para todos os parâmetros mencionados.

Tabela 6. Nomenclatura e descrição dos parâmetros morfocinéticos relativos, relacionados com a duração (em horas) dos ciclos celulares e sincronização do estado de clivagem. Adaptado de (Ciray *et al.*, 2014).

Parâmetros morfocinéticos	Descrição dos parâmetros morfocinéticos
cc1 ou ECC1	Duração do primeiro ciclo celular (t2- tPB2)
cc2 ou ECC2	Duração do segundo ciclo celular, incluindo cc2a e cc2b (t4-t2)
cc3 ou ECC3	Duração do terceiro ciclo celular, incluindo as quatro fases, cc3a, cc3b, cc3c e cc3d (t8-t4)
s1	Duração da etapa de apenas um blastómero
s2	Sincronização das divisões mitóticas da fase de dois até quatro blastómeros (t4-t3)
s3	Sincronização do padrão de clivagem do terceiro ciclo celular (t8-t5)
dcom	Duração da etapa de compactação (tM-tSC)
dB	Duração da fase de blastulação (tB-tSB)
dexp	Duração da fase de expansão do blastocisto (tHN-tB)

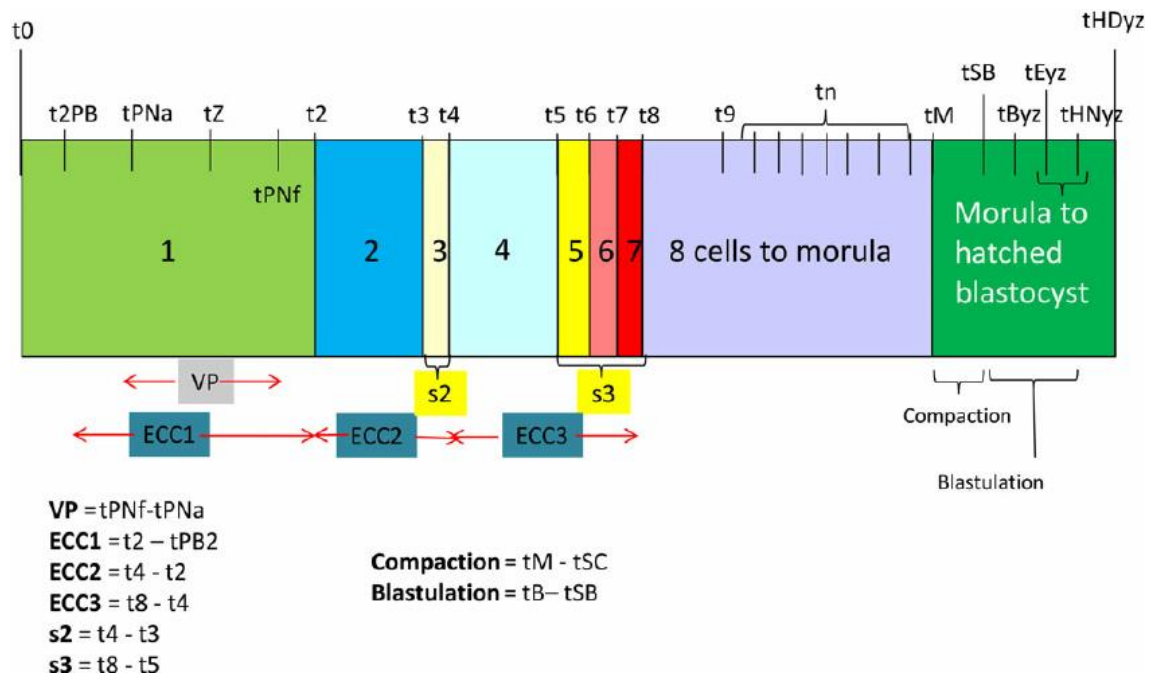


Figura 14. Imagem esquemática dos parâmetros morfocinéticos absolutos e relativos e a ocorrência destes nas diversas etapas do desenvolvimento embrionário, desde t_0 (tempo de iniciação da inseminação para FIV e tempo intermédio para ICSI) até ao momento de formação do blastocisto após inseminação (t_B). Adaptado de (Ciray *et al.*, 2014)

1.6 Sistema *Eeva test*

Em 2013, *Conaghan et al.* descreveram o desenvolvimento e validação do primeiro teste não invasivo (*Eeva test*) que media automaticamente os intervalos críticos de divisão celular e classificava os embriões com base no seu potencial de desenvolvimento (*Conaghan et al.*, 2013).

O *software Eeva (Early Embryo Viability Assessment) test* permite fazer uma avaliação automática dos parâmetros de qualidade embrionária recorrendo às propriedades preditivas da morfocinética associadas à análise morfológica, indicando qual o embrião com maior potencial de desenvolvimento e implantação, tendo em conta a cinética de clivagem até ao 3º dia (Kovacs, 2014, Kieslinger *et al.*, 2016, Adamson *et al.*, 2016). Deste modo, este sistema atribui uma classificação a cada embrião de 3º dia que tem por base parâmetros morfocinéticos associados a tempos de ocorrência de várias etapas celulares conjugado com a classificação morfológica. Em primeiro lugar, este *software* utiliza como referência o tempo que o embrião demora a completar a citocinese do primeiro ciclo celular (P1) (Chen *et al.*, 2013). De seguida, o sistema faz uma avaliação do intervalo de tempo que decorre entre o estado de dois e três blastómeros, designado por P2, e o intervalo de tempo decorrido entre o estado de três e quatro blastómeros, designado por P3 (Chen *et al.*, 2013, Herrero & Meseguer, 2013). Tendo em conta estes dois últimos parâmetros, o *Eeva test* analisa os embriões com maior ou menor potencial de desenvolvimento e sugere uma classificação de três categorias: alta, intermédia ou baixa qualidade (VerMilyea *et al.*, 2014, Kieslinger *et al.*, 2016).

A duração da primeira citocinese, da interfase entre a primeira e a segunda mitose e entre a segunda e a terceira mitose são parâmetros preditores da qualidade do embrião e da capacidade de este atingir a fase de blastocisto (Meseguer *et al.*, 2012).

Os resultados do *software Eeva test* indicam uma alta probabilidade de formação de blastocistos viáveis quando P2 e P3 estão dentro de intervalos de tempo de divisão celular específicos: P2 entre 9,33-11,47 horas e P3 entre 0-1,73 horas, sendo designados embriões de alta qualidade. Embriões fora do intervalo de P3 mas com P2 dentro do intervalo de tempo normal ou fora desse intervalo entre 11,48 e 12,65 horas, são considerados embriões de qualidade intermédia e baixa qualidade quando P2 ou P3 estão fora dos intervalos de tempo específicos da divisão celular (Conaghan *et al.*, 2013, Kovacs, 2014, Diamond *et al.*, 2015, Kieslinger *et al.*, 2016).

Quando os três parâmetros de avaliação estão dentro dos limites aceitáveis, os embriões são considerados de boa qualidade, sendo assim os melhores candidatos para a transferência.

Vários estudos têm sido feitos usando o *Eeva test* para validar a utilidade dos parâmetros do ciclo celular capturados pelas imagens de *time-lapse* e tem-se observado que a formação de blastocistos viáveis pode ser prevista no estágio de clivagem usando este sistema (Conaghan *et al.*, 2013). Outros estudos também têm demonstrado evidências de que o sistema *Eeva test* melhora significativamente a capacidade dos embriologistas de identificar embriões que se tornariam blastocistos viáveis em comparação com a seleção de embriões ao 3º dia por avaliações morfológicas (Diamond *et al.*, 2015, Kieslinger *et al.*, 2016). Além disso, embriões com marcadores de *time-lapse* dentro do intervalo de tempo considerado (embriões de qualidade alta ou intermédia pelo *Eeva test*) mostram uma taxa de implantação significativamente maior do que embriões com marcadores de *time-lapse* fora do intervalo (embriões de baixa qualidade) (VerMilyea *et al.*, 2014). Até ao momento, a maioria dos estudos com o *Eeva test* utilizou apenas a formação de blastocistos como desfecho (Chen *et al.*, 2013, Conaghan *et al.*, 2013), no entanto, uma publicação recente relatou taxas de implantação e gravidez significativamente mais altas quando o *Eeva test* foi usado para seleção prospectiva de embriões (Adamson *et al.*, 2016).

2. Objetivos

Como já foi referido anteriormente, a avaliação da qualidade embrionária é essencial para se garantir a transferência de um único embrião viável e o sucesso das técnicas de RHA culminando numa gravidez. No entanto, a avaliação baseada apenas em aspetos morfológicos é incompleta, sendo necessário um estudo também dos parâmetros morfocinéticos (Kirkegaard *et al.*, 2013). Deste modo, com este trabalho pretende-se validar a utilização do *software Eeva test* e o uso de certos marcadores morfocinéticos como um modelo preditivo do potencial embrionário até à fase de blastocisto e de seleção dos melhores embriões com vista a uma melhor taxa de implantação e gravidez (Kirkegaard *et al.*, 2015). Para tal, pretende-se avaliar se a classificação prevista do desenvolvimento embrionário pelo sistema automático *Eeva test* ao 3º dia poderá ter uma relação com a previsão dos melhores embriões para implantar ao 5º dia, isto é, na fase de blastocisto.

Este trabalho terá assim como objetivos: i) comparar a avaliação da qualidade embrionária ao 3º dia dadas pela classificação de Istambul e pelo sistema *Eeva*; ii) avaliar se a classificação dada pelo sistema automático *Eeva* ao 3º dia tem uma relação direta com a qualidade dos embriões ao 5º dia e por fim; iii) avaliar se a classificação do sistema *Eeva* poderá ter uma relação com a previsão dos melhores embriões para implantar ao 5º dia.

3. Material e Métodos

3.1. Avaliação espermática (espermograma)

A avaliação da amostra seminal, exame também conhecido como espermograma ou exame citomorfobioquímico do espermatozoide, permite avaliar a qualidade e função espermática do homem, dando informações sobre parâmetros macroscópicos e microscópicos do espermatozoide mas também do funcionamento dos túbulos seminíferos (local onde ocorre a espermatogénese), do epidídimo, da permeabilidade dos ductos e da atividade das glândulas anexas (WHO, 2010).

A análise macroscópica inclui a avaliação do pH, volume, viscosidade, liquefacção, aparência visual, cor e cheiro, enquanto o exame microscópico avalia a motilidade, vitalidade, morfologia, concentração de espermatozoides e a presença de aglutinação ou de células como leucócitos ou da linha germinativa. A OMS desenvolveu um conjunto de critérios de análise onde foram estabelecidos valores de referência para os parâmetros espermáticos (WHO, 2010). Esses valores encontram-se apresentados na tabela 7.

A colheita das amostras foi feita por masturbação numa sala privada perto do laboratório, para um frasco estéril de recolha de fluidos biológicos identificado com o nome do paciente e o número do respetivo espermograma. A amostra foi obtida após um período mínimo de 2 dias e um máximo de 7 dias de abstinência sexual (WHO, 2010). Caso haja alguma dificuldade em fazer a colheita no laboratório esta pode ser realizada em casa através de masturbação sendo necessário ser entregue no laboratório num período máximo de uma hora, tendo o cuidado de transportar a amostra junto do corpo para manter uma temperatura mais estável de modo a diminuir as variações de temperatura e não afetar a qualidade dos parâmetros espermáticos (WHO, 2010).

Após a colheita, a amostra foi colocada na estufa a 37°C até completar a liquefação. A análise iniciou-se sempre quando a liquefação estava completa. De seguida, a amostra foi retirada da estufa e colocada numa placa de aquecimento que também se encontrava a 37°C, onde permaneceu durante todo o exame para manter uma temperatura estável, de modo a não comprometer nenhum dos parâmetros avaliados.

Tabela 7. Valores mínimos de referência estabelecidos pela OMS para os parâmetros de avaliação da qualidade espermática (WHO, 2010).

Parâmetro	Valor mínimo de referência
Liquefação	Completa aos 60 minutos
Viscosidade	Normal
Cor	Amarelo/Branco
Cheiro	<i>Sui generis</i>
Volume	1,5 mL
pH	7,2
Concentração	15 x 10 ⁶ epz / mL
Nº total de espermatozóides	38 x 10 ⁶ epz / ejaculado
Motilidade total (% in situ e progressiva)	40%
Motilidade progressiva (% lenta e rápida)	32%
Vitalidade (% epz vivos)	58%
Hipoosmolaridade	58%
Morfologia (% epz normais)	4%
Leucócitos	<1 x 10 ⁶ leucócitos/mL
Células germinativas imaturas	<3 células / 100 epz
Aglutinação	Ausente

3.1.1 Parâmetros macroscópicos

3.1.1.1 Liquefação

Após a ejaculação, o líquido seminal sofre um processo de coagulação pela atuação de enzimas como a vesiculase. A liquefação ocorre naturalmente pela ação de enzimas semelhantes à quimiotripsina que atuam sobre o coágulo desfazendo-o, permitindo uma alteração na consistência da amostra, passando-a de um estado semi-sólido para um estado líquido e homogêneo. Em condições normais, a liquefação ocorre cerca de 15 a 20 minutos após a ejaculação, não devendo ultrapassar os 60 minutos (NAFA, 2002, WHO, 2010). Esta análise foi feita macroscopicamente, vendo-se uma amostra mais fluida após a liquefação.

3.1.1.2 Viscosidade

A avaliação da viscosidade foi realizada recorrendo à aspiração da amostra por uma pipeta e deixando cair por gravidade. Uma amostra normal deve cair da pipeta em gotas, no entanto, se a viscosidade for aumentada irá cair em fio (NAFA, 2002, WHO, 2010). Este parâmetro também é de elevada importância no estudo da qualidade espermática, visto que uma viscosidade aumentada diminui a motilidade e concentração dos espermatozóides (WHO, 2010).

3.1.1.3 Aparência visual

Quando a amostra seminal liquefeita apresenta uma aparência homogênea e opaca, é indicativo de uma elevada concentração de espermatozóides. Quando esta se apresenta menos opaca e mais translúcida pode indicar que a concentração de espermatozóides é mais baixa (WHO, 2010). O consumo de vitaminas ou drogas pode alterar a cor da amostra seminal tornando-a mais amarelada. Uma amostra que apresente uma cor vermelha-acastanhada pode indicar a presença de glóbulos vermelhos (NAFA, 2002, WHO, 2010).

3.1.1.4 Volume

O volume da amostra de esperma foi medido utilizando uma pipeta serológica graduada, sendo o valor mínimo de referência 1,5 ml (WHO, 2010).

3.1.1.5 pH

O pH do líquido seminal resulta da combinação das secreções alcalinas das vesículas seminais e das secreções ácidas da próstata, sendo que este equilíbrio é essencial para manter a qualidade e vitalidade dos espermatozoides (Dias *et al.*, 2019). O pH foi medido após a liquefação, utilizando uma fita indicadora de pH. Um pH de 7,2 é o valor que se encontra como referência, sendo que um valor mais baixo pode indicar infecção dos ductos genitais e valores acima de 8.0 podem significar disfunções nas vesículas seminais (WHO, 2010, Dias *et al.*, 2019).

