

COMPARAÇÃO DA IDADE COM PARAMÊTROS MORFOCITOCINÉTICOS E QUALIDADE DE EMBRIÕES NO ESTÁGIO DE BLASTOCISTOS OBTIDOS EM SISTEMA DE MONITORAMENTO TIME-LAPSE

AGE COMPARISON WITH MORPHOCYTOKINETIC PARAMETERS AND EMBRYO QUALITY IN THE BLASTOCYST STAGE OBTAINED IN A TIME-LAPSE MONITORING SYSTEM

José Fernando de Macedo^{1*}, Maristela Rodrigues de Oliveira², Luiz Mauro Gomes², Gustavo Capinzaiki de Macedo¹, Giovanna Capinzaiki de Macedo¹, Daniela Oliveira Gomes¹, Bruna Oliveira Ambrogi¹, Camila Dutra de Souza Francisquini³, Sandra Irene Sprogis dos Santos⁴

¹Médico, Clínica Reproferty, São José dos Campos, SP

²Embriologista, Clínica Reproferty, São José dos Campos, SP

³Professora Doutora, Embriologista, Clínica Fert Embryo, Presidente Prudente, SP

⁴Doutora, Docente do Curso de Biomedicina, UniFUNVIC – Centro Universitário FUNVIC, Pindamonhangaba, SP

*Correspondência: prof.sandrasantos.pinda@unifunvic.edu.br

RECEBIMENTO: 07/09/20 - ACEITE: 29/10/20

Resumo

O objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros morfocinéticos mais adequados para a escolha do melhor embrião para transferência no processo de fertilização in vitro (FIV), de acordo com a idade de pacientes submetidas ao procedimento. Este é um estudo analítico retrospectivo longitudinal de pacientes submetidas a procedimento de FIV numa clínica de reprodução assistida. Para desencadear a ovulação foi realizada hiperestimulação com doses ajustadas de gonadotrofinas e o hCG. Após 36 horas, os oócitos foram aspirados, inseminados por injeção intracitoplasmática de espermatozoide cultivados na incubadora EmbryoScope (Unisense-Fertilitech, Dinamarca). As pacientes foram agrupadas por faixas etárias de interesse e os parâmetros morfocinéticos foram relacionados aos tempos observados em cada etapa da evolução do embrião até blastocisto, bem como sua qualidade. Pôde-se observar que tanto o número total de embriões em estágio de blastocisto quanto à qualidade do trofocotoderma foi menor em pacientes maiores de 40 anos. Os resultados observados indicam que embriões de mulheres mais jovens com até 35 anos de idade apresentam menor tempo para aparecimento do segundo corpúsculo e para o término da divisão em cinco células. Entretanto, no grupo de embriões provenientes de mulheres com idade superior a 40 anos, observou-se que o tempo para aparecimento do pró-núcleo e a duração do segundo ciclo foram maiores. Os resultados sugerem que embriões de pacientes cuja evolução de oócitos fertilizados para blastocisto ocorreu em menor tempo, apresentaram melhor qualidade embrionária. Portanto a aplicação da tecnologia *time-lapse* para seleção de embriões de melhor qualidade com base no perfil morfocinético mostrou-se útil.

Palavras-chave: Blastocisto. Sistema de Monitoramento Time-Lapse. Qualidade de blastocistos.

Abstract

The aim of the study was to evaluate the most appropriate morphokinetic parameters for choosing the best embryo for transfer in the in vitro fertilization (IVF) process, according to the age of patients undergoing the procedure. This is a longitudinal retrospective analytical study of patients undergoing an IVF procedure in an assisted reproduction clinic. Hyperstimulation to trigger ovulation was performed with adjusted doses of gonadotropins and hCG. After 36 hours, the oocytes were aspirated, inseminated by intracytoplasmic sperm injection and cultured in the EmbryoScope incubator (Unisense-Fertilitech, Denmark). The patients were grouped by age groups of interest and the morphokinetic parameters were related to the times observed in each stage of the evolution of the embryo to the blastocyst, as well as its quality. It can be seen that both the total number of embryos in the blastocyst stage and the quality of the trophoctoderm was lower in patients older than 40 years. The observed results indicate that embryos of younger women up to 35 years of age have less time for the appearance of the second corpuscle and for the end of the division in five cells. However, in the group of embryos from women over 40 years of age, it was observed that the time for the appearance of the pro-nucleus and the duration of the second cycle were longer. The results suggest that embryos of patients whose evolution from fertilized oocytes to blastocyst occurred in a shorter time, had better embryonic quality. Therefore, the application of time-lapse technology for selection of better quality embryos based on the morphocytokinetic profile proved to be useful.

