



COMITÊ NACIONAL DE EMBRIOLOGIA

Comitê de Embriologia SBRH apresenta: Atualizações do Consenso de Istambul

The Istanbul Consensus update: a revised ESHRE/ALPHA consensus on oocyte and embryo static and dynamic morphological assessment.

Autores: Fernanda Peruzzato, Carine de Lima e Tamyres Ranzato

Fernanda Souza Peruzzato, Biomédica formada pela UFRGS, Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Diretora de laboratório na Clínica Fecondare, Florianópolis. Embriologista Senior certificada pela ESHRE. Coordenadora do Comitê de Embriologia da SBRH.

Carine de Lima Boa Morte, Biomédica formada pela UFRJ, pós-graduada pelo Instituto Sapientiae, especialista em embriologia clínica pela SBRA, Diretora de laboratório na Clínica Origen Rio.

Tamyres Ranzato, Biomédica formada pela Universidade Federal Fluminense (UFF), pós-graduada pelo Centro Universitário Internacional (UNINTER), embriologista na Clínica Origen Rio.

INTRODUÇÃO

A avaliação do desenvolvimento embrionário é essencial para os tratamentos de reprodução humana assistida, mas ainda enfrenta desafios devido à subjetividade e variabilidade nos métodos de análise morfológica. Nos últimos anos, o uso da tecnologia de time-lapse introduziu a morfocinética, que combina morfologia e dinâmica do desenvolvimento embrionário, melhorando a avaliação da sua qualidade. Embora os estudos sobre morfocinética sejam diversos e influenciados por fatores como idade materna e métodos de inseminação, as observações com uso de timelapse avançaram significativamente a compreensão de diversos eventos de desenvolvimento, até então pouco vistos e compreendidos.

Dessa forma, o Consenso de Istambul, de 2011 (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group 30 Embryology, 2011), que estabeleceu terminologias e critérios a fim de orientar e padronizar a avaliação de oócitos, zigotos e embriões, foi atualizado para incluir novos conhecimentos, especialmente aspectos morfocinéticos.

CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

1. LINHA DO TEMPO ESPERADA PARA DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A partir da fertilização, inicia-se o desenvolvimento embrionário por meio de uma sucessão de divisões mitóticas que duplicam progressivamente o número de células, desenvolvendo assim, a

partir de uma única célula, o embrião, até alcançar a fase de blastocisto. Nos primeiros estágios, a divisão celular é primariamente regulada por fatores maternos, e estudos recentes mostram que a primeira segregação cromossômica é altamente suscetível a erros. Embora o momento exato ainda seja incerto, acredita-se que a ativação do genoma embrionário aconteça até a fase de 8 células, quando os transcritos maternos são degradados. Dado que a competência do embrião reflete seu desenvolvimento, a avaliação morfológica deve acompanhar os estágios temporais estabelecidos.

O consenso de 2011 estabeleceu pontos temporais de observação para diferentes estágios, incluindo fertilização, singamia, clivagem inicial e progressão até o quinto dia de cultivo. Em 2024, os critérios para a avaliação do desenvolvimento embrionário foram revisados, destacando-se a importância da morfocinética e do impacto do método de fertilização nos tempos de desenvolvimento

Estudos mostraram que a primeira clivagem ocorre mais cedo em embriões gerados por ICSI em comparação por FIV, com o estágio de 2 células sendo atingido cerca de 2 horas antes, 26 ± 1 horas pos inseminação (hpi) para ICSI vs. 28 ± 1 hpi para FIV. No entanto, tempos posteriores, como o início da blastulação (tSB) e o blastocisto completo (tB), tendem a ocorrer mais tardiamente nos embriões originados por ICSI.

Além do método de fertilização, diversos fatores podem influenciar a morfocinética embrionária. Estudos indicam que a idade, o índice de massa corporal e o protocolo de estimulação ovariana podem impactar os tempos de desenvolvimento, principalmente nas fases iniciais de clivagem. No entanto, essas diferenças não parecem comprometer a qualidade final do embrião. (Setti et al., 2021).

O tipo de meio de cultura e a tensão de oxigênio também podem afetar os eventos pré-implantacionais, com algumas variações no tempo de compactação, mas sem impacto significativo no desenvolvimento do blastocisto (Dietrich et al., 2020). Níveis elevados de oxigênio (20%) foram associados a um desenvolvimento embrionário mais lento em comparação com níveis fisiológicos (5%). Além disso, fatores ambientais, como temperatura e pH do meio de cultura, podem modular a velocidade do desenvolvimento embrionário, sendo que temperaturas mais baixas e um pH mais alcalino tendem a desacelerar esse processo. (Swain, 2015, Wale e Gardner, 2016).

Revisão sistemática recente e meta análise com mais de 40.000 embriões, mostrou que embriões aneuploides apresentam atraso significativo em dez variáveis morfocinéticas, especialmente a partir do estágio de 8 células até o estágio de blastocisto expandido (Bamford et al., 2022). Alterações na clivagem celular podem estar associadas a falhas nos pontos de verificação do ciclo celular e processos de reparo de DNA. (Regin et al., 2022).

Com o avanço da tecnologia time-lapse (TLT), algoritmos de seleção morfocinética foram propostos para otimizar a seleção embrionária e reduzir o tempo até a gravidez. Estudos indicam que os tempos peri-blastulação são mais preditivos do nascimento vivo que a morfologia tradicional (Bamford et al., 2022, Campbell et al., 2022a). No entanto, ensaios clínicos randomizados não demonstraram melhora significativa nas taxas de gravidez ou nascimento vivo com a seleção algorítmica via TLT (Ahlström et al., 2022, Kieslinger et al., 2023), corroborando os achados da mais recente revisão Cochrane (Armstrong et al., 2019).