3.1.1.6 Cheiro

O líquido seminal apresenta um cheiro tipicamente *sui generis*, que pode ser modificado pela presença de urina na amostra, por isso deve ser avaliado (WHO, 2010).

3.1.2 Parâmetros microscópicos

3.1.2.1 Motilidade

A motilidade é o primeiro parâmetro a ser avaliado após a liquefação e é de elevada importância pois demonstra a capacidade dos espermatozóides em atravessar o trato feminino, atingirem o ovócito e penetrarem nas camadas envoltivas (Dias *et al.*, 2019).

Para a avaliação da motilidade foi preparada uma lâmina com 10 µl de amostra a fresco, que foi coberta com uma lamela de 22mm x 22mm e procedeu-se a duas contagens de 200 espermatozóides num microscópio de contraste de fase, na ampliação de 400x.

Os espermatozóides contados foram classificados, quanto à sua motilidade, em 4 categorias: imóveis, quando não havia qualquer movimento; móveis *in situ*, quando apresentavam movimento da cauda mas sem progressão; progressivos lentos, quando havia movimento a uma velocidade superior a 5 µm/s mas inferior 25 µm/s e progressivos rápidos, quando o movimento era linear ou em grandes círculos com velocidade igual ou superior a 25 µm/s ou superior.

3.1.2.2 Vitalidade

A vitalidade pode ser avaliada com o teste de coloração com eosina Y que se baseia na integridade das membranas. Deste modo, espermatozóides com membrana citoplasmática intacta não irão permitir a entrada do corante, mantendo-se incolores. Pelo contrário, os espermatozóides com danos membranares irão permitir a entrada da eosina Y, apresentando assim uma cor rosa (WHO, 2010). Para tal, foi pipetado 10 µL de amostra e 10 µL de corante e deixou-se atuar durante 5 minutos. De seguida fez-se um esfregaço e contaram-se 200 espermatozóides ao microscópio de contraste de fase, numa ampliação de 400x, em contraste de fase negativo.

O teste de hipoosmolaridade também pode ser utilizado para avaliar a vitalidade de uma amostra. Neste teste, os espermatozóides foram expostos a uma solução hipoosmótica, causando turgescência nos que estavam vivos, resultando em alterações da cauda. Assim, os espermatozóides vivos e reativos apresentaram caudas enroladas, enquanto espermatozóides não reativos e mortos mantiveram a sua

cauda intacta (WHO, 2010). Para tal, pipetou-se 90 μ l de solução hipoosmótica e 10 μ l da amostra seminal homogeneizada e incubou-se a 37°C durante 30 minutos. Após este período, foram colocados 10 μ l da mistura sobre uma lâmina coberta com uma lamela de 22mm x 22mm e procedeu-se à contagem de 200 espermatozóides num microscópio de contraste de fase numa ampliação de 400x, distinguindo-os entre vivos e mortos.

3.1.2.3 Concentração

Para determinar a concentração, foi necessário preparar uma diluição da amostra com uma solução fixadora, sendo que a diluição adequada foi determinada durante a avaliação microscópica inicial tendo em conta o número médio de espermatozóides visualizados por cada campo de observação. Para tal, foi pipetado um volume de 10 μ L do preparado da amostra seminal com o fixador para uma câmara de *Neubauer* e após 30 minutos, procede-se à contagem dos espermatozóides e determinação da concentração. O cálculo da concentração está dependente do número de espermatozóides contados, do número de quadrados da grelha contabilizados, do fator de diluição utilizado e da profundidade e volume da câmara de contagem. O valor normal de referência é de 15 milhões/ml de amostra (WHO, 2010).

3.1.2.4 Morfologia

A morfologia foi avaliada através de um esfregaço de 10 μ L de esperma, fixado com metanol e corado com os corantes Papanicolau e *Shorr*. Foram contados 200 espermatozóides ao microscópio ótico de campo claro, usando a objetiva de óleo de imersão (1000x), utilizando os critérios de classificação morfológica da OMS (WHO, 2010), onde é recomendada uma simples distinção entre forma normal ou anormal da cauda, peça intermédia e cabeça. A amostra é considerada normal quando apresenta uma quantidade igual ou superior a 4% de espermatozóides com formas normais (WHO, 2010).

3.2. Processamento de amostras seminais para tratamentos de RHA

No início de cada ciclo foi necessário fazer-se o processamento das amostras seminais. O tratamento foi feito pelo método de gradientes de densidade descontínuos que permite separar os espermatozóides normais dos imóveis e de outros restos celulares, mas também dos fatores descapacitantes do plasma seminal, com base na densidade dos diferentes componentes, permitindo a seleção dos espermatozóides de maior qualidade.

As amostras foram obtidas por masturbação e processadas no laboratório de Andrologia. Para tal, numa câmara de fluxo laminar, foram preparados em tubos de *falcon* dois gradientes de densidade descontínuos, com o volume final de 1 ml. No primeiro tubo, para uma concentração final de 80% (v/v), foram pipetados 0,8 ml de gradiente de sílica (*SpermGrad*TM, *Vitrolife*) e 0,2 ml de meio de cultura (G-IVF PLUSTM, *Vitrolife*). No segundo tubo adicionou-se 0,4 ml de gradiente de sílica e 0,6 de meio de cultura, fazendo assim um gradiente com uma concentração final de 40% (v/v). De seguida, com a ajuda de uma seringa, o gradiente de 80% foi transferido para baixo do gradiente de 40%, de forma lenta e cuidadosa. Com uma pipeta de *Pasteur* colocou-se por cima dos gradientes a amostra já liquefeita e homogeneizada e levou-se a centrifugar durante 25 minutos, a 1000 rpm e 35°C. Após a centrifugação, retirou-se com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur* o sobrenadante que contém o plasma seminal, restos celulares e os espermatozóides imóveis e o *pellet* que ficou depositado no fundo foi transferido para um novo tubo de *falcon*. A esse tubo adicionou-se 2 ml de meio de cultura previamente aquecido a 37°C e levou-se novamente a centrifugar durante 10 minutos, a 1000 rpm e 35°C. Esta última lavagem permite remover alguns restos celulares e gradientes de densidade ainda existentes. Após os 10 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado, tendo em atenção que se deve aspirar o máximo de sobrenadante possível, ficando apenas o *pellet* no fundo do tubo de *falcon*. De seguida, e sem perturbar o *pellet*, adicionou-se meio de cultura e colocou-se o tubo numa posição inclinada, preferencialmente com um ângulo de 45°, à temperatura ambiente. O tubo foi mantido nesta posição pelo menos 30 minutos para ocorrer o processo de *swim up*, ou seja, a migração dos espermatozóides com maior motilidade.

3.3. Estimulação ovárica

A estimulação ovárica controlada tem como objetivo induzir o desenvolvimento de vários folículos por ciclo. Deste modo, é possível, num ciclo, colher um maior número de ovócitos, o que leva a um aumento do número de embriões disponíveis, sendo possível prolongar a cultura e selecionar os que apresentam melhor qualidade para transferência.

Durante o tratamento de estimulação é necessário impedir o pico de LH para evitar a ocorrência espontânea da ovulação. Para tal, fez-se a supressão da hipófise com a toma de um antagonista da GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone* ou fator libertador de gonadotrofinas) ou de um agonista da GnRH. Os antagonistas de GnRH ligam-se aos recetores da GnRH endógena, impedindo a libertação da FSH e LH pela hipófise, suprimindo o pico de LH. Por outro lado, os agonistas de GnRH são moléculas análogas desta hormona, que se ligam aos seus recetores na hipófise, provocando um aumento inicial de gonadotrofinas mas de seguida uma dessensibilização hipofisária com consequente inibição da produção de FSH e LH.

A estimulação ovárica foi induzida com FSH (*Follicle-stimulating hormone* ou Hormona Folículo-Estimulante) recombinante. O desenvolvimento folicular foi monitorizado por uma ecografia vaginal, permitindo assim determinar o número e tamanho dos folículos. Quando os folículos apresentaram 17mm ou mais de diâmetro, foi administrada hCG (*human Chorionic Gonadotropin* ou Gonadotrofina coriônica humana) para indução da ovulação. A colheita dos ovócitos foi realizada cerca de 34 a 36 horas após da administração da hormona.

3.4 Punção folicular

A recolha dos ovócitos foi realizada por punção transvaginal dos folículos utilizando uma sonda com agulha acoplada que perfurou, através da parede vaginal, a cápsula do ovário, aspirando todos os folículos por sistema de vácuo. Todo este procedimento foi realizado sob anestesia geral e monitorizado por controlo ecográfico. O líquido folicular foi aspirado por vácuo utilizando uma pressão negativa entre 110 a 150 mmHg e recolhido para tubos que se encontravam numa placa de aquecimento a 37°C. De seguida, os tubos foram transportados para o laboratório de embriologia e iniciou-se a pesquisa dos ovócitos. Numa bancada de fluxo laminar de superfície aquecida a 37°C, o líquido folicular de cada tubo foi transferido para uma placa de *Petri* onde foi feita a pesquisa dos ovócitos com recurso a um estereomicroscópio. Os ovócitos encontrados foram transferidos para uma placa de 4 poços, previamente aquecida a 37°C, com 500µl de meio tamponado em cada poço (G-MOPS PLUS™, *Vitrolife*) e cobertos com parafina líquida (OVOIL™, *Vitrolife*). Este meio permite remover vestígios de sangue e restos celulares que ainda se encontravam ligados ao complexo cumulus-ovócito (CCO). Posteriormente os ovócitos foram colocados numa placa de 4 poços com 500µl de meio de cultura em cada poço cobertos com parafina líquida, previamente aquecida a 37°C. Por fim, os ovócitos foram incubados numa estufa a 37°C, com 6% de CO₂ e 5% de O₂, até serem inseminados no caso de a técnica utilizada ter sido uma FIV ou até a desnudação no caso de a técnica utilizada ter sido uma ICSI.

3.5 Ciclos de Fertilização *In Vitro* (FIV)

Os ciclos de FIV foram iniciados com a realização de um protocolo de estimulação ovárica (Secção 3.3), seguindo-se o puncionamento dos ovócitos (Secção 3.4). Após a pesquisa dos ovócitos, estes foram mantidos numa placa de 4 poços com meio de cultura (G-IVF PLUS™, *Vitrolife*) e cobertos com parafina líquida a 37°C numa atmosfera com 6% CO₂ e 5% O₂ até ao momento da inseminação.

Passado um período de 4 horas após punção fez-se a inseminação numa bancada de superfície aquecida e sob a observação num estereomicroscópio. Para tal, inicialmente foi retirada uma alíquota de 10 µl da suspensão espermática e carregada a câmara de *Neubauer* e procedeu-se à contagem dos espermatozóides progressivos em 5 quadrados. Tendo em conta que os ovócitos devem ser inseminados com 50 000 a 100 000 de espermatozóides móveis por mL, foi calculado o volume de amostra seminal que deve ser adicionado a cada poço. Deste modo, adicionou-se o volume determinado de amostra seminal a cada poço da placa, não devendo estar mais de 5 ovócitos por poço.

Após a inseminação, os ovócitos foram incubados juntamente com os espermatozóides a 37°C numa atmosfera com 6% CO₂ e 5% O₂. Após um período de 17±1 horas, procedeu-se à desnudação mecânica numa outra placa de 4 poços com meio de cultura e foi avaliada a fertilização pela presença dos dois PN e do 2ºGP. Os pré-zigotos foram de seguida transferidos para placas de *time-lapse*, e incubados no aparelho Geri+ até ao momento da transferência.

3.6 Ciclos de Microinjeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI)

Os ciclos de ICSI foram também iniciados com um protocolo de estimulação ovárica (Secção 3.3), seguindo-se o puncionamento dos ovócitos e respetiva pesquisa (Secção 3.4). Para a realização da ICSI, foi necessário proceder-se à desnudação dos ovócitos de modo a permitir a avaliação da maturidade nuclear e da qualidade ovocitária mas também para uma melhor visualização e manuseamento do ovócito durante a microinjeção.

3.6.1 Desnudação de ovócitos

Passado um período de incubação mínimo de 3 horas após a colheita dos ovócitos, procedeu-se à desnudação pelo método enzimático, seguido de desnudação mecânica. Para tal, 30 minutos antes deste procedimento foi preparada uma placa de 4 poços contendo um poço com 80 µl de meio com enzima para remoção das células do cumulus (HYASE10X™, *Vitrolife*) e 3 poços com 500 µl de meio tamponado, todos cobertos com parafina líquida (OVOIL™, *Vitrolife*), permanecendo na estufa a 37º C.

A desnudação foi feita numa câmara de fluxo laminar de superfície aquecida e sob a visualização de um estereomicroscópio. Os ovócitos foram colocados no primeiro poço que continha a enzima hialuronidase e foram aspirados sucessivamente durante 30 a 40 segundos até as células envoltentes estarem mais dispersas. É importante ter em atenção o tempo de exposição à enzima, uma vez que pode causar ativação de partenogénese dos gâmetas femininos. De seguida, os ovócitos foram aspirados com o auxílio de pipetas de desnudação de menor diâmetro para os poços com meio tamponado, percorrendo os 3 poços de modo a remover a totalidade das células do cumulus e os vestígios de enzima. Após a desnudação, os ovócitos foram avaliados, ao microscópio invertido, quanto à sua maturidade e qualidade. A maturidade nuclear foi confirmada pela observação do 1ºGP no EPV. Os ovócitos maduros foram posteriormente incubados em meio de cultura (G-TL™, *Vitrolife*) coberto com parafina líquida a 37°C, 6% CO₂ e 5% O₂, por um período mínimo de 1 hora, até à realização da ICSI.

3.6.2 Avaliação da Maturidade e Qualidade ovocitária

A qualidade ovocitária e, conseqüentemente, a sua capacidade de fertilização e correto desenvolvimento embrionário, foram determinados pela maturação nuclear e citoplasmática mas também pela morfologia dos ovócitos.

A maturidade do ovócito foi avaliada pela aparência do complexo cumulus-ovócito (CCO), no entanto, esta não é suficiente para confirmar a sua maturidade. Um CCO imaturo pode apresentar as células do cumulus mais compactas à volta do ovócito, enquanto um CCO maduro apresenta as células mais expandidas, formando uma massa de aspeto fofo (Elder & Dale, 2020).

A maturidade nuclear foi determinada pela presença do 1ºGP no EPV, indicando que o ovócito se encontrava em Metafase II (MII). Quando o ovócito estava imaturo podia encontrar-se em Metafase I (MI), isto é, sem a presença de vesícula germinativa (VG) nem GP, ou parado em prófase I em estado de VG.