Keywords: Blastocyst. Time-Lapse Monitoring System. Quality of blastocysts.

Introdução

A opção de retardar uma gravidez, por diferentes motivos não médicos, tais como: o aumento da inserção da mulher no mercado de trabalho e a busca de obtenção de graus educacionais mais avançados é uma realidade cada dia mais presente em todo o mundo. Atualmente um número expressivo de mulheres adiam a maternidade para idades superiores a 35 anos. Deste modo, muitas estratégias foram propostas nas últimas décadas para controlar a ocorrência de infertilidade em mulheres que optam por uma gravidez tardia.¹⁻⁴

Ressalta-se que a fertilidade feminina diminui a partir dos 32 anos e por esse motivo, uma gravidez tardia é definida tradicionalmente como aquela que ocorre em mulheres com mais de 35 anos de idade.^{5,6} Llarenna e Hine⁶ afirmam que a fecundidade diminui principalmente devido à atresia de oócitos, os quais, ficam comprometidos antes do início da peri-menopausa com as irregularidades menstruais, sendo a idade um importante parâmetro para avaliação da qualidade do oócito.

Mulheres em idade reprodutiva frequentemente desconhecem e subestimam os efeitos do envelhecimento reprodutivo, e/ou superestimam as taxas de sucesso da fertilização in vitro (FIV) como meio para suprir a infertilidade, especialmente as mulheres mais velhas. Neste sentido, observa-se que nas últimas décadas houve um aumento nos métodos eficazes disponíveis que permitem a mulher tomar decisões e ver aumentada sua autonomia reprodutiva.²

Por outro lado, as técnicas empregadas na reprodução assistida buscam aumentar os percentuais de sucesso com protocolos que optam por realizar transferência de múltiplos embriões por ciclo. No entanto, tais procedimentos podem levar a um aumento de gestação múltipla, que por sua vez, implica em complicações tanto da saúde materna como do neonato.⁷⁻⁹

A seleção do embrião nos ciclos de reprodução assistida tem sido o foco dos esforços na prática do laboratório. Pesquisas bem documentadas mostram que existe correlação entre o estágio de desenvolvimento do embrião em determinadas fases e suas competências, com suas características morfológicas.¹⁰

Portanto, a busca por selecionar o melhor modo de identificar embriões de alta capacidade de implantação, visando reduzir o número de embriões na transferência, sem reduzir as chances de gravidez, tem sido o escopo de muitas pesquisas.⁷⁻⁹

Corroborando com esses objetivos, o sistema de monitoramento *Time-Lapse* (MTL) com o emprego do EmbryoScope (Vitrolife A/S,

Denmark®) tem sido adotado como uma das técnicas auxiliares de caráter não invasivo para avaliação e reconhecimento de embriões de bons prognósticos. Com esse procedimento é possível avaliar os parâmetros morfofocinéticos, selecionando-se embriões com maior potencial de implantação e minimizar assim o manuseio humano.¹¹⁻¹³

Verifica-se que com essa técnica, não só é possível introduzir marcadores dinâmicos de competência embrionária como também possibilitar o monitoramento por 24 horas, durante o desenvolvimento do embrião. Desse modo, obtém-se um aumento tanto da quantidade como da qualidade de informação, sem desequilibrar as condições do meio de cultura, visto que os embriões permanecem em ambiente estável e controlado.¹⁴⁻¹⁶

O objetivo principal dessa pesquisa foi de comparar a idade das pacientes com os parâmetros morfofocinéticos que direcionem a escolha do melhor embrião para transferência durante o processo de fertilização in vitro.

Os objetivos específicos foram: traçar o perfil do desenvolvimento embrionário durante 24 horas, separados em grupos de acordo com a faixa etária da paciente; comparar os resultados obtidos entre os grupos estudados, analisando-se como esses fatores interferem na qualidade final desses embriões de acordo com a classificação de Gardner e Lane¹⁷ e classificar os blastocistos em excelentes, bons, médios ou ruins visando apontar o melhor perfil de embrião para transferência empregada na FIV.