A revisão do Consenso de Istambul de 2024 reforça a importância da padronização dos tempos de observação para garantir maior precisão na avaliação embrionária. As principais janelas temporais incluem:

- **Verificação da Fertilização: 16-17 hpi, com 98% dos embriões apresentando pronúcleos.**
- **Singamia: 23 ± 1 hpi, com cerca de 50% dos embriões nesse estágio.**

- **Clivagem Inicial:** O estágio de 2 células ocorre entre 26-28 hpi, dependendo do método de fertilização.
- **Avaliação no Dia 2:** 44±1 hpi, com maioria dos embriões no estágio de 4 células.
- **Dia 3 (8 células):** 68±1 hpi, com aproximadamente 49% dos embriões atingindo essa fase.
- **Mórula:** 92±2 hpi, mas apenas cerca de 47% dos embriões estão nesse estágio nesse tempo.
- **Blastocisto (Dia 5):** 116 ± 2 hpi. O estágio de blastocisto ocorre entre 108 e 116 hpi, com 34% dos embriões atingindo o estágio expandido nesse período.

Os dados mostram que nem todos os embriões seguem a mesma linha do tempo exata, reforçando a necessidade de considerar fatores como o método de fertilização, meio de cultura e condições laboratoriais ao interpretar os tempos morfofocinéticos.

Embora a tecnologia TLT permita uma observação mais precisa, a revisão destaca que mesmo sem essa tecnologia, descrições diárias bem estabelecidas continuam sendo úteis para a avaliação embrionária. A padronização dos tempos de observação possibilita uma maior comparabilidade entre laboratórios e pode ajudar a melhorar os critérios de seleção embrionária, mesmo em contextos sem acesso a tecnologias avançadas.

2. OÓCITOS

A morfologia dos oócitos tem sido amplamente estudada como um indicador potencial da competência embrionária. Desde o Consenso de Istambul de 2011, novos avanços foram incorporados à avaliação dessas estruturas, refinando critérios e considerando sua relação com os desfechos clínicos.

2.1 CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS ATUALIZADOS

O consenso anterior estabelecia que um oócito ideal deveria apresentar forma esférica, zona pelúcida uniforme, citoplasma translúcido e corpúsculo polar de tamanho adequado. No entanto, estudos recentes indicam que a maturidade nuclear e citoplasmática nem sempre ocorrem simultaneamente, o que pode influenciar a competência embrionária (Daya et al., 1990; Ng et al., 1999; Lin et al., 2003).

Apesar da padronização, a adesão dos laboratórios a esses critérios ainda é variável. Dados apontam que apenas 35% das clínicas os aplicam sistematicamente, com maior atenção à avaliação do corpúsculo polar (53%) do que do complexo cumulus-oócito (22%) (La Sala et al., 2009; Dal Canto et al., 2012a).

2.2 COMPLEXO CUMULUS-OÓCITO (COC)

A morfologia do COC tem sido associada a desfechos reprodutivos. Estudos indicam que um COC compacto e uma corona radiata excessivamente aderida podem reduzir as taxas de fertilização e gravidez (Rattanachaiyanont et al., 1999). Coágulos sanguíneos presentes no COC também podem impactar negativamente os resultados, mesmo após sua remoção (Ebner et al., 2008a). Dessa forma, o

registro dessas características pode ser útil, especialmente em ciclos de fertilização in vitro convencional (IVF). Porém mais dados são necessários para conclusões definitivas.

2.3 ZONA PELÚCIDA (ZP) E ESPAÇO PERIVITELINO (PVS)

A espessura, uniformidade e densidade da ZP foram investigadas quanto ao impacto na fertilização e no desenvolvimento embrionário. Algumas pesquisas sugerem que uma ZP irregular ou escurecida pode reduzir as taxas de implantação e nascimento (Shi et al., 2014; Yang et al., 2022), enquanto outros estudos não demonstram impacto significativo (De Sutter et al., 1996). A atualização do consenso reforça que, na ausência de evidências mais robustas, oócitos com diferentes padrões de ZP continuam sendo considerados viáveis.

Quanto ao espaço perivitelino (PVS), os estudos são inconclusivos. Algumas pesquisas indicam que um PVS aumentado pode reduzir a taxa de fertilização (Xia, 1997; Rienzi et al., 2008), mas outras não identificam correlação direta. Assim, a atualização sugere que oócitos com diferentes características de PVS ainda devem ser utilizados clinicamente.

2.4 CORPÚSCULO POLAR (PB)

A fragmentação ou aumento do corpúsculo polar é comumente relatado, porém não há evidências claras de impacto negativo na fertilização. Alguns estudos sugerem uma possível associação com o desenvolvimento embrionário inicial (Ebner et al., 2000; Rienzi et al., 2008), mas não com a implantação ou gravidez (Verlinsky et al., 2003; Ciotti et al., 2004). Assim, oócitos com PB fragmentado ou grande ainda são considerados viáveis para uso clínico, embora um corpúsculo polar excessivamente grande possa indicar alterações no fuso meiótico e exija mais atenção.

2.5 FORMA E TAMANHO

Oócitos maduros normalmente apresentam formato esférico. Porém, formas ovais não parecem comprometer significativamente o desenvolvimento embrionário (De Sutter et al., 1996; Balaban et al., 1998), entretanto oócitos ovais devem ser considerados viáveis para uso clínico. Oócitos pequenos (<100 µm) e grandes (>125 µm) apresentam baixo potencial de desenvolvimento (Bassil et al., 2021), enquanto oócitos gigantes (>180 µm) devem ser excluídos da utilização clínica devido ao risco de serem tetraploides (Rosenbusch et al., 2002).

2.6 INCLUSÕES CITOPLASMÁTICAS

Vacuolização: Estudos associam a presença de vacúolos a menores taxas de fertilização, desenvolvimento embrionário e blastulação, além de menor sobrevida à criopreservação (Ebner et al., 2005; Balaban e Urman, 2006; Rienzi et al., 2008). No entanto, uma meta-análise confirmou essa relação apenas com a fertilização, sem evidências suficientes para impacto negativo no desenvolvimento embrionário (Setti et al., 2011).