A morfologia dos ovócitos também fornece importantes indicadores da capacidade de fertilização, desenvolvimento embrionário e gravidez. Para tal, foram estabelecidos no Consenso de Istambul critérios que classificam os ovócitos de acordo com a sua morfologia (Alpha & ESHRE, 2011).

Um ovócito foi considerado de boa qualidade ou de categoria 1 se estivesse em MII e apresentasse uma morfologia esférica, com citoplasma translúcido sem inclusões, delimitado por uma ZP uniforme, com um EPV pequeno, contendo apenas um GP não fragmentado e de tamanho normal. Foram considerados de qualidade razoável ou categoria 2 os ovócitos que apresentaram EPV ligeiramente aumentado, citoplasma granular e/ou GP fragmentado; e por fim de categoria 3 ou má qualidade aqueles que apresentaram estrutura muito irregular, GP gigante, EPV aumentado ou com inclusões e/ou presença de vacúolos. Os ovócitos que foram classificados de categoria 2 ou 3 apresentaram um ou mais dos parâmetros mencionados alterados (Alpha & ESHRE, 2011).

Os ovócitos imaturos foram mantidos em cultura para maturação *in vitro* e incubados a 37°C, com 6% de CO₂ e 5% de O₂, durante 24 horas nos casos de VG e durante 12 horas nos casos de MI. Os ovócitos que atingiram a maturidade após o período de incubação foram microinjetados.

3.6.3 Microinjeção de espermatozóides

Para a realização da ICSI foi necessário preparar a placa de microinjeção 20 a 30 minutos antes do procedimento. Para tal, numa placa de *Petri* foram colocadas à direita gotas de 5 μ l de meio tamponado previamente aquecido a 37°C e na zona à esquerda da placa foram pipetadas duas gotas com aproximadamente 10 μ l de meio PVP que foram espalhadas com a ajuda da ponta da micropipeta, formando duas colunas. Por fim, a placa foi coberta com parafina líquida, de modo a evitar a evaporação das gotas e para manter as condições ótimas, e colocada na estufa a 37°C.

No início do procedimento, foi colocada uma alíquota de suspensão espermática na primeira gota de PVP, em que o volume foi dependente da concentração dos espermatozóides processados. Os gâmetas masculinos foram processados como está descrito na secção 3.2. Os ovócitos maduros que se encontravam em MII foram colocados em gotas individuais de meio tamponado.

Para a realização desta técnica foi utilizado um equipamento altamente especializado composto por um microscópio ótico invertido com superfície aquecida a 37°C e um conjunto de micropipetas e micromanipuladores. No microscópio foram inseridos dois tipos de micropipetas de vidro nos respetivos suportes de micromanipulação, a pipeta de sustentação ou *holding*, responsável por segurar e imobilizar o ovócito, e a pipeta de microinjeção ou ICSI, responsável por imobilizar, aspirar e injetar espermatozóides. As micropipetas foram corretamente alinhadas até fazerem um ângulo de 30° na extremidade de modo a permitir o ajuste em relação à placa de microinjeção.

O microscópio também apresenta micromanipuladores que permitem a manipulação das pipetas *holding* e ICSI. Um dos micromanipuladores é mecânico e é usado para o posicionamento das micropipetas permitindo movê-las para cima ou para baixo. Os outros micromanipuladores funcionam por controlo hidráulico através de um *joystick* para movimentos mais precisos e suaves. Por fim existem microinjetores que permitem fixar e libertar o ovócito com a pipeta *holding* ou aspirar e injetar o espermatozóide com a pipeta ICSI.

No momento da microinjeção, a pipeta de ICSI foi baixada até atingir a gota de PVP que contém os espermatozóides e focada de modo a selecionar e aspirar um espermatozóide que apresente uma boa morfologia. Esse espermatozóide foi de seguida transferido para a segunda gota de PVP onde foi feito o esmagamento da cauda através de pressão mecânica, de modo a imobilizar por completo o

espermatozóide. Para tal, foi realizado um movimento rápido e firme com a pipeta de microinjeção sob a cauda do espermatozóide na zona abaixo da peça intermédia.

De seguida, esse espermatozóide foi aspirado pela cauda com a pipeta de microinjeção e transferido até uma gota de meio tamponado, onde se encontrava o ovócito a microinjetar. O ovócito foi posicionado com o GP às 6 horas, isto é, numa posição de 90° relativamente às micropipetas, de modo a não danificar o fuso meiótico, e fixado por uma ligeira sucção da micropipeta de sustentação. Esta foi devidamente focada em relação à membrana citoplasmática do ovócito e à micropipeta de ICSI, para todos se encontrarem no mesmo plano. Após a fixação do ovócito, a pipeta de ICSI, contendo o espermatozóide na extremidade, foi aproximada do ovócito e posicionada às 3 horas. Com um movimento suave, a pipeta foi pressionada contra o ovócito de modo a penetrar a ZP e a membrana citoplasmática. Posteriormente aspirou-se lentamente uma pequena quantidade de citoplasma e de seguida injetada no ovócito juntamente com o espermatozóide. Por fim, a pipeta de microinjeção foi retirada lentamente e o ovócito libertado da pipeta de sustentação. Este procedimento foi repetido em todos os ovócitos maduros.

Os ovócitos microinjetados foram transferidos para placas de *time-lapse*, previamente preparadas com 80 µl de meio de cultura próprio (G-TL™, Vitrolife) em cada um dos três poços e coberta com 4 ml de parafina líquida. As placas foram colocadas no aparelho de *time-lapse* Geri+, devidamente identificadas, onde ocorreu o desenvolvimento embrionário até ao momento da transferência.

3.7 Avaliação da qualidade embrionária: classificação de Istambul

A avaliação da qualidade embrionária foi feita utilizando o sistema de classificação de embriões desenvolvido no consenso de Istambul em 2010 (Alpha & ESHRE, 2011) e com o auxílio do equipamento de *time-lapse* Geri+.

Neste estudo, os embriões foram avaliados ao 3º dia (68h +/- 1h) e ao 5º dia de desenvolvimento (116h +/- 2h). Os embriões obtidos foram agrupados de acordo com os critérios de Istambul em 3 categorias: embriões de boa qualidade (1), de qualidade razoável (2) ou de má qualidade (3) (Alpha & ESHRE, 2011).

Relativamente aos embriões de 3º dia, foram considerados de boa qualidade ou categoria 1 os que apresentaram 8 células, fragmentação menor a 10%, tamanho específico das células para o estágio celular e ausência de multinucleação. Os embriões de qualidade razoável ou de categoria 2 foram aqueles que apresentaram 9 a 11 células, 10 a 25% de fragmentação, a maioria das células apresentava o tamanho específico de acordo com o estágio celular e por fim ausência de multinucleação. Na categoria 3 ou má qualidade foram integrados os embriões que apresentaram mais de 11 células ou menos de 8 células, grau de fragmentação superior a 25%, tamanho dos blastómeros não coerente com o estágio celular e presença de multinucleação. É importante notar que só foram classificados como categoria 2 ou 3 os embriões que apresentaram um ou mais dos parâmetros referidos (Alpha & ESHRE, 2011). Os critérios estão resumidos na tabela 8.

Ao 5º dia de desenvolvimento, na fase de blastocisto, foram avaliados 3 parâmetros: estágio de expansão do blastocisto, massa celular interna e trofoectoderme. O primeiro parâmetro está relacionado com o maior ou menor grau de expansão do blastocisto e pode ser dividido em blastocisto inicial (1), blastocisto (2), blastocisto expandido (3) e blastocisto em eclosão ou eclodido (4). Um blastocisto de grau 1 apresentou o blastocélio pouco desenvolvido; no de grau 2 o blastocélio preencheu completamente o embrião; no de grau 3 o blastocélio foi maior do que o volume inicial do embrião e por fim, um blastocisto de grau 4 estava em eclosão ou completamente eclodido. A massa celular interna foi classificada como categoria 1 ou boa se era proeminente, bem definida, com muitas células compactadas e ligadas entre si; categoria 2 ou razoável se era bem definida, mas com muitas células mal agrupadas e por fim de categoria 3 ou má se era mal definida e com poucas células. A trofoectoderme foi considerada de categoria 1 ou boa se apresentava muitas células

formando um epitélio coeso, categoria 2 ou razoável se apresentava poucas células formando um epitélio disperso ou categoria 3 ou má se apresentava poucas células. Deste modo, os embriões foram classificados como embriões de boa qualidade, qualidade razoável e má qualidade, utilizando os critérios de Istambul como se encontra resumido nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8. Sistema de classificação da qualidade embrionária ao 3º dia de desenvolvimento segundo os critérios morfológicos do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011).

Classificação de Embriões (Critérios Istambul) Dia 3 – 68h (+/-1)	
1 Boa qualidade	• 8 Células • <10% Fragmentação • Tamanho das células específico do estágio celular • Ausência de multinucleação
2 Qualidade razoável	• 9 a 11 células • 10-25% Fragmentação • Tamanho das células específico do estágio celular para a maioria das células. • Ausência de multinucleação (Presença de um ou mais parâmetros)
3 Má qualidade	• > 11 Células ou <8 células • >25% Fragmentação • Tamanho das células não específico do estágio celular • Presença de multinucleação. (Presença de um ou mais parâmetros)

Tabela 9. Sistema de classificação de blastocistos segundo os critérios morfológicos do consenso de Istambul (Alpha & ESHRE, 2011).

	Grau	Avaliação	Descrição
Grau de expansão	BL1		Blastocisto inicial
	BL2		Blastocisto
	BL3		Blastocisto expandido
	BL4		Blastocisto em eclosão ou eclodido
Massa Celular interna	1	Boa	Proeminente, bem definida, com muitas células compactadas e em adesão firme entre si
	2	Razoável	Bem definida, com muitas células mal agrupadas
	3	Má	Mal definida, poucas células
Trofoectoderme	1	Boa	Muitas células formando um epitélio coeso
	2	Razoável	Poucas células, formando um epitélio disperso
	3	Má	Muito poucas células

Tabela 10. Sistema de classificação de embriões ao 5º dia de desenvolvimento segundo os critérios morfológicos de Istambul. O sistema baseia-se na classificação de 3 parâmetros em simultâneo: grau de expansão do blastocisto, massa celular interna e trofoectoderme (Alpha & ESHRE, 2011).

Classificação de Blastocistos (Critérios Istambul) Dia 5 – 116h (+/-2)		
1		
Boa qualidade	BL2-1-1	
	BL3 1-1	
	BL4-1-1	
2		
Qualidade razoável	BL1	BL3-1-2
		BL3-2-1
		BL3-2-2
	BL2-1-2	
	BL2-2-1	BL4-2-1
	BL2-2-2	BL4-1-2
		BL4-2-2
3		
Má qualidade	BL2-2-3	
	BL2-3-2	
	BL2-3-3	
		BL4-2-3
	BL3-2-3	BL4-3-2
	BL3-3-2	BL4-3-3
	BL3- 3-3	

3.8 Avaliação da qualidade embrionária: Sistema *Eeva test*

De modo a analisar o potencial de desenvolvimento dos embriões foi utilizado o sistema *Eeva test*. Este *software* encontra-se associado ao sistema Geri+, o que possibilita a gravação de todas as imagens do desenvolvimento embrionário, podendo ser visualizadas neste sistema computacional à parte do sistema de incubação. Deste modo, este sistema permite seguir o desenvolvimento de cada embrião, para além de ser um sistema de seleção automático por tratamento retrospectivo de dados.

O *software Eeva Test* atribui uma classificação a cada embrião de 3º dia com base em parâmetros morfocinéticos associados a tempos de ocorrência de várias etapas celulares conjugado com a classificação morfológica. Para esta análise, foi necessário registar manualmente, no *software*, o número de células que cada embrião apresentava às 68h. Apenas com esta informação, o sistema analisou o tempo que o embrião demorou a completar a primeira citocinese e os momentos em que ocorreram a segunda e terceira citocineses. Tendo em conta estes parâmetros, o sistema *Eeva test* atribuiu uma classificação de 1 a 5 a cada embrião, sendo que a classificação de 1 foi atribuída a embriões de elevada qualidade e maior potencial de desenvolvimento e a classificação de 5 foi atribuída a embriões de baixa qualidade e menor potencial de desenvolvimento.

3.9 Transferência de embriões

Para a transferência dos embriões, foi preparada uma placa de 4 poços contendo um poço com 350 µl de meio de carregamento (Embryo-Glue™, *Vitrolife*) e outro poço com 500 µl de meio de cultura (G-TL™, *Vitrolife*) e colocada na estufa a 37°C, com 6% CO₂ e 5% O₂ pelo menos 5 horas antes do procedimento. Os embriões que apresentaram melhor qualidade foram selecionados e colocados durante 15 minutos no meio de carregamento. Este meio, também designado como meio de adesão, é uma solução viscosa que se assemelha às propriedades naturais das secreções uterinas. Deste modo, apresenta como vantagens reduzir a probabilidade de expulsão dos embriões após transferência e facilitar a aposição e adesão do embrião ao endométrio.

O carregamento dos embriões foi feito para um cateter de transferência acoplado a uma seringa, iniciando-se com aspiração de meio de carregamento, seguindo-se meio

de carregamento com os embriões e por fim aspiração de ar para criar uma bolha. De seguida, o cateter foi levado para a sala de transferência e entregue ao ginecologista, que o movimentou suavemente através do canal cervical até atingir o útero. Este procedimento foi monitorizado através de uma ecografia abdominal e os embriões foram depositados a 1/2 cm do fundo uterino. Após a expulsão dos embriões, o cateter foi levado de novo para o laboratório para verificar se os embriões não ficaram retidos. Caso isso aconteça, os embriões devem ser novamente carregados num novo cateter e imediatamente transferidos.

3.10 Avaliação das taxas de gravidez e de abortamento

Passado um período de 15 a 20 dias após a transferência embrionária, foi realizado o exame de deteção da β HCG (*β -Human chorionic gonadotropin*) através de uma análise sanguínea à paciente. A β -gonadotrofina coriônica humana é uma hormona produzida pelas células da trofoectoderme e é um sinal da implantação do embrião no útero. Após a análise, o laboratório foi informado caso houvesse confirmação da gravidez ou abortamento.

3.11 Análise estatística

3.11.1 Variáveis em estudo e preparação dos dados

De modo a avaliar se a classificação automática do *Eeva* tem alguma correlação com a classificação segundo os critérios de Istambul ou se poderá ter alguma capacidade de previsão dos melhores embriões para transferir ao 5º dia, foi feita uma análise de variância (ANOVA) com os dados obtidos. Segundo os critérios de Istambul, os embriões foram classificados de 1 a 3, sendo que os embriões de melhor qualidade foram classificados com 1 e de pior qualidade com 3. O sistema *Eeva test* atribuiu uma classificação de 1 a 5, sendo que 1 foi atribuído a embriões de elevada qualidade e maior potencial de desenvolvimento e 5 a embriões de baixa qualidade e menor potencial de desenvolvimento. Deste modo, as variáveis consideradas foram a

classificação embrionária ao 3º e 5º dia pelos critérios de Istambul e a avaliação fornecida pelo *Eeva*.