Método

O presente trabalho é um estudo analítico, longitudinal, retrospectivo envolvendo pacientes que foram submetidas a procedimento de FIV no programa de Reprodução Assistida de uma clínica da Região Metropolitana do Vale do Paraíba/SP, no período de setembro de 2018 a janeiro de 2019, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do UniFUNVIC sob o parecer 4.124.529.

Foram avaliados todos os casos de pacientes que consentiram participar conforme a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012 (CNS-MS) e onde foi observada a evolução de embriões até blastocisto. Pacientes cujos embriões não foram submetidos ao sistema de monitoramento do Time-Elapse.

Protocolo de estimulação

Todas as mulheres participantes do estudo foram tratadas com hormônio antogonista do

liberador de gonadotrofinas (GnRH) e a hiperestimulação ovariana foi considerada a partir da administração de gonadotrofinas com doses ajustadas de acordo com a resposta clínica. A gonadotrofina coriônica humana (hCG) foi administrada para disparo da ovulação quando os folículos alcançaram valores maiores que 18 mm de diâmetro.

Cultura Embrionária

A retirada dos oócitos foi realizada 36 horas após a administração do hCG e os mesmos foram inseminados por injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e colocados em meio de cultura.

Os embriões foram cultivados em um incubador EmbryoScope (Vitrolife A/S, Denmark®).

As pacientes do estudo foram agrupadas segundo a idade no momento da punção dos folículos (grupo I, 27 mulheres com idades de 24 a 35 anos; grupo II, 27 mulheres de 35 à menos de 40 anos e grupo III, 25 mulheres maiores de 40 anos).

Parâmetros morfocinéticos

O sistema de monitoramento de embriões com *time-lapse* (MTL) é empregado para captura de imagens sequenciais do embrião em desenvolvimento. Assim é possível analisar o processo de desenvolvimento embrionário, com obtenção de imagens a cada 5 a 20 minutos.

No presente trabalho os embriões submetidos a análise por *time-lapse* e cultivados no embrioscópio foram avaliados, segundo intervalos de tempos específicos conforme os parâmetros estabelecidos por Meseguer et al.¹⁸ e definidos a

partir do tempo em que foi realizado a ICSI.

Assim, foram observados: aparecimento do segundo corpúsculo polar (CPap); aparecimento dos prónucleos (PNap); desaparecimento dos pronucleos (PNbd); término da divisão para duas células (T2); término da divisão para três células (T3); término da divisão para quatro células (T4); término da divisão para cinco células (T5); duração do segundo ciclo celular (Cc2/ T3-T2); tempo entre a divisão de três células e cinco células (Cc3/ T5-T3); sincronia da divisão de três para quatro células (S2/ T4-T3); momento em que o blastocisto iniciou a expansão (TB).

A qualidade de blastocistos foi classificada, segundo preconizado pelo Sistema de Avaliação Morfológica de Gardner e Lane,¹⁷ quanto ao grau de coesão do trofotoderma.

Coleta de dados

Os dados das pacientes foram coletados a partir do software GS-Doctor (Golden Skill-it solution) e repassados em planilhas codificadas pelo pesquisador responsável para os demais membros da equipe, garantindo a confidencialidade das pacientes em estudo. No embrioscópio foram obtidos os dados morfocinéticos dos blastocistos.

Avaliação estatística

Os dados foram tabulados pela média e desvio padrão. Os resultados foram analisados usando o teste Anova para comparação dos grupos estudados (teste de análise de variância). Para a comparação das médias foi empregado o teste de Tukey usando o software 5 AS Program-South Western Sydney PHN. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados

Tabela 1- Número e porcentagem de blastocistos, com classificação do trofotoderma A (Excelente), B (Bom) e C (Pobre), de acordo com os grupos de idade da paciente

Idade da paciente	Blastocistos						Total
	Classificação do trofotoderma						
	A		B		C		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
<35 anos	41	33,3	46	37,4	36	29,3	123
≥35 a <40 anos	54	43,9	42	34,1	27	22,0	123
≥40 anos	21	29,2	27	37,5	24	33,3	72

Com base na tabela 1, pode-se observar que o número total de embriões em estágio de blastocisto nos grupos um e dois foi maior, representando 123 embriões, cada um, quando comparado ao grupo três que apresentou um total de 72 blastocistos, demonstrando a diminuição evidente de embriões nas pacientes com idade superior a 40 anos, uma vez que a idade está diretamente relacionada a qualidade oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário.