Assim, oócitos com vacúolos ainda são considerados viáveis para uso clínico, embora na ICSI seja recomendado evitar a injeção do espermatozoide diretamente sobre um vacúolo.

Corpos Refráteis: Essas inclusões citoplasmáticas podem estar ligadas a menor taxa de fertilização, mas a evidência ainda é insuficiente para sugerir um impacto negativo no desenvolvimento do embrião.

Agregados de Retículo Endoplasmático Liso (SER-a): Têm sido associados a menor qualidade embrionária, reduzidas taxas de implantação e gravidez, além de um maior risco de abortamento e complicações perinatais (Ebner et al., 2008b; Sá et al., 2011; Massarotti et al., 2021; Otsuki et al., 2004). No entanto, estudos mais recentes não confirmaram impacto negativo significativo nos desfechos reprodutivos, sugerindo que o uso clínico de oócitos com SER-a ainda pode ser considerado (Hattori et al., 2014; Shaw-Jackson et al., 2016; Mizobe et al., 2023), conforme o Consenso de Viena.

2.7 GRANULARIDADE E COLORAÇÃO

A granulação citoplasmática central já foi associada a menor qualidade embrionária (Ebner et al., 2008a, Rienzi et al., 2008), alterações na morfologia pronuclear e menor taxa de gravidez (Kahraman et al., 311 2000). No entanto, meta-análises sugerem que pode ser uma característica morfológica normal do oócito (Wilding et al., 2007, Setti et al., 2011, Yi et al., 2019). Não há evidências suficientes para considerar esse fator prejudicial ao desenvolvimento embrionário, tornando esses oócitos viáveis para uso clínico.

Variações na translucidez do citoplasma também foram pouco estudadas e frequentemente observadas junto a outras anomalias. Embora alguns estudos sugiram associação com menor qualidade embrionária (Loutradis et al., 1999, Ten et al., 2007), outros não confirmaram esse efeito (De Sutter et al., 1996, Balaban et al., 1998, Esfandiari et al., 2006, Balaban et al., 2008, Shi et al., 2014). Devido à subjetividade dessa avaliação, oócitos com variação na coloração ainda são considerados adequados para uso clínico.

2.8 IMATURIDADE

Após a estimulação ovariana, cerca de 15-20% dos oócitos permanecem em estágios imaturos (GV ou MI) (ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine, 2017, ESHRE Clinic PI Working Group, 2021), geralmente sendo descartados. No entanto, em pacientes de mau prognóstico ou com crescimento folicular assíncronico, o uso de oócitos imaturos submetidos à maturação *in vitro* (MIV) pode aumentar o número de embriões disponíveis e, potencialmente, as chances de gravidez (Shu et al., 2007).

Estudos demonstram que oócitos MI que maturam em até 6 horas após a coleta podem ser fertilizados com sucesso (De Vos et al., 1999, Balakier et al., 2004, Shu et al., 2007). Por outro lado, aqueles que demoram mais de 24 horas (IVM de Resgate) apresentam menor taxa de fertilização e blastulação (Yang et al., 2021), provavelmente devido a um maior risco de aneuploidia (Strassburger et al., 2010). Além disso, análises morfofocinéticas revelam que embriões originados de MIV apresentam atraso no desenvolvimento inicial em comparação aos provenientes de oócitos MII (Faramarzi et al., 2018, Margalit et al., 2019, Shani et al., 2023).

Embora alguns estudos tenham relatado nascidos vivos após essa abordagem, a evidência ainda é limitada. Assim, o consenso recomenda que o uso clínico de oócitos imaturos seja restrito a casos específicos, como em casos de mau prognóstico.

2.9 MORFOLOGIA E MORFOCINÉTICA DO OÓCITO

A relação entre características morfológicas do oócito e sua morfocinética ainda não é um critério padrão na seleção de gametas. Estudos indicam que a birrefringência da zona pelúcida (ZP) não se correlaciona diretamente com o desenvolvimento embrionário, embora oócitos com alta birrefringência possam atingir mais rapidamente o estágio de 5 células (Faramarzi et al., 2017; Tabibnejad et al., 2018).

Parâmetros como o tempo para extrusão do segundo corpúsculo polar (tPB2), t5 e t8 parecem estar ligados ao diâmetro do oócito, enquanto o tamanho do espaço perivitelino (PVS) não influencia a morfocinética inicial (Faramarzi et al., 2019). Além disso, a presença de SER-a está associada a maior incidência de falhas na extrusão do segundo corpúsculo polar e na clivagem mitótica (Otsuki et al., 2018).

Embora alterações isoladas na morfologia do oócito possam ter impacto limitado, sua combinação pode afetar negativamente os desfechos clínicos (Alikani et al., 1995; Bartolacci et al., 2022).

Em síntese, é importante evitar o uso clínico de oócitos gigantes. Além disso, o uso de oócitos muito pequenos ou grandes, assim como aqueles resgatados por IVM, deve ser registrado adequadamente para garantir um acompanhamento preciso, já que eles parecem ter um potencial de desenvolvimento mais limitado. Os embriões provenientes de oócitos MII, que não apresentem vacúolos grandes ou múltiplos, SER-a e PB primeiro muito grande, devem ser priorizados para tratamentos clínicos. Também é essencial monitorar de perto bebês que nasceram de oócitos com características atípicas ou que passaram por resgates IVM, pois essas situações exigem cuidados especiais.

3. ESTÁGIO DE ZIGOTO

3.1 TEMPO DE AVALIAÇÃO EMBRIONÁRIA

O consenso de Istambul de 2011 recomendava observar os zigotos por volta de **17 ± 1 horas pós-inseminação (hpi)**. Estudos recentes sugerem que o melhor momento para capturar a maioria dos zigotos com **dois pronúcleos (2PN)** visíveis é entre **16-16,5 hpi**, para evitar classificação errada de zigotos que já passaram pela quebra dos pronúcleos (Barrie et al., 2021). O novo consenso recomenda que o momento da observação deve ser entre **16-17 hpi** para minimizar erros na classificação dos zigotos.