Foram também recolhidas informações sobre a idade feminina, técnica de RHA utilizada, patologias associadas a cada caso, qualidade ovocitária, dados do espermograma, número de embriões de cada ciclo e respetiva classificação ao 3º e 5º dia e ainda os dados referentes a implantação e gravidez confirmadas.

Inicialmente, para se estudar as correlações entre as variáveis foi utilizado um teste de correlação τ de *Kendall* para avaliar a independência entre elas. Este teste é não paramétrico, uma vez que as variáveis não têm uma distribuição normal. Em estatística, o coeficiente de correlação de *Kendall*, comumente designado de coeficiente tau de *Kendall* (devido à letra grega τ) é uma medida de associação para variáveis ordinais. Um teste tau é um teste de hipóteses não paramétrico referente à dependência estatística baseada no coeficiente tau (Abdi, 2007).

A correlação de *Kendall* entre duas variáveis é elevada se as observações tiverem uma classificação semelhante entre elas (ou idêntica no caso de a correlação ser igual a 1). Do mesmo modo, a correlação de *Kendall* é baixa quando as observações tiverem uma classificação diferente (ou completamente diferente no caso de a correlação ser igual a -1) comparadas as duas variáveis. Deste modo, quando o coeficiente de correlação se aproxima de 1, nota-se um aumento no valor de uma variável quando a outra também aumenta, ou seja, há uma relação linear positiva. Quando o coeficiente se aproxima de -1, também é possível dizer que as variáveis são correlacionadas, mas nesse caso quando o valor de uma variável aumenta o da outra diminui, sendo assim chamada de correlação negativa ou inversa. Um coeficiente de correlação próximo de zero indica que não há relação entre as duas variáveis, e quanto mais eles se aproximam de 1 ou -1, mais forte é a relação (Abdi, 2007).

Adicionalmente foi feito um teste de *Wilcoxon* para estudar as relações entre a técnica de RHA utilizada e a qualidade embrionária, bem como as relações entre a classificação atribuída a cada embrião e a taxa de gravidez. Este é um teste de hipóteses não paramétrico utilizado quando se deseja comparar duas amostras relacionadas (TaHERi & Hesamian, 2013).

3.11.2 Análises de regressão linear

Para verificar a relação existente entre as variáveis aplicaram-se modelos de regressão linear. A análise de regressão linear é um método estatístico utilizado para analisar a relação existente entre variáveis, sendo essas designadas como variáveis dependentes e variáveis independentes (Grömping, 2006). Assim, a relação linear simples entre Y e X é definida pela equação linear:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i$$

β_0 é denominado interceto ou coeficiente linear e corresponde à ordenada na origem da representação gráfica do modelo linear e β_1 é denominado coeficiente de regressão ou coeficiente angular e representa o declive da reta associada ao modelo. O índice i indica a referência de cada observação com $i=1,2,\dots,n$ e X_i são as n observações da variável explicativa. ε_i representa o desvio entre cada observação real Y_i e o correspondente valor estimado pelo modelo. Os erros ε_i têm valor médio de zero e variância σ^2 (Grömping, 2006). Ou seja, numa regressão linear, Y varia em função de $\beta_1 X_i$ mais um valor constante de β_0 . O coeficiente angular β_1 representa a taxa com que Y aumenta em relação a X_i . Deste modo, podemos traçar a reta que melhor se ajusta aos nossos dados, ou seja, aquela que minimiza a soma de quadrados do erro. Para esta análise utilizamos a função `lm()` do *software* R (Team, 2013).

Toda a análise estatística foi realizada no *software* R. As representações visuais dos resultados, bem como a criação dos gráficos de regressão linear, foram desenvolvidos utilizando as funções *ggpubr* (Kassambara, 2017) e *visreg* (Breheny & Burchett, 2017) do *software* R.

4. Resultados

4.1 Resultados descritivos da amostra

Neste estudo foram analisados 131 ciclos com um total de 738 embriões. Dentro destes, a técnica de FIV foi aplicada em 70 casos (53,4%) e a ICSI a 61 dos ciclos mencionados (46,6%). O número de embriões de cada ciclo variou entre 1 e 16 com média de 4.32 e desvio padrão de 3.05. A média da idade das pacientes foi de 39.16 com desvio padrão de 5.12, sendo que a idade mínima foi de 26 e máxima 49. A classificação pelos critérios de Istambul atribuída aos embriões de 3º dia variou entre 1 e 3, sendo que a média obtida foi de 2.28 com desvio padrão de 0.82. Para os embriões de 5º dia, a classificação segundo os critério de Istambul variou entre 1 e 3, apresentando uma média de 2.20 com desvio padrão de 0.77. A classificação atribuída pelo *Eeva* variou entre 1 e 5 e apresentou uma média de 3.02 com desvio padrão de 1.46. Por fim, houve 49 casos de gravidez confirmada em 131 ciclos (37.4%).

4.2 Correlações das variáveis: teste de correlação τ de *Kendall*

O coeficiente de correlação de *Kendall* é uma medida de associação para variáveis ordinais. No nosso estudo, a correlação entre a classificação de Istambul ao 3º dia e ao 5º dia apresentou o valor de $\tau = 0.27$, $p < 6.7e-14$. A correlação entre a classificação do *Eeva* e a de 3º dia pelos critérios de Istambul teve um valor de $\tau = 0.38$, $p < 2.2e-16$ e a correlação entre a classificação do *Eeva* e dos critérios de Istambul ao 5º dia foi de $\tau = 0.43$, $p < 2.2e-16$. Podemos verificar desde já que há uma clara correlação positiva significativa entre as variáveis e que a classificação do *Eeva* tem uma melhor correlação com cada critério do que os critérios de Istambul entre si.

4.3 Relações entre a técnica utilizada e qualidade embrionária

Tendo em conta as diferentes técnicas de inseminação aplicadas, avaliou-se a qualidade embrionária ao 3º e 5º dia de desenvolvimento relativamente a cada uma das técnicas, testando a significância das diferenças.

Ao 3º dia de desenvolvimento embrionário e segundo os critérios de Istambul, a qualidade média dos embriões com a técnica FIV foi de 2.31. Por outro lado, a qualidade média dos embriões ao 3º dia de desenvolvimento ao ser realizada uma ICSI foi de 2.21. Ao ser realizado o teste de *Wilcoxon* não se verificaram diferenças significativas entre a qualidade embrionária usando diferentes técnicas de RHA ao 3º dia de desenvolvimento (*Wilcoxon rank* = 63083, *p-value* = 0.1189).

Ao 5º dia de desenvolvimento embrionário e avaliando segundo os critérios de Istambul, a qualidade média dos embriões utilizando FIV foi de 2.20 e realizando uma ICSI foi também de 2.20. Mais uma vez, não se verificaram diferenças significativas entre a qualidade embrionária usando diferentes técnicas de RHA ao 5º dia de desenvolvimento (*Wilcoxon rank* = 42860, *p-value* = 0.97).

Segundo a classificação atribuída pelo *software Eeva*, a qualidade média dos embriões quando realizada uma FIV foi de 2.96 e uma ICSI foi de 3.14. Novamente verificamos que, segundo o *Eeva*, não há diferenças significativas entre a qualidade embrionária usando diferentes técnicas (*Wilcoxon rank* = 55192, *p-value* = 0.1261).

Deste modo, segundo os critérios de Istambul, são ligeiramente melhores os embriões obtidos com ICSI, já o oposto verifica-se com o *Eeva* em que os embriões obtidos por FIV apresentam melhor qualidade. No entanto, verificamos que não há diferenças significativas entre a qualidade média dos embriões para cada técnica e cada critério.

4.4 Relações entre a classificação do Eeva e os critérios de Istambul

4.4.1 Relação entre classificação de Istambul ao 3º e 5º dia

De forma a estudar a relação entre as classificações atribuídas aos embriões, segundo os critérios de Istambul, ao 3º e 5º dia de desenvolvimento, aplicou-se o seguinte modelo de regressão linear logística:

$$\text{lm}(\text{Istambul 5} \sim \text{Istambul 3})$$

De seguida, aplicou-se a análise de variância (Anova) para este modelo, sendo a variável de resposta Istambul 5. Esta análise revelou que a relação entre a qualidade dos embriões ao 3º e 5º dia, avaliando segundo os critérios de Istambul, apresenta significância na sua interação ($SQ = 35.59$; $p = 2.823\text{e-}15$ *) (Tabela 11). Isto significa que a classificação atribuída aos embriões ao 3º dia pode ser preditiva da qualidade dos embriões ao 5º dia, ou seja, embriões que apresentem determinada classificação ao 3º dia manterão essa classificação até ao 5º dia.

Tabela 11. Análise de desviância para prever a qualidade embrionária ao 5º dia a partir da classificação atribuída ao 3º dia. São apresentados a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. A significância é representada por “*”.

	SQ	gl	F	<i>p-value</i> (>F)
Istambul 3	35.59	1	65.561	2.823e-15 *
Residuais	349.65	644		

De modo a comparar e verificar o ajuste deste modelo efetuou-se uma análise de desviância tendo em conta o modelo nulo e o modelo selecionado, usando o modelo $\text{lm}(\text{Istambul 5} \sim 1)$ (Tabela 12). A soma dos quadrados residuais apresentada pelo modelo nulo é de 385.24 e no modelo selecionado esta é significativamente mais baixa com o valor de 349.65. Assim, segundo o princípio da parcimónia, verifica-se que o modelo selecionado é adequado para prever a qualidade embrionária ao 5º dia, mostrando assim uma relação entre a qualidade ao 3º e 5º dia de desenvolvimento.

Tabela 12. Análise de desviância para comparar com o modelo nulo $lm(Istambul\ 5 \sim 1)$. São apresentados os graus de liberdade residuais (glR), a soma dos quadrados dos residuais (SQR), os graus de liberdade (gl), a soma dos quadrados (SQ), a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. O símbolo “**” representa significância.

	glR	SQR	gl	SQ	F	<i>p-value</i> (>F)
Modelo nulo	645	385.24				
Modelo Istambul 3	644	349.65	1	35.595	65.561	2.823e-15*

A relação prevista pelo modelo pode ser visualizada na figura 15, onde se verifica que existe uma relação direta entre a qualidade embrionária ao 3º e 5º dia. Isto significa que a classificação atribuída a embriões ao 3º dia é semelhante à classificação dada ao 5º dia, verificando-se assim que a qualidade ao 3º dia é um bom preditor da qualidade ao 5º dia e a classificação destes dias é semelhante. No entanto, a qualidade ao 3º dia não prevê todo o espectro do 5º dia, comprimindo para valores mais conservadores (entre 1.83 e 2.41) (Tabela 17).

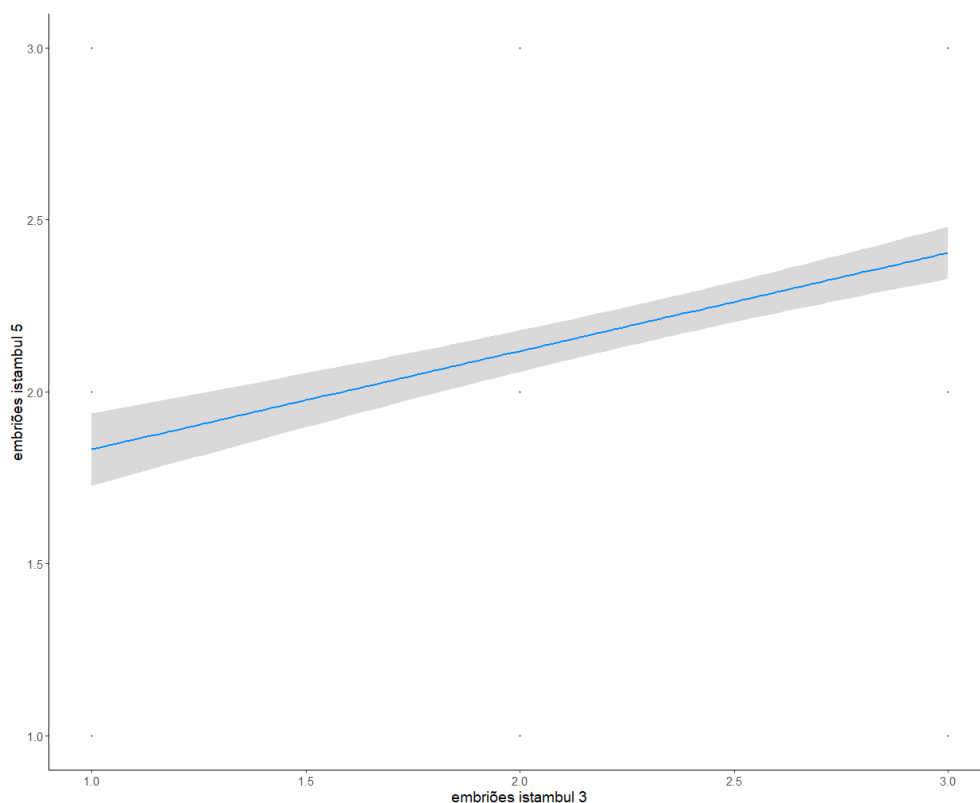


Figura 15. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representado por um gráfico com linha de regressão. Está representada a relação entre a classificação da qualidade embrionária ao 3º e 5º dia de desenvolvimento usando uma classificação segundo os critérios de Istambul.

4.4.2 Relação entre a classificação atribuída pelo *Eeva* e pelos critérios de Istambul ao 3º dia de desenvolvimento embrionário

Para estudar a relação entre a classificação atribuída pelo *software Eeva* ao 3º dia de desenvolvimento embrionário e a classificação dada pelo embriologista seguindo os critérios de Istambul, foi selecionado o seguinte modelo de regressão linear logística:

$$\text{Im (Istambul 3} \sim \text{Eeva)}$$

Através da análise de variância (Anova) para este modelo, tendo como variável de resposta Istambul 3, verificamos que a relação entre a classificação do *Eeva* e a classificação segundo os critérios de Istambul ao 3º dia apresenta significância na sua interação (SQ = 91.88; $p = 2.2\text{e-}16$ *) (Tabela 13). Deste modo, constatamos que as classificações dadas pelo *Eeva* apresentam similaridade com as atribuídas pelo embriologista usando os critérios de Istambul ao 3º dia e que o *software Eeva* é um bom preditor da qualidade dos embriões ao 3º dia comparando com os critérios usados na classificação morfológica.

Tabela 13. Análise de desviância para prever a qualidade embrionária ao 3º dia a partir da classificação atribuída pelo *software Eeva*. São apresentados a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. A significância é representada por “*”.