Quanto à classificação do trofocotoderma, ressalta-se que o número de blastocistos classificados como excelentes foi maior no grupo dois, representando 43,9% do total, enquanto o

grupo três apresentou o menor percentual de blastocistos com trofocotoderma A (29,2%). Nesse contexto, verificou-se que as mulheres mais jovens não tiveram os resultados melhores como era o esperado. Esse fato pode estar atrelado a diversidade de causas da infertilidade desses casos. Para os blastocistos com trofoectoderme B, os percentuais obtidos mostraram equilíbrio entre os grupos com 37,5%, 34,1% e 37,5%, respectivamente. Já para os blastocistos com trofoectoderme classificado em C, o grupo três representados por pacientes com idade acima de 40 anos, apresentou a maior taxa, com cerca de 33,3%.

Tabela 2- Variáveis morfofocitocinéticas (média ± desvio padrão) obtidos do sistema de monitoramento *time-lapse* do cultivo de blastocistos, segundo grupos de idade da paciente

Parâmetros morfofocitocinéticos	Grupos de idade da paciente		
	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Em horas (h)	<35 anos	≥35 a <40 anos	≥40 anos
CPap	3,08±1,30 *	3,54±1,57	3,44±1,43
PNap	8,68±1,75	8,99±2,37	9,44±2,27*
PNbd	22,96±2,80	23,71±3,82	23,78±3,24
T2	25,48±3,01	25,94±4,26	26,17±3,19
T3	35,78±4,09*	36,96±5,29	36,94±4,64
Cc2	10,29±3,26	11,01±3,32	11,67±2,95*
T4	38,43±4,92	38,96±5,69	39,25±5,88
S2	2,00±3,29	2,40±4,18	2,65±3,88
T5	47,72±5,65*	49,57±7,76	49,12±7,94
Cc3	11,93±3,95	12,61±3,74	12,27±5,40
TB	106,71±9,90	106,17±9,39	106,89±8,80

Aparecimento do segundo corpúsculo polar (CPap); aparecimento dos pronúcleos (PNap); desaparecimento dos pronúcleos (PNbd); término da divisão para duas células (T2); término da divisão para três células (T3); duração do segundo ciclo celular (Cc2/ T3-T2); término da divisão para quatro células (T4); sincronia da divisão de três para quatro células (S2/ T4-T3); término da divisão para cinco células (T5); tempo entre a divisão de três células e cinco células (Cc3/ T5-T3); momento em que o blastocisto iniciou a expansão (TB)

* p<0,05

O aparecimento do segundo corpúsculo polar (CPap), com base nos resultados obtidos, ocorreu mais cedo no grupo um, das pacientes com menos de 35 anos sendo estatisticamente significativo (3,08h p<0,05). Já o aparecimento dos dois pronúcleos (PNap), teve um resultado

significativo para os blastocistos das pacientes com mais de 40 anos, ocorrendo mais tardiamente (9,44h p<0,05) quando comparado aos blastocistos das pacientes com menos de 35 anos, que apresentaram o menor tempo para o aparecimento dos pronúcleos com cerca de 8,68 h.

Para os parâmetros morfofocitocinéticos PNbd e T2, não houve diferença estatística significativa entre os grupos. O término da divisão para três células (T3), ocorreu primeiramente nos blastocistos do grupo um (35,78h $p < 0.05$). O cálculo da duração do segundo ciclo de células (Cc2) mostrou que houve maior tempo para sua realização no grupo três (11,67h $p < 0.05$), quando comparados aos demais grupos que apresentaram menor tempo para desempenhar esse ciclo.

Com relação ao término da divisão para quatro células (T4) e sincronia da divisão de três para quatro células (S2), não foi encontrada diferença estatística significativa entre os blastocistos dos grupos estudados. Houve menor tempo para o término da divisão para cinco células (T5) no grupo de pacientes com menos de 35 anos, (47,72h $p < 0.05$). Sobre o tempo entre T5 e T3 (Cc3) e início da blastulação (TB), também não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

O que foi possível observar com relação aos resultados é que apesar de quantitativamente, o grupo dois, de pacientes com idade entre 35 e 40 anos, apresentar maior porcentagem de blastocistos com trofoectoderme A e menor porcentagem de blastocistos com trofoectoderme C, ao se analisar os parâmetros morfofocitocinéticos dos blastocistos (Tabela 2), pode-se verificar que esses critérios foram significativos entre as pacientes no grupo um, cujas idades eram menores de 35 anos.