3.2 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS AVALIADAS NO ZIGOTO

Características dinâmicas como tamanho do PN, posição e justaposição do PN, padrão do NPB e halo citoplasmático não podem ser avaliadas com precisão durante observações estáticas. Portanto, elas não podem ser usadas consistentemente como biomarcadores de viabilidade.

3.3 NÚMERO DE PRONUCLEOS

Zigotos 2PN continuam sendo a referência para fertilização normal. O termo 0PN deve ser substituído na avaliação estática por não visualizado 2PN. Em alguns casos, embriões de zigotos 1PN podem ser considerados para uso clínico associado a cultivo até blastocisto e PGT-a com avaliação de diploidia biparental se possível, pois uma quantidade significativa se mostrou euploide. O mesmo deve ser considerado em Zigotos 2.1 PN. Já Zigotos 3PN geralmente não são recomendados para uso clínico, mas há necessidade de mais estudos.

4. ESTÁGIO DE CLIVAGEM

A pontuação do embrião em estágio de clivagem deve incluir o número de blastômeros e grau de fragmentação, conforme previamente acordado no Consenso de Istambul (2011). Embriões de duas células no Dia 1, embriões de 4 células no Dia 2 e embriões de 8 células no Dia 3, mostrando <10% de fragmentação, mononucleação e tamanho de célula específico do estágio, devem ser priorizados em caso de transferência do estágio de clivagem ou criopreservação.

Não há evidências suficientes para apoiar um impacto no potencial de implantação para embriões em estágio de clivagem com características atípicas, como desorganização espacial, vacúolos, granularidade citoplasmática e anormalidade de zona, e estes são, portanto, considerados adequados para uso clínico. No entanto, a cultura estendida a blastocisto como uma forma de seleção adicional para viabilidade e avaliação deve ser considerada.

4.1 CLIVAGEM PRECOCE

A importância da pontuação da clivagem precoce para a previsão de taxas de sucesso não foi estabelecida de forma conclusiva. No entanto, pode-se adicionar informações sobre outras características, como binucleação/multinucleação e tamanho da célula. A avaliação da clivagem precoce por TLT pode ser usada para identificar clivagens precoces anormais, como clivagem direta, clivagem reversa e divisão caótica irregular, que devem ser evitadas para transferência.

4.2 COMPACTAÇÃO

Com base em alguns estudos, o início da compactação antes de 8 células parece afetar negativamente a formação do blastocisto, enquanto a compactação de 8 células em diante pode ser um indicador positivo e pode ser usada como uma ferramenta de seleção adicional neste estágio.

5. ESTAGIO DE MÓRULA

Conforme indicado nas diretrizes sobre a nomenclatura e anotação do monitoramento dinâmico de embriões humanos (Ciray et al., 2014), o termo mórula se refere ao "fim do processo de compactação".

Embriões de dia 4 que mostram compactação completa ou cavitação precoce devem ser priorizados em caso de transferência ou vitrificação de dia 4.

Embriões com compactação parcial podem formar blastocistos e devem ser considerados para uso clínico. Estenda a cultura para blastocisto para embriões com características morfológicas atípicas: autocavitação de blastômeros, <50% de embrião compactado, ≤8 células sem compactação, fragmentação excessiva, vacúolos disseminados.

6. ESTÁGIO DE BLASTOCISTO (D4-D7)

O cultivo estendido até o estágio de blastocisto tornou-se prática comum na embriologia clínica nos últimos anos. Nessa prática, verificou-se que uma minoria segue os tempos estabelecidos para avaliação segundo o último consenso. Além disso, o sistema de classificação de Gardner (Gardner e Schoolcraft, 1999) continua sendo majoritariamente utilizado na prática de laboratório.

A inteligência artificial (IA) tem sido um recurso adicional interessante para o processo de avaliação e classificação de blastocistos, especialmente por incluir diversos critérios integrados que vão além do aspecto morfológico em si e permitem identificar o embrião com melhor potencial. Além disso, uma das grandes vantagens da avaliação automatizada é a diminuição da subjetividade comum à classificação convencional. Contudo, essa tecnologia ainda não substitui a avaliação morfológica estática.

6.1 TEMPO DE AVALIAÇÃO EMBRIONÁRIA

Recomenda-se a avaliação de embriões de D5 por volta de $116 \text{ h} \pm 2$ horas pós-inseminação (hpi). No entanto, a formação e expansão de blastocistos viáveis pode ocorrer em diferentes períodos, desde o Dia 4 ($98,4 \pm 0,4$ hpi) até o Dia 7 ($151,2 \pm 0,5$ hpi). Estabelecer uma janela padrão para avaliação embrionária pode ser útil para monitorar indicadores de performance, mas deve-se considerar as necessidades operacionais da rotina, especialmente quando não há ferramenta de timelapse (TL) disponível.

6.2 DIA DA FORMAÇÃO DO BLASTOCISTO

A velocidade de crescimento dos blastocistos está associada à sua viabilidade e potencial de implantação, de forma que os mais lentos apresentam menores taxas de implantação. Por outro lado, blastocistos que se desenvolvem dentro do tempo esperado têm melhores resultados em ciclos frescos (Shebl et al., 2021). Da mesma forma, blastocistos do Dia 4 têm boas taxas de implantação em ciclos congelados (Coticchio et al., 2023). Já blastocistos do Dia 6 apresentam menores taxas de nascidos vivos comparados aos do Dia 5, e isso persiste para transferência de embriões euploides (Tiegs et al., 2019). Quanto a blastocistos do Dia 7, estes representam cerca de 5-10% dos blastocistos considerados viáveis, e têm maior risco de aneuploidia e conseqüente menor potencial de implantação, mas ainda podem resultar em nascimentos saudáveis (Du et al., 2018).