	SQ	gl	F	<i>p-value</i> (>F)
<i>Eeva</i>	91.88	1	166.3	2.2e-16 *
Residuais	406.62	736		

A verificação ao modelo foi realizada por uma análise de variância tendo em conta o modelo nulo e o modelo selecionado, usando $\text{Im (Istambul 3} \sim 1)$ (Tabela 14). A análise de variância mostrou que o modelo selecionado é significativamente mais adequado que o modelo nulo, uma vez que a soma dos quadrados residuais apresentada pelo modelo nulo é de 498.50 e no modelo selecionado esta é significativamente mais baixa com o valor de 406.62.

Tabela 14. Tabela da análise de desviância para comparar com o modelo nulo lm (Istambul 3 ~ 1). São apresentados os graus de liberdade residuais (glR), a soma dos quadrados dos residuais (SQR), os graus de liberdade (gl), a soma dos quadrados (SQ), a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. O símbolo “*” representa significância.

	glR	SQR	gl	SQ	F	<i>p-value</i> (>F)
Modelo nulo	737	498.50				
Modelo <i>Eeva</i>	736	406.62	1	91.875	166.3	2.2e-16*

Na figura 16 podemos visualizar a relação prevista pelo modelo e os efeitos significativos observados. A classificação do *Eeva test* demonstra ser um bom preditor da qualidade embrionária ao 3º dia, apesar de ter um alcance comprimido, apresentando valores entre 1.79 e 2.76 (Tabela 17).

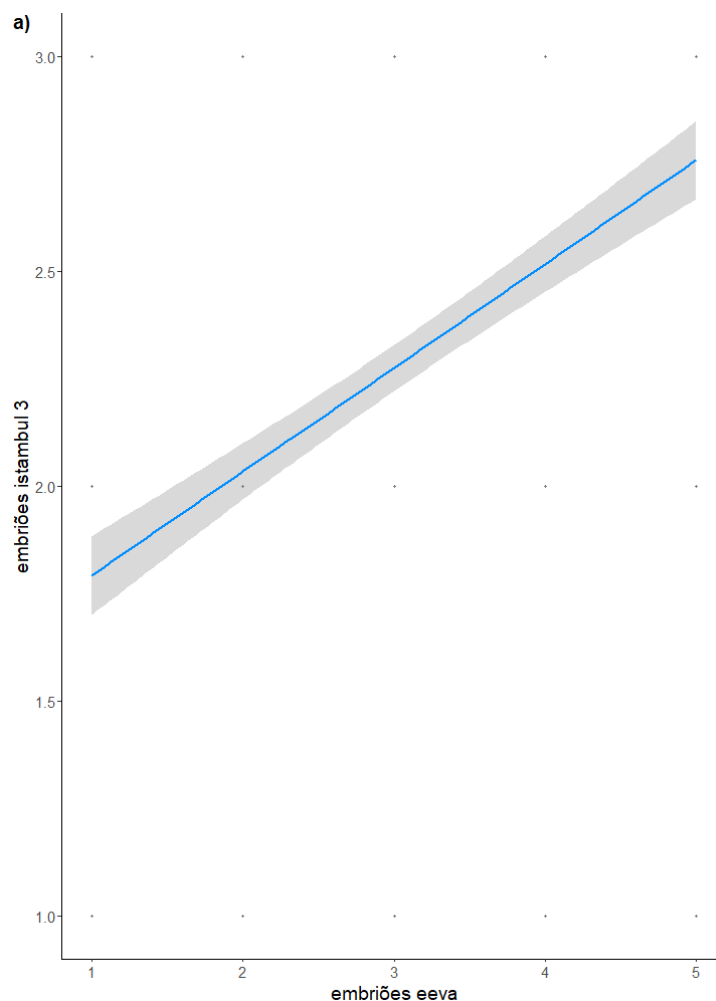


Figura 16. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representado por um gráfico com linha de regressão. Está representada a relação entre a classificação atribuída pelo *software Eeva* e a classificação segundo os critérios de Istambul ao 3º dia de desenvolvimento embrionário.

4.4.3 Relação entre a classificação atribuída pelo *Eeva* e pelos critérios de Istambul ao 5º dia de desenvolvimento embrionário

Por fim, para analisar a relação entre a classificação atribuída pelo *software Eeva* e a classificação atribuída segundo os critérios de Istambul ao 5º dia de desenvolvimento foi utilizado o seguinte modelo de regressão linear logística:

$$\text{Im (Istambul 5 ~ Eeva)}$$

A análise de variância (Anova) demonstrou um efeito significativo na relação entre a classificação do *Eeva* e a classificação ao 5º dia segundo os critérios de Istambul, ou seja, estas duas variáveis apresentam significância na sua interação ($SQ = 96.79$; $p = 2.2e-16$ *) (Tabela 15). Deste modo, verificamos que as classificações atribuídas por este *software* apresentam similaridade com as atribuídas pelos critérios de Istambul ao 5º dia, demonstrando assim que o *Eeva* é um bom preditor da qualidade embrionária ao 5º dia.

Tabela 15. Análise de desviância para prever a qualidade embrionária ao 5º dia a partir da classificação atribuída pelo *software Eeva*. São apresentados a soma dos quadrados (SQ), os graus de liberdade (gl) para cada parâmetro, a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. A significância é representada por “*”.

	SQ	gl	F	<i>p-value</i> (>F)
<i>Eeva</i>	96.79	1	216.1	2.2e-16 *
Residuais	288.45	644		

O ajuste deste modelo relativamente ao modelo nulo efetuou-se novamente recorrendo a uma análise de variância, tendo em conta o modelo $\text{Im (Istambul 5 ~ 1)}$ (Tabela 16). A soma dos quadrados residuais apresentada pelo modelo nulo é de 498.50. Já no modelo selecionado esta é substancialmente mais baixa apresentando um valor de 406.62. Verifica-se assim que o modelo selecionado é significativamente mais adequado que o modelo nulo pois a soma dos quadrados residuais é significativamente mais baixa do que em relação ao modelo nulo.

Tabela 16. Tabela da análise de desviância para comparar o modelo selecionado com o modelo nulo lm (Istambul 5 ~ 1). São apresentados os graus de liberdade residuais (glR), a soma dos quadrados dos residuais (SQR), os graus de liberdade (gl), a soma dos quadrados (SQ), a estatística da análise de anova para obter o *p-value* associado a uma distribuição de F (*Fischer*) e o *p-value* correspondente. O símbolo “*” representa significância.

	glR	SQR	gl	SQ	F	<i>p-value</i> (>F)
Modelo nulo	645	498.50				
Modelo <i>Eeva</i>	644	406.62	1	96.79	216.1	2.2e-16*

Os efeitos previstos pelo modelo selecionado podem ser visualizados na figura 17, onde se verifica que a classificação apresentada pelo *Eeva* é um bom preditor da qualidade embrionária ao 5º dia, apresentando valores entre 1.66 e 2.72. Este *software* prevê especialmente bem a qualidade dos embriões ao 5º dia, apresentando no gráfico mais de 52% do espectro coberto (Tabela 17).

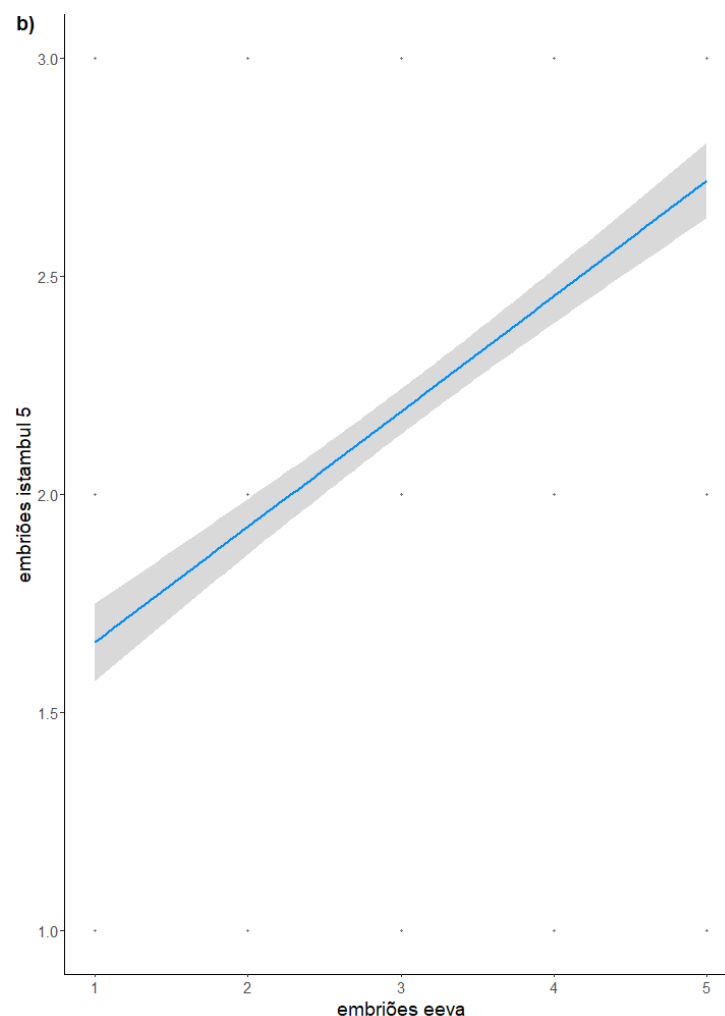


Figura 17. Efeitos previstos pelo modelo selecionado representado por um gráfico com linha de regressão. Está representada a relação entre a classificação atribuída pelo *software Eeva* e a classificação segundo os critérios de Istambul ao 5º dia de desenvolvimento embrionário.

Tabela 17. Tabela com as estimativas previstas conforme o modelo para cada variável em estudo, apresentando os modelos Istambul 5 ~ Istambul 3 (classificação de Istambul ao 5º dia prevista por Istambul ao 3º dia), Istambul 3 ~ *Eeva* (classificação de Istambul ao 3º dia prevista pelo *Eeva*) e Istambul 5 ~ *Eeva* (classificação de Istambul ao 5º dia prevista pelo *Eeva*). São apresentados os valores mínimos, a média, os valores máximos e a extensão do espectro que é coberta no gráfico.

	Istambul 5 prevista por Istambul 3	Istambul 3 prevista pelo <i>Eeva</i>	Istambul 5 prevista pelo <i>Eeva</i>
Mínimo	1.83	1.79	1.66
Média	2.20	2.28	2.19
Máximo	2.41	2.76	2.72
Extensão	0.57 (28.60%)	0.97 (48.31%)	1.06 (52.89 %)

Concluimos assim que estes modelos para fazerem previsões estimam a qualidade de forma mais conservadora, sendo mais difícil estimarem embriões de melhor qualidade com confiança do que os de pior qualidade. No entanto, estes modelos conseguem diferenciá-los razoavelmente bem. Verificamos também que o *Eeva* prevê com maior sucesso a qualidade ao 3º e 5º dia de desenvolvimento do que a classificação segundo critérios morfológicos ao 3º dia pode prever a classificação ao 5º dia.

4.5 Relações entre gravidez e qualidade embrionária

4.5.1 Qualidade embrionária ao 3º dia e sucesso na gravidez

Por fim, foi estudada a relação entre a qualidade dos embriões e a taxa de gravidez. Para isso, foi efetuada uma comparação entre a qualidade média dos embriões com gravidez positiva e a qualidade média dos embriões na situação geral.

A qualidade média embrionária ao 3º dia de desenvolvimento com gravidez positiva foi de 2.14. Já a qualidade média dos embriões ao 3º dia de um modo geral foi de 2.28. De seguida, efectuou-se o teste de *Wilcoxon* que apresentou um valor de 40680, *p-value* = 0.087. Concluimos assim que não se verificam diferenças significativas, no entanto, estes valores demonstram uma proximidade à significância que pode indicar uma tendência, mediante uma maior amostra.

4.5.2 Qualidade embrionária ao 5º dia e sucesso na gravidez

A qualidade média dos embriões ao 5º dia de desenvolvimento e que apresentaram gravidez clínica confirmada foi de 1.81. Por outro lado, os embriões de 5º dia, de um modo geral, apresentaram uma qualidade média de 2.20. Ao ser realizado o teste de *Wilcoxon* verificou-se que o valor é significativo, demonstrando assim a capacidade de diferenciação relativamente ao sucesso de gravidez. Isto significa que é possível através da classificação atribuída ao 5º dia perspetivar o sucesso na gravidez (*Wilcoxon rank* = 25518, *p-value* = 1.83e-06).

4.5.3 Classificação atribuída pelo *Eeva* e sucesso na gravidez

Por fim, segundo a classificação atribuída pelo *software Eeva*, a qualidade média dos embriões que apresentaram gravidez clínica confirmada foi de 2.41 e dos embriões de uma maneira geral foi de 3.02. O teste de *Wilcoxon* efetuado demonstrou que se verificaram diferenças significativas entre a classificação atribuída pelo *Eeva* e a taxa de gravidez, demonstrando assim que este *software* tem a capacidade de diferenciar os embriões relativamente ao sucesso na gravidez (*Wilcoxon rank* = 34262, *p-value* = 2.73e-05).

5. Discussão dos resultados

5.1 Qualidade embrionária para as diferentes técnicas de RHA

A técnica de RHA a ser utilizada em cada ciclo depende amplamente de vários fatores sendo eles a história reprodutiva do casal, o quadro clínico e os resultados da análise ao esperma (Speyer *et al.*, 2019). Sendo diagnosticada uma oligospermia severa (baixa concentração de espermatozóides), astenozoospermia (baixa motilidade) ou teratozoospermia (morfologia anormal) a técnica a realizar deve ser uma ICSI, bem como nos casos de ausências de fertilização em ciclos anteriores ou para a realização do Diagnóstico Genético Pré-Implantação (DGPI) (Van Landuyt *et al.*, 2005, Speyer *et al.*, 2019). Da mesma forma, a ICSI deve ser a primeira escolha em ciclos em que são utilizados ovócitos congelados, em casos de infertilidade idiopática, idade materna avançada ou baixa qualidade ovocitária (Tournaye *et al.*, 2002, Thornhill *et al.*, 2005, Borini *et al.*, 2009). No entanto, a FIV continua a ser uma técnica muito utilizada nos casos em que não se verificam as situações anteriormente apresentadas, uma vez que é uma técnica menos dispendiosa e invasiva, além de apresentar um menor risco inerente à manipulação dos gametas (Collins, 2002, Verpoest & Tournaye, 2006).

Diferentes autores ao compararem a FIV tradicional com a ICSI, na ausência de um fator masculino grave, não verificaram nenhuma diferença na taxa de fertilização e potencial de implantação dos embriões obtidos com as duas técnicas (Staessen *et al.*, 1999, Gozlan *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2007). Estes estudos também demonstraram não existirem vantagens em usar ICSI nos casos em que não há um fator masculino grave associado e onde a FIV ainda é o tratamento de escolha. No entanto, apenas se verificou que a única vantagem da ICSI parece ser minimizar o risco de falha completa da fertilização (Fishel *et al.*, 2000, Plachot *et al.*, 2002, Van Landuyt *et al.*, 2005, Borini *et al.*, 2009).