Discussão

O sistema de monitoramento de embriões com *time-lapse* é a mais recente tecnologia para avaliação e seleção de embriões com alta capacidade de implantação. Essa técnica permite coletar mais informações sobre o desenvolvimento *in vitro* dos embriões através do monitoramento por 24 horas no embrioscópio. Além disso, os embriões não são removidos do ambiente de cultura, sendo assim, as condições não invasivas durante a cultura são úteis para escolha do embrião mais apropriado.^{19,20}

No presente estudo as características morfológicas do trofoectoderma (TE) foram empregadas para classificar o blastocisto como excelente, bom ou pobre uma vez que o papel do TE é bem estabelecido, sendo de grande importância na formação do epiblasto e endoderma primitivo, os quais são fundamentais para permitir a implantação e o desenvolvimento de uma gravidez a termo. Os critérios adotados para qualificar o trofoectoderma demonstram ser superiores quando comparados aos parâmetros atribuídos a massa celular interna (*Inner Cell Mass* - ICM) para se prever o desfecho neonatal desejado.²¹⁻²³

De acordo com a literatura, mulheres mais velhas tem uma menor produção de embriões como também apresentam blastocistos classificados como de pobre qualidade,²⁴⁻²⁶ dados esses em acordo com aqueles apresentados na tabela um.

Em relação aos dados descritos na tabela 2, Meseguer et al.¹⁸ definiram um modelo de previsão hierárquico combinando avaliação estatística com acesso aos parâmetros dinâmicos e os parâmetros mais preditivos daquele trabalho, segundo os autores, foram os tempos de ocorrência de T5, S2 e Cc2. Esses mesmos parâmetros foram também definidos e empregados no presente estudo, verificando-se, portanto, concordância dos resultados para os tempos T5 e Cc2. Já a sincronia de divisão de três para quatro células (S2) não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos pesquisados.

Coticchio et al.²⁷ utilizando o MTL observaram que os pronúcleos (PN) masculinos e femininos apareceram simultaneamente 6,2 horas após o ICSI. Os mesmos autores também notaram que o PN feminino sempre se forma próximo ao local de emissão do segundo corpúsculo polar (CP), porém, a posição inicial do CP masculino pode ser cortical, intermediária ou central nas seguintes proporções respectivamente: 15%, 31,2% e 53,8%. Revelaram ainda que a justaposição dos PN envolve movimentos rápidos do PN feminino em direção ao PN masculino. Sendo assim, os tempos de quebra dos PN e a primeira clivagem mostraram uma relação consistente, ocorrendo progressivamente mais tardiamente, dependendo se o posicionamento do PN masculino inicial era central, intermediário ou cortical. Desta forma os intervalos de tempo entre eventos de fertilização foram fortemente associados a qualidade do embrião no dia três.

Lee et al.²⁸ reforçam em consonância com outros autores^{29,30} que a clivagem precoce na primeira divisão embrionária resultando em duas células, cerca de 25 a 27 horas pós ICSI é um dado relevante, visto que há vários relatos descrevendo que a transferência de embriões com clivagem precoce apresenta altas taxas de implantação e alguns casos ainda afirmam que ocorrem maiores taxas na formação de blastocistos em embriões clivados precocemente.

Já os dados descritos por Chen et al.³¹ evidenciam que blastocistos de melhor qualidade se desenvolveram com tempos significativamente menores para divisões celulares de segunda geração, ou seja, do estágio de três para quatro células. Além disso, afirmam ainda que o tempo de ICSI para o estágio de cinco células e do ICSI para o estágio de mórula foram indicativos de uma boa qualidade de blastocisto.

No trabalho de Ciray et al.³² os pesquisadores afirmam que o tempo que o embrião passa de três para cinco células foi confirmado como parâmetro chave, associando-o a maiores taxas de implantação em comparação a outros critérios avaliados.

Dal Canto et al.³³ e Hashimoto et al.³⁴ destacaram a terceira geração de divisão celular, ou seja, os estágios de quatro a oito ou de cinco a oito células como indicativos de blastocistos expandidos. Na presente pesquisa, não foi escopo avaliar o tempo de divisão para oito células, mas em relação ao início da blastulação (TB).