6.3 GRAU DE EXPANSÃO E CLASSIFICAÇÃO DA MCI/TE

O potencial de implantação de blastocistos de acordo com os critérios do Consenso de Istambul (2011) é relacionado ao grau de expansão e à classificação da massa celular interna (MCI) e o trofoectoderma (TE), mas a importância relativa de cada fator ainda é discutida. A classificação do TE é o principal preditor para nascidos vivos, seguida pelo grau de expansão (Hill et al., 2013), enquanto o impacto do grau da MCI é menos claro (Van den Abbeel et al., 2013). Um estudo recente criou uma

classificação complexa para blastocistos, na qual o dia de formação, o estágio de expansão, e os graus da MCI e TE foram significativamente associados à gravidez clínica. O dia de formação teve o maior impacto, seguido pelo grau da MCI, estágio de expansão e grau de TE (Zhan et al., 2020). Quanto às morfologias, resultados com embriões grau A/B são semelhantes, mas embriões grau C são considerados inutilizáveis por muitos especialistas. A falta de consenso é evidente, e a maioria dos profissionais defende a criação de um termo universal para blastocistos não utilizáveis. Embora blastocistos de baixa qualidade classificados como grau C possam ser considerados inviáveis, estudos recentes indicam que estes podem resultar em nascimentos saudáveis, especialmente para pacientes com poucos embriões disponíveis (Kemper et al., 2021). Por fim, blastocistos não viáveis devem ser classificados como "D" em vez de "C", com base em características degenerativas ou na ausência de MCI.

6.4 STATUS CROMOSSÔMICO ANORMAL

Estudos iniciais sugeriram que a morfologia do blastocisto está associada à aneuploidia, de forma que embriões euploides apresentam melhor qualidade de MCI e TE, maior expansão e rápido desenvolvimento (Capalbo et al., 2014). A cinética e a taxa de expansão também estão relacionadas ao risco de aneuploidia (Campbell et al., 2013). O uso de IA mostrou potencial ao correlacionar a morfologia com as taxas de euploidia, embora a precisão diagnóstica ainda seja limitada, podendo identificar blastocistos com maior probabilidade de aneuploidia (Huang et al., 2021). Contudo, essa ferramenta ainda não elimina a necessidade do PGT-A, mas ajuda a definir quais embriões devem ser biopsiados/analizados baseado no potencial de euploidia.

6.5 CONSIDERAÇÕES MORFOLÓGICAS/CINÉTICAS ADICIONAIS

Características adicionais que devem ser consideradas incluem: o colapso espontâneo, presença de pontes citoplasmáticas e visualização de duas MCI. O colapso e reexpansão espontânea ocorre em 1 a cada 4 blastocistos, e alguns trabalhos sugerem que esse padrão pode ter impacto negativo nos resultados clínicos (Sciorio et al., 2020). Além disso, podem ter maior probabilidade de aneuploidia, mas não há diferenças na taxa de implantação de embriões euploides (Bickendorf et al., 2023). Já as pontes citoplasmáticas, essas são estruturas dinâmicas que conectam a MCI e o TE e são envolvidas na comunicação celular, e estão associadas positivamente com a implantação embrionária e embriões de boa qualidade (Ma et al., 2022). Por fim, a presença de duas MCI é rara, mas deve ser avaliada com cautela, pois indicam gestação gemelar monozigótica. Sugere-se transferência desses embriões mediante aconselhamento da(o) paciente(s).

7. DURAÇÃO DO CULTIVO EMBRIONÁRIO E FREQUÊNCIA DE AVALIAÇÃO: SEGURANÇA VS EFICÁCIA

O Consenso de Istambul (2011) oferece uma ampla variedade de parâmetros morfológicos para avaliar óvulos e embriões. Em laboratórios com tecnologia de TL, o cultivo contínuo permite flexibilidade na avaliação sem alterar as condições. Já em observações estáticas, a frequência de

avaliação depende do tipo de incubadora, meio de cultura e duração do cultivo. O objetivo é equilibrar a obtenção de informações mitigando o impacto, pois estes podem influenciar negativamente o desenvolvimento embrionário e reduzir resultados clínicos. O método e frequência de avaliação e monitoramento deve ser adaptados aos equipamentos disponíveis, à rotina do laboratório e ao objetivo de um tratamento de fertilidade rápido, seguro e sustentável. Dentro os centros que participaram da pesquisa para a atualização do consenso, a grande maioria trabalha com cultivo estendido e transferência em blastocistos, mas alguns centros ainda optam pela transferência e congelamento de embriões em clivagem.

A prática crescente de transferência em estágio de blastocistos está associada a melhores taxas de gestação e nascidos vivos, especialmente em pacientes com bom prognóstico (American Society for Reproductive Medicine, 2018). No entanto, uma análise de mais de 100.000 ciclos de FIV/ICSI não encontrou diferença significativa nas taxas de nascidos vivos entre transferência de blastocistos e de embriões em estágio de clivagem (Cameron et al., 2020). A transferência de blastocistos é também relacionada a um tempo menor até a gestação e o nascimento, embora com maior taxa de cancelamento de ciclos (De Vos et al., 2016).

A medicina reprodutiva mundial segue cada vez mais para a prática de transferência de embrião único, a fim de reduzir gestações gemelares e seus riscos. Para isso, estratégias de seleção embrionária são importantes para escolher de forma assertiva o embrião com maior potencial de implantação. Sendo assim, o aumento do cultivo prolongado de embriões tem sido impulsionado, aliado a práticas de análise genética embrionária e seleção por meio de uso IA.

A biópsia de blastocistos, comparada à de embriões no Dia 3, tem mostrado ser mais segura, com impacto mínimo no desenvolvimento fetal (Scott et al., 2013). Além disso, a tecnologia TL tem permitido monitoramento contínuo do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, o que nos fornece uma ampla gama de informações aliada ao tempo prolongado de avaliações. Nesse aspecto, há a preocupação quanto ao impacto epigenético do cultivo estendido, mas os trabalhos mais recentes vêm diminuindo esse receio (Ji et al., 2018).