Neste trabalho, não se verificaram diferenças significativas entre a qualidade embrionária ao 3º e 5º dia de desenvolvimento nem segundo a classificação obtida pelo *Eeva* quando usadas as técnicas de FIV ou ICSI. Apenas se verificou que, avaliando os embriões segundo os critérios de Istambul ao 3º e 5º dia, são de qualidade ligeiramente superior os obtidos com ICSI, já o oposto verificou-se com o *Eeva* em que os embriões obtidos por FIV apresentaram melhor qualidade.

Os resultados obtidos estão de acordo com o reportado em outros trabalhos que demonstram uma ausência de significância quando comparadas as duas técnicas para

a qualidade dos embriões nas diferentes fases do desenvolvimento (Calderon *et al.*, 1995, Ruiz *et al.*, 1997, Staessen *et al.*, 1999, Fishel *et al.*, 2000, Bukulmez *et al.*, 2000, Taylor *et al.*, 2008, Yoeli *et al.*, 2008, Fang *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos comparativos têm demonstrado que não há diferenças na qualidade morfológica do embrião, indicando que o desenvolvimento embrionário é semelhante para embriões obtidos com FIV ou ICSI, sendo que a micromanipulação parece não ter efeito sobre o desenvolvimento morfológico dos embriões (Staessen *et al.*, 1999).

Os nossos resultados também estão de acordo com os obtidos num estudo de 2005 (Van Landuyt *et al.*, 2005), que avaliou a qualidade dos blastocistos e a técnica de RHA utilizada. Segundo este estudo, a qualidade dos blastocistos caracterizada pela formação de uma MCI bem definida, uma TE com um número elevado de células e com velocidade de desenvolvimento dentro dos parâmetros normais, não foi influenciada pelo método de fertilização (Schoolcraft *et al.*, 1999, Van Landuyt *et al.*, 2005). No entanto, existem estudos que demonstram que o recurso à ICSI em ciclos sem fator de infertilidade masculino aumenta a taxa de fecundação e a qualidade dos embriões resultantes (Ludwig *et al.*, 1997, Khamsi *et al.*, 2001, Borini *et al.*, 2009).

Nos últimos tempos, a ICSI tem sido uma técnica cada vez mais utilizada nos laboratórios de reprodução humana, uma vez que, independentemente da causa da infertilidade, está associada a uma menor probabilidade de falhas de fecundação e a um potencial aumento do número de embriões (Ola *et al.*, 2001, Abu-Hassan & Al-Hasani, 2003). No entanto, segundo os dados obtidos neste estudo e corroborados pela literatura, no que diz respeito à qualidade embrionária, a sua utilização não parece ser justificada e, por isso, deve ser considerada apenas nos casos em que haja evidências concretas para tal.

5.2 Classificação do *Eeva* e classificação morfológica

Durante o desenvolvimento embrionário ocorrem diversos processos celulares, desde a fusão dos PN até à formação do blastocisto, que devem ser avaliados. Esta monitorização é crucial, sendo necessário avaliar os embriões ao 3º e 5º dia de desenvolvimento segundo parâmetros morfológicos. Prolongar a cultura embrionária até ao 5º dia parece aumentar a discriminação do potencial embrionário. No entanto, de acordo com os resultados de vários estudos (Rijnders & Jansen, 1998, Graham *et al.*, 2000), os critérios tradicionais para a avaliação de embriões ao 3º dia parecem ser relativamente ineficientes para prever a qualidade ao 5º dia, isto significa que, na fase de clivagem, o potencial de seleção para transferência e criopreservação ao 5º dia parece ser inadequado.

No estudo de Graham *et al.* (2000) foi comparada a qualidade de embriões individuais ao 3º dia e na fase de blastocistos e encontraram uma falta de correlação entre a qualidade em ambos os estádios em cerca de metade dos embriões. Demonstraram também que embriões de baixa qualidade no estágio de clivagem desenvolveram-se até à fase de blastocisto e produziram gestações saudáveis (Graham *et al.*, 2000). Contudo, segundo o trabalho de Balaban *et al.* (2000) os resultados mostram que a taxa de progressão até à fase de blastocisto está correlacionada com a qualidade do embrião no estágio de clivagem, no entanto, a qualidade do embrião no estágio de clivagem não é um determinante da qualidade do blastocisto (Balaban *et al.*, 2000).

No nosso trabalho, verificou-se uma relação direta entre a qualidade embrionária ao 3º e 5º dia, significando assim que a qualidade ao 3º dia é um bom preditor da qualidade ao 5º dia, uma vez que a classificação foi semelhante. No entanto, a qualidade ao 3º dia não prevê todo o espectro do 5º dia, comprimindo para valores mais conservadores (Figura 15, Tabela 7) faltando assim sensibilidade nos resultados. De modo a obter resultados mais conclusivos e melhorar a sensibilidade do modelo seriam necessários mais dados e uma maior amostra. O número reduzido de dados deste trabalho poderá ser uma justificação para a diferença nos resultados obtidos e o que está descrito na literatura.

Como o desenvolvimento embrionário segue uma sequência de eventos celulares dinâmicos no tempo, o uso de parâmetros que tenham em consideração a duração dos processos celulares com a morfologia do próprio embrião são cada vez mais estudados. Porém, o uso destes critérios ainda não foi validado nem comparado com métodos tradicionais de seleção de embriões baseados apenas na morfologia

(Conaghan *et al.*, 2013). Além disso, na bibliografia, ainda são poucos os estudos que avaliam o uso de parâmetros morfocinéticos e o uso da tecnologia *time-lapse* para auxiliar os embriologistas na seleção de embriões com maior potencial de desenvolvimento até à fase de blastocistos.

O *software Eeva* foi desenvolvido para prever o potencial de desenvolvimento (alto, médio ou baixo) de cada embrião para atingir a formação de blastocisto com base numa análise automatizada de parâmetros morfocinéticos (Kieslinger *et al.*, 2016).

Estudos recentes têm demonstrado que a avaliação morfológica e temporal dos embriões por meio de imagens de *time-lapse* pode identificar parâmetros relacionados com o potencial de desenvolvimento embrionário (Wong *et al.*, 2010, Meseguer *et al.*, 2011, Kirkegaard *et al.*, 2012). No entanto, o uso corrente destes parâmetros requer documentação adicional, incluindo validação científica e demonstração prospetiva no uso clínico (Conaghan *et al.*, 2013).

Segundo um estudo para validar o uso do *Eeva* e a utilização de parâmetros do ciclo celular capturados por imagem de *time-lapse* de Conaghan *et al.* (2013), a formação de blastocistos de boa qualidade poderia ser prevista no estágio de clivagem usando tempos do ciclo celular. Foi também demonstrado que os tempos de P2 (o tempo entre a primeira e a segunda citocinese) e P3 (o tempo entre a segunda e a terceira citocinese) eram preditivos da qualidade ao 5º dia.

Um estudo recente de 2015 (Diamond *et al.*, 2015) demonstrou que o uso auxiliar do *Eeva test* é altamente informativo e permite a seleção de embriões com alto potencial de desenvolvimento. Independentemente da prática clínica e do nível de experiência, os embriologistas foram capazes de melhorar consistentemente a sua capacidade de selecionar embriões com maior potencial de desenvolvimento, particularmente entre embriões de morfologia boa e razoável. Portanto, o *Eeva* pode ajudar os embriologistas clínicos a tomarem decisões ao selecionar embriões para transferência ou criopreservação.

Outros estudos também têm validado a precisão de rastreamento e predição do sistema *Eeva* na qualidade dos embriões de 5º dia e têm demonstrado que adicionar o *Eeva* à utilização de critérios morfológicos ao 3º dia melhora significativamente a capacidade de embriologistas experientes selecionarem embriões com alto potencial de desenvolvimento (Conaghan *et al.*, 2013, VerMilyea *et al.*, 2014, Kovacs, 2014, Kieslinger *et al.*, 2016, Adamson *et al.*, 2016).

No nosso trabalho apresentamos também resultados do estudo que teve como objetivo caracterizar a eficácia e a utilidade do *Eeva* como um teste automatizado de formação de blastocistos e validar o seu auxílio para os embriologistas na seleção de embriões ao 3º dia com maior potencial de desenvolvimento. Para tal comparamos a classificação atribuída aos embriões segundo parâmetros morfológicos ao 3º e 5º dia com a classificação atribuída pelo *software* de rastreamento *Eeva*.

Segundo os resultados obtidos verificamos que a relação entre a classificação do *Eeva* e a classificação segundo os critérios de Istambul ao 3º dia apresenta significância na sua interação (Tabela 3). Deste modo, o *Eeva* apresentou uma classificação semelhante à classificação atribuída por um embriologista segundo critérios morfológicos, apesar de apresentar um alcance comprimido pelo número reduzido de dados (Figura 16, Tabela 7).

Por outro lado, também concluímos que existe um efeito significativo na relação entre a classificação do *Eeva* e a classificação ao 5º dia segundo os critérios de Istambul (Tabela 5). Deste modo, as classificações atribuídas por este *software* apresentam similaridade com as atribuídas pelo embriologista ao 5º dia, demonstrando assim que o *Eeva* é um bom preditor do potencial de desenvolvimento embrionário, particularmente avaliando a qualidade ao 5º dia (Figura 17, Tabela 7).

Verificamos também que o *Eeva* prevê com maior sucesso a qualidade ao 3º e 5º dia de desenvolvimento do que a classificação segundo critérios morfológicos ao 3º dia pode prever a classificação ao 5º dia.

Apesar do número reduzido de dados deste trabalho, foi possível verificar que o *software Eeva* é o melhor a prever a qualidade embrionária ao 5º dia, sendo consistente com os resultados de outros trabalhos já referidos.

5.3 Taxa de gravidez e qualidade embrionária

A cultura e monitorização do desenvolvimento embrionário é uma etapa crucial dos ciclos de RHA, uma vez que permite a seleção dos melhores embriões para transferência. É essencial otimizar a selecção de embriões para garantir a transferência de um único que tenha a probabilidade de se desenvolver e dar origem a uma gravidez viável (Aguilar *et al.*, 2014).

A seleção de embriões com base apenas na avaliação da morfologia embrionária nem sempre está associada a uma maior taxa de implantação ou gravidez (Desai *et al.*, 2000). Vários estudos têm demonstrado que alguns parâmetros morfológicos são mais preditivos de um potencial de implantação como é o caso do número de células do embrião. Estudados individualmente, os parâmetros morfológicos como fragmentação, a existência de vacúolos e compactação não foram suficientes para prever a gravidez (Desai *et al.*, 2000).

Estas conclusões sobre o número total de células de um embrião de 3º dia e a sua relação com a gravidez estão de acordo com as de vários autores (Giorgetti *et al.*, 1995, Ziebe *et al.*, 1997), sugerindo que embriões com clivagem mais lenta influenciam as taxas de gravidez de maneira negativa. Deste modo, segundo a literatura mencionada, a classificação da qualidade embrionária ao 3º dia pode dar um prognóstico do resultado da gravidez.

Os nossos resultados não vão ao encontro do descrito na literatura, uma vez que não observamos diferenças significativas entre a qualidade dos embriões ao 3º dia e a taxa de gravidez quando transferidos ao 5º dia. No entanto, os valores obtidos demonstram uma proximidade à significância que pode indicar uma tendência, mediante uma maior amostra. Sendo assim, futuramente, seria importante expandir o número de casos estudados, de modo a se obter uma amostra mais representativa.

O prolongar da cultura embrionária até à fase de blastocisto apresenta várias vantagens, sendo elas uma melhor monitorização do desenvolvimento dos embriões e seleção dos mesmos, sincronização entre o endométrio e o embrião (Balaban *et al.*, 2000), mas também permite avaliar o desenvolvimento embrionário até à ativação do genoma do zigoto (Gardner & Lane, 1997). Deste modo, a transferência ao 5º dia tem sido uma prática mais recorrente, e segundo vários estudos, apresenta também maiores taxas de implantação e gravidez (Gardner & Lane, 1997, Graham *et al.*, 2000, Kovacs, 2014, Kieslinger *et al.*, 2016).

Segundo a literatura, a qualidade dos blastocistos está claramente associada à implantação e gravidez, sendo que blastocistos de boa qualidade (graus 1 e 2) apresentam taxas de implantação muito altas e blastocistos de má qualidade (grau 3) taxas muito menores (Balaban *et al.*, 2000). O nosso trabalho apresentou resultados semelhantes aos descritos, mais uma vez demonstrando a capacidade de diferenciação relativamente ao sucesso da gravidez tendo em conta a qualidade dos embriões ao 5º dia. Blastocistos de elevada qualidade apresentaram taxas de gravidez mais elevadas sendo assim possível, através da classificação atribuída ao 5º dia, perspetivar o sucesso na gravidez.

A maioria dos estudos que utilizam o *software Eeva* apenas usam a formação de blastocistos como desfecho (Chen *et al.*, 2013, Conaghan *et al.*, 2013). Contudo, estudos recentemente publicados têm relatado taxas de implantação e gravidez clínica significativamente mais altas quando o *Eeva*, combinado com a morfologia, é usado para a seleção prospetiva de embriões (VerMilyea *et al.*, 2014, Adamson *et al.*, 2016, Kieslinger *et al.*, 2016).

Um estudo de Kieslinger *et al.* (2016) mostrou que a transferência de embriões de elevada e média qualidade, segundo o *Eeva*, resultou em taxas de gravidez significativamente maiores quando comparado com embriões de baixa qualidade. (Kieslinger *et al.*, 2016).

Um estudo recente de Adamson *et al.* (2016) apresentou também resultados de que a combinação da morfologia ao 3º dia com a classificação atribuída pelo *Eeva* resultou em taxas de implantação e gravidez clínica significativamente mais altas. Além disso, uma pontuação alta no *Eeva* refletiu uma probabilidade consistentemente maior de implantação e gravidez do que uma pontuação baixa. Portanto, a classificação atribuída pelo *Eeva* pode auxiliar a escolha dos embriões para transferência que têm maior probabilidade de implantar (Adamson *et al.*, 2016).

Os resultados do nosso trabalho também demonstraram que embriões classificados com boa qualidade no *Eeva* apresentam uma maior taxa de gravidez confirmada, demonstrando assim que este *software* tem a capacidade de diferenciar os embriões relativamente ao sucesso na gravidez.

6. Conclusão

A utilização de novas tecnologias de *time-lapse* tem permitido um grande avanço no estudo dos processos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário. Sendo este um processo dinâmico que segue uma sequência de eventos celulares em intervalos de tempo muito específicos, o uso de um sistema de classificação de embriões apenas baseado na morfologia tem-se mostrado ser limitativo.

Com o desenvolvimento de tecnologias de aquisição de imagens e *softwares* tem sido possível a avaliação e monitorização continuada dos embriões e também o estudo combinado da morfologia e cinética.