Além dos estudos em foco na definição de parâmetros para selecionar os melhores embriões, outras pesquisas têm descrito novos critérios para serem analisados como a influência do oxigênio na estabilidade do embrioscópio, corroborando nas clivagens precoces e na obtenção de maiores taxas de gravidez a termo no desenvolvimento de embriões com o uso de time lapse.³⁵

Tejera et al.³⁶ utilizaram o MTL para medir o oxigênio e assim investigar a possível relação da morfocinética do embrião e a sua atividade metabólica. Demonstraram que o consumo de oxigênio foi superior na primeira divisão de embriões os quais tiveram melhores taxas de implantação, concluindo que embriões que consumiram mais oxigênio tiveram melhor desenvolvimento e, conseqüentemente melhor competência na implantação.

Outros critérios morfocinéticos em relação ao desenvolvimento do blastocisto, taxas de implantação e de nascidos vivos¹⁹ foram realizadas em populações heterogêneas em condições de cultura não padronizadas, aumentando assim o leque de possibilidades para se estabelecer novos parâmetros para o melhor aproveitamento do MTL.

Conclusões

A idade da paciente mantém relação com a produção de blastocistos com maior potencial de implantação, tema já bem discutido na literatura. Mais idade implica em menor produção de embriões assim como de pobre qualidade. Parâmetros morfocinéticos como o aparecimento do segundo corpúsculo polar, aparecimento dos pronúcleos, término da divisão para três células, duração do segundo ciclo celular, término da divisão para cinco células confirmaram serem úteis para direcionar a escolha dos melhores embriões.

Estudos mais abrangentes e bem desenhados ainda precisam ser realizados com o intuito de avaliar a eficácia do uso clínico do *time-lapse*, pois se trata de nova tecnologia clínica e é provável que novas variáveis sejam introduzidas para um melhor

aproveitamento da técnica. Essas pesquisas serão também importantes para avaliar a influência da melhoria das condições de cultura no desfecho clínico dos casos estudados. Espera-se também que a seleção de melhores embriões por meio desta técnica, futuramente minimize o problema causado por excesso de embriões congelados, que é uma realidade vivenciada nas clínicas de reprodução assistida.

Referências

1. Trigo IG, Eller JX, Vaz MR, Calil C, Silva LR, Barboza BP. Idade materna avançada e seus desfechos. RFMT. 2019;2(3):146-51.
2. Fritz R, Jindal S. Reproductive aging and elective fertility preservation. J Ovarian Res. 2018;11(66)1-8. DOI: 10.1186/s13048-018-0438-4
3. Mostajeran F, Tehrani H, Ghoreishi E. Effects of dehydroepiandrosterone on in vitro fertilization among women aging over 35 years and normal ovarian reserve. J Family Reprod Health. 2018;12(3):129-33.
4. Moura BVCS, Penna LFV, Lopes MHC, Soares W, Souza JHK. Métodos de preservação de fertilidade: revisão de literatura. Braz. J. Surg. Clin. Res. 2016;13(3):56-64. DOI: 10.1590/S0100-72032006000600008
5. Deatsman S, Vasilopoulos T, Rhoton-Vlasak A. Age and fertility: a study on patient awareness. JBRA Assisted Reproduction. 2016;20(3):99-106. DOI: 10.5935/1518-0557.20160024
6. Llarena N, Hine C. Reproductive Longevity and Aging: Geroscience Approaches to Maintain Long-Term Ovarian Fitness [published online ahead of print, 2020 Aug 18]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2020;glaa204. DOI:10.1093/gerona/glaa204.
7. Alasmari NM, Son WY, Dahan MH. The effect on pregnancy and multiples of transferring 1-3 embryos in women at least 40 years old. J Assist Reprod Genet. 2016;33:1195-202.
8. DOI: 10.1007/s10815-016-0749-6
9. Klitzman R. Deciding how many embryos to transfer: ongoing challenges and dilemmas. Reprod Biomed Soc Online. 2016;3:1-15. DOI:10.1016/j.rbms.2016.07.001
10. Wintner EM, Hershko-Klement A, Tzadikvitch K, Ghetler Y, Gonen O, Wintner O, et al. Does the transfer of a poor quality embryo together with a good quality embryo affect the In Vitro Fertilization (IVF) outcome? J Ovarian Res. 2017;10:2. DOI: 10.1186/s13048-016-0297-9