Estudos indicam que pacientes com 6 ou mais zigotos se beneficiam da transferência de blastocistos, mas mais estudos são necessários para esclarecer questões sobre a transferência em pacientes com baixa resposta (Dirican et al., 2022).

O sucesso da cultura prolongada de embriões depende de fatores como baixa tensão de oxigênio, pH ideal, temperatura e osmolalidade adequados. Assim, o cultivo de blastocistos impacta a logística do laboratório e exige incubadoras eficientes, além de monitoramento constante de parâmetros físico-químicos. Para isso, é necessário que o laboratório apresente infra-estrutura necessária e preparo de recursos logísticos e humanos. Além disso, a eficiência dessa prática hoje depende também de um programa eficiente de vitrificação.

A precisão na avaliação das divisões embrionárias é importante, mas laboratórios com poucos incubadoras devem priorizar a segurança das condições de cultura. A abertura frequente das incubadoras pode prejudicar o desenvolvimento, e, nesses casos, é melhor avaliar a morfologia ao final da cultura, com poucas verificações intermediárias.

CONCLUSÃO

Este consenso fornece recomendações atualizadas sobre critérios e terminologia para a avaliação do desenvolvimento de oócitos, zigotos, embriões em estágio de clivagem, mórulas e blastocistos, com base em uma revisão completa das evidências acumuladas na última década. Informações críticas obtidas da aplicação da Tecnologia de Tempo-lapse (TLT) forneceram o impulso para revisões nos prazos dos marcos do desenvolvimento. Entretanto, apesar do progresso da última década, várias

lacunas de conhecimento permanecem, especialmente sobre o impacto clínico de parâmetros morfológicos e morfocinéticos.

REFERÊNCIAS

- Alikani, M., Palermo, G., Adler, A., Bertoli, M., Blake, M., & Cohen, J. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, 3, 283-288.
- Armstrong S, Bhide P, Jordan V, Pacey A, Marjoribanks J, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction. *The Cochrane database of systematic reviews* 2019;5: Cd011320
- Ahlström A, Lundin K, Lind AK, Gunnarsson K, Westlander G, Park H, Thurin-Kjellberg A, Thorsteinsdottir SA, Einarsson S, Åström M *et al.* A double-blind randomized controlled trial investigating a time-lapse algorithm for selecting Day 5 blastocysts for transfer. *Human reproduction (Oxford, England)* 2022;37: 708-717
- The Alpha consensus meeting on cryopreservation key performance indicators and benchmarks: proceedings of an expert meeting. 1314 *Reproductive biomedicine online* 2012;25: 146-167.
- Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)* 1998;13: 3431-3433.
- Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive biomedicine online* 2006;12: 608-615.
- Balaban B, Ata B, Isiklar A, Yakin K, Urman B. Severe cytoplasmic abnormalities of the oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos. *Human reproduction (Oxford, England)* 2008;23: 1778-1785.
- Balaban B, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2011;26(6):1270-1283.
- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C. Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Human reproduction (Oxford, England)* 2004;19: 982-987.
- Bamford T, Barrie A, Montgomery S, Dhillon-Smith R, Campbell A, Easter C, Coomarasamy A. Morphological and morphokinetic associations with aneuploidy: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update* 2022;28: 656-686.
- Barrie A, McDowell G, Troup S. An investigation into the effect of potential confounding patient and treatment parameters on human embryo morphokinetics. *Fertility and sterility* 2021a;115: 1014-1022.
- Bartolacci, A., Intra, G., Coticchio, G., dell'Aquila, M., Patria, G., & Borini, A. (2022). Does morphological assessment predict oocyte developmental competence? A systematic review and proposed score. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39, 3-17.
- Bassil R, Casper RF, Meriano J, Smith R, Haas J, Mehta C, Orvieto R, Zilberberg E. Can Oocyte Diameter Predict Embryo Quality? *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)* 2021;28: 904-908.

Bickendorf K, Qi F, Peirce K, Natalwala J, Chapple V, Liu Y. Spontaneous collapse as a prognostic marker for human blastocysts: a systematic 1391 review and meta-analysis. *Human reproduction (Oxford, England)* 2023;38: 1891-1900.

Boucret L, Tramon L, Riou J, Ferré-L'Hôtelier V, Bouet PE, May-Panloup P. Influence of Diminished Ovarian Reserve on Early Embryo Morphokinetics during In Vitro Fertilization: A Time-Lapse Study. *Journal of clinical medicine* 2022;11.

Cameron NJ, Bhattacharya S, McLernon DJ. Cumulative live birth rates following blastocyst- versus cleavage-stage embryo transfer in the first 1416 complete cycle of IVF: a population-based retrospective cohort study. *Human reproduction (Oxford, England)* 2020;35: 2365-2374

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-1420 invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013;26: 477-485.

Campbell A, Cohen J, Ivani K, Morbeck D, Palmer G, Mortimer S. The in vitro fertilization laboratory: teamwork and teaming. *Fertility and sterility* 2022a;117: 27-32.

Capalbo A, Rienzi L, Cimadomo D, Maggiulli R, Elliott T, Wright G, Nagy ZP, Ubaldi FM. Correlation between standard blastocyst morphology, 1425 euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum Reprod* 2014;29: 1173-1181.

Cimadomo D, Marconetto A, Trio S, Chiappetta V, Innocenti F, Albricci L, Erlich I, Ben-Meir A, Har-Vardi I, Kantor B *et al.* Human blastocyst 1448 spontaneous collapse is associated with worse morphological quality and higher degeneration and aneuploidy rates: a comprehensive analysis 1449 standardized through artificial intelligence. *Human reproduction (Oxford, England)* 2022a;37: 2291-2306.

Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, Sayed S. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Human reproduction (Oxford, England)* 2014;29: 2650-2660.

Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. *Human reproduction (Oxford, England)* 2004;19: 2334-2339.

Coticchio G, Ezoe K, Lagalla C, Zacà C, Borini A, Kato K. The destinies of human embryos reaching blastocyst stage between Day 4 and Day 7 1465 diverge as early as fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)* 2023;38: 1690-1699.

Dal Canto M, Brambillasca F, Mignini Renzini M, Coticchio G, Merola M, Lain M, De Ponti E, Fadini R. Cumulus cell-oocyte complexes retrieved from antral follicles in IVM cycles: relationship between COCs morphology, gonadotropin priming and clinical outcome. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2012a;29: 513-519.

De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)* 1999;14: 1859-1863

De Vos A, Van Landuyt L, Santos-Ribeiro S, Camus M, Van de Velde H, Tournaye H, Verheyen G. Cumulative live birth rates after fresh and 1507 vitrified cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in the first treatment cycle. *Human reproduction (Oxford, England)* 2016;31: 1508-2442-2449.

- De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* (Oxford, England) 1996;11: 595-597.
- Dirican EK, Olgan S, Sakinci M, Caglar M. Blastocyst versus cleavage transfers: who benefits? *Archives of gynecology and obstetrics* 2022;305: 1527 749-756.
- Dietrich JE, Freis A, Beedgen F, von Horn K, Holschbach V, Liebscher J, Strowitzki T, Germeyer A. Intraindividual Embryo Morphokinetics Are Not Affected by a Switch of the Ovarian Stimulation Protocol Between GnRH Agonist vs. Antagonist Regimens in Consecutive Cycles. *Frontiers in endocrinology* 2020;11: 246.
- Du T, Wang Y, Fan Y, Zhang S, Yan Z, Yu W, Xi Q, Chen Q, Mol BW, Lyu Q *et al.* Fertility and neonatal outcomes of embryos achieving blastulation 1531 on Day 7: are they of clinical value? *Human reproduction* (Oxford, England) 2018;33: 1038-1051.
- Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* (Oxford, England) 2000;15: 427-430.
- Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and sterility* 2005;83: 1635-1640.
- Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommergruber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. *Reproductive biomedicine online* 2008b;16: 113-118.
- Esfandiari N, Burjaq H, Gotlieb L, Casper RF. Brown oocytes: implications for assisted reproductive technology. *Fertility and sterility* 2006;86: 1522-1525.
- Faramarzi A, Khalili MA, Ashourzadeh S. Oocyte morphology and embryo morphokinetics in an intra-cytoplasmic sperm injection programme. Is there a relationship? *Zygote* (Cambridge, England) 2017;25: 190-196.
- Faramarzi A, Khalili MA, Ashourzadeh S, Palmerini MG. Does rescue in vitro maturation of germinal vesicle stage oocytes impair embryo morphokinetics development? *Zygote* (Cambridge, England) 2018;26: 430-434.
- Faramarzi A, Khalili MA, Omidi M. Morphometric analysis of human oocytes using time lapse: does it predict embryo developmental outcomes? *Human fertility* (Cambridge, England) 2019;22: 171-176.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. In-vitro culture of human blastocysts. In *Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond 1999*. 1641 Eds. R Jansen and D Mortimer. 1999: 378-388
- Hattori H, Nakamura Y, Nakajo Y, Araki Y, Kyono K. Deliveries of babies with normal health derived from oocytes with smooth endoplasmic reticulum clusters. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2014;31: 1461-1467
- Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophectoderm grade predicts outcomes of 1667 single-blastocyst transfers. *Fertility and sterility* 2013;99: 1283-1289.e1281.
- Huang TTF, Kosasa T, Walker B, Arnett C, Huang CTF, Yin C, Harun Y, Ahn HJ, Ohta A. Deep learning neural network analysis of human blastocyst 1684 expansion from time-lapse image files. *Reprod Biomed Online* 2021;42: 1075-1085.

Ji M, Wang X, Wu W, Guan Y, Liu J, Wang J, Liu W, Shen C. ART manipulation after controlled ovarian stimulation may not increase the risk of 1710 abnormal expression and DNA methylation at some CpG sites of H19, IGF2 and SNRPN in foetuses: a pilot study. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E* 2018;16: 63.

Kemper JM, Liu Y, Afnan M, Hammond ER, Morbeck DE, Mol BW. Should we look for a low-grade threshold for blastocyst transfer? A scoping review. *Reproductive BioMedicine Online*. 2021 Apr 1;42(4):709-16.

Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction* (Oxford, England) 2000;15: 2390-2393.

Kieslinger DC, Vergouw CG, Ramos L, Arends B, Curfs M, Slappendel E, Kosteljik EH, Pieters M, Consten D, Verhoeven MO *et al.* Clinical outcomes of uninterrupted embryo culture with or without time-lapse-based embryo selection versus interrupted standard culture (SelecTIMO): a three-armed, multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet (London, England)* 2023;401: 1438-1446.

La Sala GB, Nicoli A, Villani MT, Di Girolamo R, Capodanno F, Blickstein I. The effect of selecting oocytes for insemination and transferring all resultant embryos without selection on outcomes of assisted reproduction. *Fertility and sterility* 2009;91: 96-100.

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

Ma BX, Yang L, Tian Y, Jin L, Huang B. Cytoplasmic strings between ICM and mTE are a positive predictor of clinical pregnancy and live birth 1792 outcomes: A time-lapse study. *Frontiers in medicine* 2022;9: 934327.

Margalit T, Ben-Haroush A, Garor R, Kotler N, Shefer D, Krasilnikov N, Tzabari M, Oron G, Shufaro Y, Sapir O. Morphokinetic characteristics of embryos derived from in-vitro-matured oocytes and their in-vivo-matured siblings after ovarian stimulation. *Reproductive biomedicine online* 2019;38: 7-11.