O Sistema *Eeva test* é um *software* que fornece aos embriologistas uma avaliação automatizada dos parâmetros de qualidade embrionária recorrendo às propriedades preditivas da morfocinética associadas à análise morfológica. Apesar de ser uma tecnologia com grande potencial de uso nos laboratórios de embriologia, a sua utilização requer validação científica e demonstração prospetiva de utilidade clínica.

Este estudo permitiu validar a utilização do *software Eeva test* e o uso de certos marcadores morfocinéticos, como o tempo entre a primeira e a segunda citocinese e entre a segunda e a terceira citocinese, como sendo preditivos do potencial embrionário até à fase de blastocisto bem como o uso deste sistema para selecionar os melhores embriões com vista a uma melhor taxa de implantação e gravidez.

No futuro, é importante continuar a desenvolver estudos sobre o uso destas tecnologias nos laboratórios de reprodução humana e validar a sua utilização na seleção dos melhores embriões.

7. Referências

- Abdi, H., (2007) The Kendall rank correlation coefficient. *Encyclopedia of Measurement and Statistics*. Sage, Thousand Oaks, CA: 508-510.
- Abu-Hassan, D. & S. Al-Hasani, (2003) The use of ICSI for all cases of in-vitro conception. *Human Reproduction* **18**: 893-a-893-a.
- Adamson, G.D., M.E. Abusief, L. Palao, J. Witmer, L.M. Palao & M. Gvakharia, (2016) Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertility and sterility* **105**: 369-375. e366.
- Agarwal, A., A. Mulgund, A. Hamada & M.R. Chyatte, (2015) A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology* **13**: 37.
- Agerholm, I., C. Hnida, D. Crüger, C. Berg, G. Bruun-Petersen, S. Kølvrå & S. Ziebe, (2008) Nuclei size in relation to nuclear status and aneuploidy rate for 13 chromosomes in donated four cells embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics* **25**: 95-102.
- Aguilar, J., Y. Motato, M.J. Escribá, M. Ojeda, E. Munoz & M. Meseguer, (2014) The human first cell cycle: impact on implantation. *Reproductive biomedicine online* **28**: 475-484.
- Ahlström, A., C. Westin, E. Reimer, M. Wikland & T. Hardarson, (2011) Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Human reproduction* **26**: 3289-3296.
- Alikani, M., G. Calderon, G. Tomkin, J. Garrisi, M. Kokot & J. Cohen, (2000) Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human reproduction* **15**: 2634-2643.
- Alikani, M., J. Cohen, G. Tomkin, G.J. Garrisi, C. Mack & R.T. Scott, (1999) Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and sterility* **71**: 836-842.
- Alper, M.M., (2011) Treatment options III. In vitro fertilization. In: The Boston IVF Handbook of Infertility. CRC Press, pp. 81-94.
- Alpha & ESHRE, (2011) Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reproductive biomedicine online* **22**: 632-646.
- Armstrong, S., P. Bhide, V. Jordan, A. Pacey, J. Marjoribanks & C. Farquhar, (2019) Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

- Armstrong, S., A. Vail, S. Mastenbroek, V. Jordan & C. Farquhar, (2015) Time-lapse in the IVF-lab: how should we assess potential benefit? *Human Reproduction* **30**: 3-8.
- Bączkowski, T., R. Kurzawa & W. Głąbowski, (2004) Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reproductive biology* **4**: 5-22.
- Balaban, B., B. Urman, A. Isiklar, C. Alatas, S. Aksoy, R. Mercan, A. Mumcu & A. Nuhoglu, (2001) The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Human Reproduction* **16**: 2357-2361.
- Balaban, B., B. Urman, A. Sertac, C. Alatas, S. Aksoy & R. Mercan, (2000) Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility* **74**: 282-287.
- Balaban, B., K. Yakin & B. Urman, (2006) Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. *Fertility and sterility* **85**: 559-563.
- Barbieri, R.L., (2019) Female infertility. In: Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology. Elsevier, pp. 556-581. e557.
- Basile, N., M. Caiazzo & M. Meseguer, (2015) What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **27**: 193-200.
- Bavister, B.D., (2002) Early history of in vitro fertilization. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-* **124**: 181-196.
- Bergh, C., (2005) Single embryo transfer: a mini-review. *Human Reproduction* **20**: 323-327.
- Biggers, J.D., (2012) IVF and embryo transfer: historical origin and development. *Reproductive biomedicine online* **25**: 118-127.
- Boivin, J., L. Bunting, J.A. Collins & K.G. Nygren, (2007) International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction* **22**: 1506-1512.
- Borini, A., A. Gambardella, M.A. Bonu, L. Dal Prato, R. Sciajno, L. Bianchi & M. Cattoli, (2009) Comparison of IVF and ICSI when only few oocytes are available for insemination. *Reproductive biomedicine online* **19**: 270-275.
- Breheny, P. & W. Burchett, (2017) Visualization of regression models using visreg. *R J.* **9**: 56.
- Brugo-Olmedo, S., C. Chillik & S. Kopelman, (2001) Definition and causes of infertility. *Reproductive biomedicine online* **2**: 173-185.
- Bukulmez, O., H. Yarali, A. Yucel, T. Sari & T. Gurgan, (2000) Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro fertilization for patients with a tubal factor as their sole

- cause of infertility: a prospective, randomized trial. *Fertility and sterility* **73**: 38-42.
- Calderon, G., I. Belil, B. Aran, A. Veiga, Y. Gil, M. Boada, F. Martinez, N. Parera, B. Coroleu & J. Penella, (1995) Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilization: first results. *Human Reproduction* **10**: 2835-2839.
- Chen, A.A., L. Tan, V. Suraj, R.R. Pera & S. Shen, (2013) Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertility and sterility* **99**: 1035-1043.
- Chen, C.-H., X. Zhang, R. Barnes, E. Confino, M. Milad, E. Puschek & R.R. Kazer, (2003) Relationship between peak serum estradiol levels and treatment outcome in in vitro fertilization cycles after embryo transfer on day 3 or day 5. *Fertility and sterility* **80**: 75-79.
- Ciray, H.N., A. Campbell, I.E. Agerholm, J. Aguilar, S. Chamayou, M. Esbert & S. Sayed, (2014) Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Human Reproduction* **29**: 2650-2660.
- Collins, J.A., (2002) An international survey of the health economics of IVF and ICSI. *Human reproduction update* **8**: 265-277.
- Conaghan, J., A.A. Chen, S.P. Willman, K. Ivani, P.E. Chenette, R. Boostanfar, V.L. Baker, G.D. Adamson, M.E. Abusief & M. Gvakharia, (2013) Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and sterility* **100**: 412-419. e415.
- Coskun, S., A. Hellani, K. Jaroudi, H. Al-Mayman, M. Al-Kabra & M. Qeba, (2003) Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reproductive BioMedicine Online* **7**: 86-90.
- Cousineau, T.M. & A.D. Domar, (2007) Psychological impact of infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **21**: 293-308.
- Cruz, M., B. Gadea, N. Garrido, K.S. Pedersen, M. Martínez, I. Pérez-Cano, M. Muñoz & M. Meseguer, (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**: 569-573.
- Daniluk, J.C., (1988) Infertility: intrapersonal and interpersonal impact. *Fertility and sterility* **49**: 982-990.

- De Kretser, D. & H. Baker, (1999) Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**: 3443-3450.
- Desai, N., S. Ploskonka, L.R. Goodman, C. Austin, J. Goldberg & T. Falcone, (2014) Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12**: 54.
- Desai, N.N., J. Goldstein, D.Y. Rowland & J.M. Goldfarb, (2000) Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction* **15**: 2190-2196.
- Diamond, M.P., V. Suraj, E.J. Behnke, X. Yang, M.J. Angle, J.C. Lambe-Steinmiller, R. Watterson, K.A. Wirka, A.A. Chen & S. Shen, (2015) Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *Journal of assisted reproduction and genetics* **32**: 61-68.
- Dias, T.R., C.-L. Cho & A. Agarwal, (2019) Sperm Assessment: Traditional Approaches and Their Indicative Value. In: *In Vitro Fertilization*. Springer, pp. 249-263.
- Drakopoulos, P., C. Blockeel, D. Stoop, M. Camus, M. de Vos, H. Tournaye & N.P. Polyzos, (2016) Conventional ovarian stimulation and single embryo transfer for IVF/ICSI. How many oocytes do we need to maximize cumulative live birth rates after utilization of all fresh and frozen embryos? *Human reproduction* **31**: 370-376.
- Ebner, T., M. Moser, M. Sommergruber, U. Gaiswinkler, O. Shebl, K. Jesacher & G. Tews, (2005) Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and Sterility* **83**: 1635-1640.
- Ebner, T., M. Moser, M. Sommergruber, U. Gaiswinkler, R. Wiesinger, M. Puchner & G. Tews, (2003) Presence, but not type or degree of extension, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Human Reproduction* **18**: 2406-2412.
- Edwards, R.G. & H.K. Beard, (1997) Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Molecular human reproduction* **3**: 863-905.
- Elder, K. & B. Dale, (2020) *In-vitro fertilization*. Cambridge University Press.
- Fabozzi, G., A. Alteri, E. Rega, M.F. Starita, C. Piscitelli, P. Giannini & A. Colicchia, (2016) Morphological assessment on day 4 and its prognostic power in selecting viable embryos for transfer. *Zygote* **24**: 477-484.

- Fancsovits, P., Á. Murber, Z.T. Gilán, J. Rigó Jr & J. Urbancsek, (2011) Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reproductive biomedicine online* **23**: 513-516.
- Fang, C., J. Tang, R.e.d. Huang, L. Li, M. Zhang & X. Liang, (2012) Comparison of IVF outcomes using conventional insemination and ICSI in ovarian cycles in which only one or two oocytes are obtained. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction* **41**: 650-656.
- Feuer, S. & P. Rinaudo, (2012) Preimplantation stress and development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* **96**: 299-314.
- Fishel, S., I. Aslam, F. Lisi, L. Rinaldi, J. Timson, M. Jacobson, L. Gobetz, S. Green, A. Campbell & R. Lisi, (2000) Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? *Human Reproduction* **15**: 1278-1283.
- Gardner, D.K. & M. Lane, (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human reproduction update* **3**: 367-382.
- Gardner, D.K., M. Lane, J. Stevens, T. Schlenker & W.B. Schoolcraft, (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and sterility* **73**: 1155-1158.
- Gardner, R., (1996) Can developmentally significant spatial patterning of the egg be discounted in mammals? *Human Reproduction Update* **2**: 3-27.
- Gardner, R., (2001) Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development* **128**: 839-847.
- Garello, C., H. Baker, J. Rai, S. Montgomery, P. Wilson, C. Kennedy & G. Hartshorne, (1999) Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Human Reproduction* **14**: 2588-2595.
- Gianaroli, L., M.C. Magli, A.P. Ferraretti, D. Fortini & N. Grieco, (2003) Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and sterility* **80**: 341-349.
- Giorgetti, C., P. Terriou, P. Auquier, E. Hans, J.-L. Spach, J. Salzmann & R. Roulier, (1995) Implantation: Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Human Reproduction* **10**: 2427-2431.
- Goodman, L.R., J. Goldberg, T. Falcone, C. Austin & N. Desai, (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**: 275-285. e210.

- Gozlan, I., A. Dor, B. Farber, D. Meirow, S. Feinstein & J. Levron, (2007) Comparing intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in patients with single oocyte retrieval. *Fertility and sterility* **87**: 515-518.
- Grafodatskaya, D., C. Cytrynbaum & R. Weksberg, (2013) The health risks of ART. *EMBO reports* **14**: 129-135.
- Graham, J., T. Han, R. Porter, M. Levy, R. Stillman & M.J. Tucker, (2000) Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertility and sterility* **74**: 495-497.
- Griffiths, T., A. Murdoch & M. Herbert, (2000) Embryonic development in vitro is compromised by the ICSI procedure. *Human Reproduction* **15**: 1592-1596.
- Grömping, U., (2006) Relative importance for linear regression in R: the package relaimpo. *Journal of statistical software* **17**: 1-27.
- Group, E.C.W., (2005) Fertility and ageing. *Human reproduction update* **11**: 261-276.
- Group, E.C.W., (2007) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution. *Human reproduction update* **13**: 515-526.
- Hardarson, T., C. Hanson, A. Sjögren & K. Lundin, (2001) Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction* **16**: 313-318.
- Hardarson, T., L. Van Landuyt & G. Jones, (2012) The blastocyst. *Human reproduction* **27**: i72-i91.
- Hardy, K., J. Stark & R.M. Winston, (2003) Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biology of Reproduction* **68**: 1165-1169.
- Herrero, J. & M. Meseguer, (2013) Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertility and sterility* **99**: 1030-1034.
- Holte, J., L. Berglund, K. Milton, C. Garelllo, G. Gennarelli, A. Revelli & T. Bergh, (2007) Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction* **22**: 548-557.
- Iwata, K. & Y. Mio, (2016) Observation of human embryonic behavior in vitro by high-resolution time-lapse cinematography. *Reproductive medicine and biology* **15**: 145-154.
- Jackson, K.V., E.S. Ginsburg, M.D. Hornstein, M.S. Rein & R.N. Clarke, (1998) Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertility and sterility* **70**: 60-66.

- Juriscova, A., S. Varmuza & R. Casper, (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *MHR: Basic science of reproductive medicine* **2**: 93-98.
- Kahraman, S., K. Yakın, E. Dönmez, H. Şamlı, M. Bahce, G. Cengiz, S. Sertyel, M. Şamlı & N. İmirzalıoğlu, (2000) Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* **15**: 2390-2393.
- Kamel, R.M., (2013) Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *Journal of reproduction & infertility* **14**: 96.
- Kaser, D.J. & C. Racowsky, (2014) Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Human reproduction update* **20**: 617-631.
- Kassambara, A., (2017) ggpubr:“ggplot2” based publication ready plots. R package version 0.1. 6. In., pp.
- Keltz, M.D., J.C. Skorpinski, K. Bradley & D. Stein, (2006) Predictors of embryo fragmentation and outcome after fragment removal in in vitro fertilization. *Fertility and sterility* **86**: 321-324.
- Khamsi, F., Y. Yavas, S. Roberge, J.C. Wong, I.C. Lacanna & M. Endman, (2001) Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non–male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertility and sterility* **75**: 342-347.
- Kieslinger, D.C., S. De Gheselle, C.B. Lambalk, P. De Sutter, E.H. Kosteljik, J.W. Twisk, J. van Rijswijk, E. Van den Abbeel & C.G. Vergouw, (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**: 2450-2457.
- Kim, H.H., M.K. Bundorf, B. Behr & S.W. McCallum, (2007) Use and outcomes of intracytoplasmic sperm injection for non–male factor infertility. *Fertility and sterility* **88**: 622-628.
- Kirkegaard, K., I.E. Agerholm & H.J. Ingerslev, (2012) Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Human reproduction* **27**: 1277-1285.
- Kirkegaard, K., U.S. Kesmodel, J.J. Hindkjær & H.J. Ingerslev, (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**: 2643-2651.
- Kirkegaard, K., L. Sundvall, M. Erlandsen, J.J. Hindkjær, U.B. Knudsen & H.J. Ingerslev, (2015) Timing of human preimplantation embryonic development is confounded by embryo origin. *Human Reproduction* **31**: 324-331.

- Kovacs, P., (2014) Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology* **12**: 124.
- Kumar, N. & A.K. Singh, (2015) Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of human reproductive sciences* **8**: 191.
- Kyogoku, H., T.S. Kitajima & T. Miyano, (2014) Nucleolus precursor body (NPB): a distinct structure in mammalian oocytes and zygotes. *Nucleus* **5**: 493-498.
- Lagalla, C., M. Barberi, G. Orlando, R. Sciajno, M.A. Bonu & A. Borini, (2015) A quantitative approach to blastocyst quality evaluation: morphometric analysis and related IVF outcomes. *Journal of assisted reproduction and genetics* **32**: 705-712.
- Larsen, U., (2005) Research on infertility: which definition should we use? *Fertility and sterility* **83**: 846-852.
- Leridon, H. & R. Slama, (2008) The impact of a decline in fecundity and of pregnancy postponement on final number of children and demand for assisted reproduction technology. *Human Reproduction* **23**: 1312-1319.
- Ludwig, M., S. Al-Hasani, W. K pker, O. Bauer & K. Diedrich, (1997) A new indication for an intracytoplasmic sperm injection procedure outside the cases of severe male factor infertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* **75**: 207-210.
- Lundqvist, M., U. Johansson,  . Lundkvist, K. Milton, C. Westin & N. Simberg, (2001) Does pronuclear morphology and/or early cleavage rate predict embryo implantation potential? *Reproductive biomedicine online* **2**: 12-16.
- Machtinger, R. & C. Racowsky, (2013) Morphological systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive biomedicine online* **26**: 210-221.
- Magli, M., L. Gianaroli & A. Ferraretti, (2001) Chromosomal abnormalities in embryos. *Molecular and Cellular Endocrinology* **183**: S29-S34.
- Magli, M.C., L. Gianaroli, A.P. Ferraretti, M. Lappi, A. Ruberti & V. Farfalli, (2007) Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertility and sterility* **87**: 534-541.
- Magli, M.C., G.M. Jones, K. Lundin & E. Van den Abbeel, (2012) Atlas of human embryology: from oocytes to preimplantation embryos. *Hum Reprod* **27**: i1.
- Maheshwari, A., M. Hamilton & S. Bhattacharya, (2008) Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Human reproduction* **23**: 538-542.
- Meriano, J.S., J. Alexis, S. Visram-Zaver, M. Cruz & R.F. Casper, (2001) Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Human Reproduction* **16**: 2118-2123.

- Meseguer, M., J. Herrero, A. Tejera, K.M. Hilligsøe, N.B. Ramsing & J. Remohí, (2011) The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction* **26**: 2658-2671.
- Meseguer, M., I. Rubio, M. Cruz, N. Basile, J. Marcos & A. Requena, (2012) Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and sterility* **98**: 1481-1489. e1410.
- Milewski, R., P. Kuć, A. Kuczyńska, B. Stankiewicz, K. Łukaszuk & W. Kuczyński, (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**: 571-579.
- Mills, M., R.R. Rindfuss, P. McDonald & E. Te Velde, (2011) Why do people postpone parenthood? Reasons and social policy incentives. *Human reproduction update* **17**: 848-860.
- Monitoring, T.L., (2015) Time Lapse, the Cell Cycle, Distribution of Morphokinetic Timings, and Known Implantation Data.
- Montag, M., B. Toth & T. Strowitzki, (2013) New approaches to embryo selection. *Reproductive biomedicine online* **27**: 539-546.
- Munné, S. & J. Cohen, (1998) Chromosome abnormalities in human embryos. *Human reproduction update* **4**: 842-855.
- NAFA, E.-S., (2002) Manual on basic semen analysis. *Nordic Association for Andrology*.
- Nagy, Z.P., D. Dozortsev, M. Diamond, L. Rienzi, F. Ubaldi, R. Abdelmassih & E. Greco, (2003) Pronuclear morphology evaluation with subsequent evaluation of embryo morphology significantly increases implantation rates. *Fertility and sterility* **80**: 67-74.
- Neri, Q.V., N. Pereira, T. Cozzubbo, Z. Rosenwaks & G.D. Palermo, (2017) Intracytoplasmic sperm injection Technical aspects. In: *Textbook of Assisted Reproductive Techniques*. CRC Press, pp. 141-155.
- Ola, B., M. Afnan, K. Sharif, S. Papaioannou, N. Hammadieh & C. LR Barratt, (2001) Should ICSI be the treatment of choice for all cases of in-vitro conception? Considerations of fertilization and embryo development, cost effectiveness and safety. *Human Reproduction* **16**: 2485-2490.
- Otsuki, J., A. Okada, K. Morimoto, Y. Nagai & H. Kubo, (2004) The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Human Reproduction* **19**: 1591-1597.

- Papale, L., A. Fiorentino, M. Montag & G. Tomasi, (2012) The zygote. *Human Reproduction* **27**: i22-i49.
- Payne, D., S.P. Flaherty, M.F. Barry & C.D. Matthews, (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction (Oxford, England)* **12**: 532-541.
- Picou, A., H. Werland, K. Silverberg & M. VerMilyea, (2019) Blastocyst formation and pregnancy rate comparison between standard large box (Sanyo) incubators and a novel Geri® time-lapse incubator. *Reproductive BioMedicine Online* **39**: e7.
- Plachot, M., J. Belaisch-Allart, J.-M. Mayenga, A. Chouraqui, L. Tesquier & A.M. Serkine, (2002) Outcome of conventional IVF and ICSI on sibling oocytes in mild male factor infertility. *Human Reproduction* **17**: 362-369.
- Podsiadly, B., L. Goulding, K. Stevenson, A. Donohue, S. Mcarthur, R. Woolcott & T. Roy, (2016) PP-038-Culture in the Genea Embryo Review Incubator (GERI) time-lapse bench top incubation system provides equivalent results to standard bench top incubation. *Reproductive BioMedicine Online* **32**: S18.
- Prados, F.J., S. Debrock, J.G. Lemmen & I. Agerholm, (2012) The cleavage stage embryo. *Human Reproduction* **27**: i50-i71.
- Racowsky, C., C.M. Combelles, A. Nureddin, Y. Pan, A. Finn, L. Miles, S. Gale, T. O'Leary & K.V. Jackson, (2003) Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reproductive biomedicine online* **6**: 323-331.
- Racowsky, C., P. Kovacs & W.P. Martins, (2015) A critical appraisal of time-lapse imaging for embryo selection: where are we and where do we need to go? *Journal of assisted reproduction and genetics* **32**: 1025-1030.
- Richter, K.S., D.C. Harris, S.T. Daneshmand & B.S. Shapiro, (2001) Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and sterility* **76**: 1157-1167.
- Rienzi, L., F. Ubaldi, M. Iacobelli, S. Romano, M.G. Minasi, S. Ferrero, F. Sapienza, E. Baroni & E. Greco, (2005) Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive biomedicine online* **10**: 669-681.
- Rijnders, P. & C. Jansen, (1998) The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction (Oxford, England)* **13**: 2869-2873.
- Roupa, Z., M. Polikandrioti, P. Sotiropoulou, E. Faros, A. Koulouri, G. Wozniak & M. Gourni, (2009) Causes of infertility in women at reproductive age. *Health Science Journal* **3**.

- Royen, E.V., K. Mangelschots, M. Vercruyssen, D.D. Neubourg, M. Valkenburg, G. Ryckaert & J. Gerris, (2003) Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human reproduction* **18**: 1062-1069.
- Ruiz, A., J. Remohí, Y. Minguez, P.P. Guanes, C. Simón & A. Pellicer, (1997) The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertility and sterility* **68**: 171-173.
- Sachs, A.R., J.A. Politch, K.V. Jackson, C. Racowsky, M.D. Hornstein & E.S. Ginsburg, (2000) Factors associated with the formation of triploid zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility* **73**: 1109-1114.
- Sadowy, S., G. Tomkin, S. Munné, T. Ferrara-Congedo & J. Cohen, (1998) Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* **6**: 137-141.
- Sathananthan, H., S. Gunasheela & J. Menezes, (2003) Mechanics of human blastocyst hatching in vitro. *Reproductive biomedicine online* **7**: 228-234.
- Schmidt, L., T. Sobotka, J.G. Bentzen, A. Nyboe Andersen, E. Reproduction & S.T. Force, (2012) Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Human reproduction update* **18**: 29-43.
- Schoolcraft, W., (2007) ICSI: Should It Be Routine in Human in Vitro Fertilization? *Infertility*.
- Schoolcraft, W.B., D.K. Gardner, M. Lane, T. Schlenker, F. Hamilton & D.R. Meldrum, (1999) Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertility and sterility* **72**: 604-609.
- Scott, L., (2003a) The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Human reproduction update* **9**: 237-249.
- Scott, L., (2003b) Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reproductive biomedicine online* **6**: 201-214.
- Scott, L., R. Alvero, M. Leondires & B. Miller, (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human reproduction* **15**: 2394-2403.
- Scott, L., A. Finn, T. O'leary, S. McLellan & J. Hill, (2007) Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Human Reproduction* **22**: 230-240.
- Seibel, M.M. & M.L. Taymor, (1982) Emotional aspects of infertility. *Fertility and sterility* **37**: 137.

- Shapiro, B.S., S.T. Daneshmand, F.C. Garner, M. Aguirre & S. Thomas, (2008) Large blastocyst diameter, early blastulation, and low preovulatory serum progesterone are dominant predictors of clinical pregnancy in fresh autologous cycles. *Fertility and sterility* **90**: 302-309.
- Shapiro, B.S., K.S. Richter, D.C. Harris & S.T. Daneshmand, (2001) A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertility and Sterility* **75**: 1126-1130.
- Speyer, B., H. O'Neill, W. Saab, S. Seshadri, S. Cawood, C. Heath, M. Gaunt & P. Serhal, (2019) In assisted reproduction by IVF or ICSI, the rate at which embryos develop to the blastocyst stage is influenced by the fertilization method used: a split IVF/ICSI study. *Journal of assisted reproduction and genetics* **36**: 647-654.
- Staessen, C., M. Camus, K. Clasen, A. De Vos & A. Van Steirteghem, (1999) Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Human Reproduction* **14**: 2474-2479.
- Swain, J.E., (2013) Could time-lapse embryo imaging reduce the need for biopsy and PGS? *Journal of assisted reproduction and genetics* **30**: 1081-1090.
- Taheri, S. & G. Hesamian, (2013) A generalization of the Wilcoxon signed-rank test and its applications. *Statistical Papers* **54**: 457-470.
- Tao, J., R. Tamis, K. Fink, B. Williams, T. Nelson-White & R. Craig, (2002) The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Human reproduction* **17**: 1513-1518.
- Taylor, T.H., G. Wright, S. Jones-Colon, D. Mitchell-Leef, H.I. Kort & Z.P. Nagy, (2008) Comparison of ICSI and conventional IVF in patients with increased oocyte immaturity. *Reproductive biomedicine online* **17**: 46-52.
- Team, R.C., (2013) R: A language and environment for statistical computing. In.: Vienna, Austria, pp.
- Tesarik, J. & E. Greco, (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human reproduction* **14**: 1318-1323.
- Thornhill, A.R., C. deDie-Smulders, J.P. Geraedts, J. Harper, G. Harton, S. Lavery, C. Moutou, M. Robinson, A. Schmutzler & P. Scriven, (2005) ESHRE PGD Consortium 'Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)'. *Human Reproduction* **20**: 35-48.
- Tournaye, H., G. Verheyen, C. Albano, M. Camus, L. Van Landuyt, P. Devroey & A. Van Steirteghem, (2002) Intracytoplasmic sperm injection versus in vitro

- fertilization: a randomized controlled trial and a meta-analysis of the literature. *Fertility and sterility* **78**: 1030-1037.
- Van Blerkom, J. & G. Henry, (1992) Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Human Reproduction* **7**: 379-390.
- Van Landuyt, L., A. De Vos, H. Joris, G. Verheyen, P. Devroey & A. Van Steirteghem, (2005) Blastocyst formation in in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. *Fertility and sterility* **83**: 1397-1403.
- Van Voorhis, B.J., (2007) In vitro fertilization. *New England Journal of Medicine* **356**: 379-386.
- Veeck, L.L., (1999) Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. *Human gametes and conceptuses*.
- VerMilyea, M.D., L. Tan, J.T. Anthony, J. Conaghan, K. Ivani, M. Gvakharia, R. Boostanfar, V.L. Baker, V. Suraj & A.A. Chen, (2014) Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. *Reproductive biomedicine online* **29**: 729-736.
- Verpoest, W. & H. Tournaye, (2006) ICSI: hype or hazard? *Human fertility* **9**: 81-92.
- Wang, J. & M.V. Sauer, (2006) In vitro fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and clinical risk management* **2**: 355.
- Wang, X., C. Chen, L. Wang, D. Chen, W. Guang, J. French & R.H.S. Group, (2003) Conception, early pregnancy loss, and time to clinical pregnancy: a population-based prospective study. *Fertility and sterility* **79**: 577-584.
- WHO, (2010) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.
- Wininger, J., R. Arning & J. Tucker, (2019) The benefits of performing laser hatching at the time of trophectoderm biopsy. *Reproductive BioMedicine Online* **39**: e6-e7.
- Wong, C.C., K.E. Loewke, N.L. Bossert, B. Behr, C.J. De Jonge, T.M. Baer & R.A.R. Pera, (2010) Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology* **28**: 1115.
- Yanagida, K., H. Katayose, H. Yazawa, Y. Kimura, A. Sato, H. Yanagimachi & R. Yanagimachi, (1999) Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Human reproduction* **14**: 1307-1311.

- Yoeli, R., R. Orvieto, J. Ashkenazi, M. Shelef, Z. Ben-Rafael & I. Bar-Hava, (2008) Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **25**: 23-28.
- Zaninovic, N., R. Berrios, R. Clarke, R. Bodine, Z. Ye & L. Veeck, (2001) Blastocyst expansion, inner cell mass (ICM) formation, and trophectoderm (TM) quality: is one more important for implantation? *Fertility and Sterility* **76**: S8.
- Zegers-Hochschild, F., G.D. Adamson, J. de Mouzon, O. Ishihara, R. Mansour, K. Nygren, E. Sullivan & S. Van der Poel, (2009) The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Human reproduction* **24**: 2683-2687.
- Ziebe, S., K. Petersen, S. Lindenberg, A. Andersen, A. Gabrielsen & A.N. Andersen, (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)* **12**: 1545-1549.