Massarotti C, Stigliani S, Ramone A, Bovis F, Sozzi F, Remorgida V, Cagnacci A, Anserini P, Scaruffi P. Occurrence of smooth endoplasmic reticulum aggregates in metaphase II oocytes: relationship with stimulation protocols and outcome of ICSI and IVF cycles. *Human reproduction* 1813 (Oxford, England) 2021;36: 907-917.

Mizobe Y, Kuwatsuru Y, Kuroki Y, Fukumoto Y, Tokudome M, Moewaki H, Tabira M, Iwakawa T, Takeuchi K. Smooth endoplasmic reticulum cluster presence does not affect embryo ploidy. *Archives of gynecology and obstetrics* 2023;307: 1607-1612.

Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Human reproduction* (Oxford, England) 2004;19: 1591-1597.

Rattanachaiyanont M, Leader A, Léveillé MC. Lack of correlation between oocyte-corona-cumulus complex morphology and nuclear maturity of oocytes collected in stimulated cycles for intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and sterility* 1999;71: 937-940

Regin M, Spits C, Sermon K. On the origins and fate of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos: an unsolved riddle. *Molecular human reproduction* 2022;28.

- Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E, Litwicka K, Greco E. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and sterility* 2008;90: 1692-1700.
- Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Human reproduction (Oxford, England)* 2002;17: 2388-2393.
- Sá R, Cunha M, Silva J, Luís A, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Barros A, Sousa M. Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications. *Fertility and sterility* 2011;96: 143-149.e147
- Setti AS, Braga D, Vingris L, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr. Early and late paternal contribution to cell division of embryos in a time-lapse imaging incubation system. *Andrologia* 2021;53: e14211.
- Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2011;159: 364-370.
- Setti AS, Braga D, Vingris L, Iaconelli A, Jr., Borges E, Jr. Early and late paternal contribution to cell division of embryos in a time-lapse imaging incubation system. *Andrologia* 2021;53: e14211.
- Sciorio R, Herrer Saura R, Thong KJ, Esbert Algam M, Pickering SJ, Meseguer M. Blastocyst collapse as an embryo marker of low implantation 1949 potential: a time-lapse multicentre study. *Zygote (Cambridge, England)* 2020: 1-9.
- Scott KL, Hong KH, Scott RT, Jr. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertility and sterility* 2013;100: 1951 608-614.
- Shani AK, Haham LM, Balakier H, Kuznyetsova I, Bashar S, Day EN, Librach CL. The developmental potential of mature oocytes derived from 1965 rescue in vitro maturation. *Fertility and sterility* 2023;120: 860-869.
- Shebl O, Haslinger C, Kresic S, Enengl S, Reiter E, Oppelt P, Ebner T. The hare and the tortoise: extreme mitotic rates and how these affect live 1969 birth. *Reproductive biomedicine online* 2021;42: 332-339.
- Shi W, Xu B, Wu LM, Jin RT, Luan HB, Luo LH, Zhu Q, Johansson L, Liu YS, Tong XH. Oocytes with a dark zona pellucida demonstrate lower fertilization, implantation and clinical pregnancy rates in IVF/ICSI cycles. *PloS one* 2014;9: e89409.
- Shu Y, Gebhardt J, Watt J, Lyon J, Dasig D, Behr B. Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and sterility* 2007;87: 1022-1027.
- Shaw-Jackson C, Thomas AL, Van Beirs N, Ameye L, Colin J, Bertrand E, Becker B, Rozenberg S, Autin C. Oocytes affected by smooth endoplasmic reticulum aggregates: to discard or not to discard? *Archives of gynecology and obstetrics* 2016;294: 175-184.
- Strassburger D, Goldstein A, Friedler S, Raziell A, Kasterstein E, Mashevich M, Schachter M, Ron-El R, Reish O. The cytogenetic constitution of embryos derived from immature (metaphase I) oocytes obtained after ovarian hyperstimulation. *Fertility and sterility* 2010;94: 971-978.
- Swain JE. Optimal human embryo culture. *Semin Reprod Med* 2015;33: 103-117.
- Tabibnejad N, Soleimani M, Aflatoonian A. Zona pellucida birefringence and meiotic spindle visualization are not related to the time-lapse detected embryo morphokinetics in women with

polycystic ovarian syndrome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 2018;230: 96-102.

Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reproductive biomedicine online* 2007;14: 40-48.

Tiegs AW, Sun L, Patounakis G, Scott RT. Worth the wait? Day 7 blastocysts have lower euploidy rates but similar sustained implantation rates 2027 as Day 5 and Day 6 blastocysts. *Human reproduction (Oxford, England)* 2019;34: 1632-1639.

Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJ, Klein BM, Helmgard L, Arce JC. Association between blastocyst morphology and 2041 outcome of single-blastocyst transfer. *Reproductive biomedicine online* 2013;27: 353-361.

Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, Kuliev A. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reproductive biomedicine online* 2003;7: 336-341

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Human reproduction (Oxford, England)* 1997;12: 1750-1755.

Wilding M, Di Matteo L, D'Andretti S, Montanaro N, Capobianco C, Dale B. An oocyte score for use in assisted reproduction. *Journal of assisted reproduction and genetics* 2007;24: 350-358.

Wale PL, Gardner DK. The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Human reproduction update* 2016;22: 2-22.

Yang Q, Zhu L, Wang M, Huang B, Li Z, Hu J, Xi Q, Liu J, Jin L. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time-lapse monitoring. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E* 2021;19: 183

Yang Z, Zhang J, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, Liu J. Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC medical genomics* 2014;7: 38.

Yi XF, Xi HL, Zhang SL, Yang J. Relationship between the positions of cytoplasmic granulation and the oocytes developmental potential in human. *Scientific reports* 2019;9: 7215.

Zhan Q, Sierra ET, Malmsten J, Ye Z, Rosenwaks Z, Zaninovic N. Blastocyst score, a blastocyst quality ranking tool, is a predictor of blastocyst 2120 ploidy and implantation potential. *F&S reports* 2020;1: 133-141.