11. ESHRE/ALPHA. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod.* 2011;26(6):1270-83. DOI: 10.1093/humrep/der037
12. Bodri D, Sugimoto T, Yao Serna J, Kawachiya S, Kato R, Matsumoto T. Blastocyst collapse is not an independent predictor of reduced live birth: a time-lapse study. *Fertil Steril.* 2016;105(6):1476-83. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.02.014
13. Marcos J, Pérez-Albalá S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: a time-lapse study. *Hum Reprod.* 2015;30(11):2501-8. DOI: 10.1093/humrep/dev216
14. Peavey M, Kaskar K, Zarutskie P, Gibbons WE. Limited clinical implementation of embryoscope during first year use at an academic institution. *Fertil Steril.* 2015;104(3):e314. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.983. <https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2815%2901485-5>
15. Drejza MA, Kort JD, Behr B. Do embryo time-lapse parameters predict euploid embryo transfer outcomes? *Fertil Steril.* 2017;108(3):e157-e158. <https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2817%2930997-4>
16. Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2013;28(10):2643-51. DOI:10.1093/humrep/det300
17. Tejera A, Herrero J, Rubio I, Castelló D, Pellicer A, Meseguer M, et al. Session 57: time lapse: the real revolution for embryo assessment? *Hum Reprod.* 2013;28(1):i87-90. DOI:10.1093/humrep/det190
18. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1999;72(4):604-9. DOI: 10.1016/s0015-0282(99)00311-8
19. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26(10):2658-71. DOI: 10.1093/humrep/der256
20. Kovacs P. Time-lapse embryology: Do we have an efficacious algorithm for embryo selection? *JRBF.* 2016;5:1-12. DOI: 10.1177/2058915816684252
21. Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril.* 2015 Feb;103(2):323-32. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.003>
22. Ebner T, Tritscher K, Mayer RB, Oppelt P, Duba HC, Maurer M, et al. Quantitative and qualitative trophectoderm grading allows for prediction of live birth and gender. *J Assist Reprod Genet.* 2016;33(1):49-57. DOI: 10.1007/s10815-015-0609-9
23. Piliszek A, Grabarek JB, Frankenberg SR, Plusa B. *Mol Hum Reprod.* Cell fate in animal and human blastocysts and the determination of viability. 2016;22(10):681-90. DOI: 10.1093/molehr/gaw002
24. Zhao YY, Yu Y, Zhang XW. Overall Blastocyst Quality, Trophectoderm Grade, and Inner Cell Mass Grade Predict Pregnancy Outcome in Euploid Blastocyst Transfer. *Cycles. Chin Med J.* 2018;131(11):1261-7. DOI: 10.4103/0366-6999.232808
25. Basir G, Nikolaou D. Age, rather than response to stimulation, determines the percentage of good versus poor quality embryos in IVF. *Fertil Steril.* 2008;90(suppl):S239. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.583. <https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2808%2902280-2>
26. Patanayak MC. Correlation between embryo quality, age & IVF/ICSI outcome. *Fertil Steril.* 2008;90(suppl):S430. DOI:10.1016/j.fertnstert.2008.07.1268. <https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2808%2902958-0>
27. Stone BA, Vargyas JM, Ringler GE, Marrs RP. Age dependency of the relationship between implantation rate (IR) and the number of embryos transferred (#ET) following controlled ovarian hyper-stimulation (COH) and in-vitro fertilization (IVF). *Fertil Steril.* 2008;90(suppl):S239. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.585
28. <https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2808%2902282-6>
29. Coticchio G, Renzini MM, Novara PV, Lain M, De Ponti E, Turchi D, et al. Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Hum Reprod.* 2018;33(1):23-31. DOI: 10.1093/humrep/dex344
30. Lee MJ, Lee RKK, Lin MH, Hwu YM. Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29:745-50. DOI: 10.1007/s10815-012-9777-z
31. Fu J, Wang XJ, Wang YW, Sun J, Danielsson KG, Sun XX. The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *J*

Assist Reprod Genet. 2009;26:437-41.
DOI: 10.1007/s10815-009-9342-6

32. Pfeffer J, Taar J, Zerah S, Labourier P, Kutner J, Raveneau P. Early Cleavage Embryo a Good Quality Indicator at Embryo Transfert? *Fertil Steril*. 2005;84(suppl1):S294. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2005.07.766.
<https://www.fertstert.org/action/showPdf?pii=S0015-0282%2805%2902225-9>
33. Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1035-43. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2013.01.143
34. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguila J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse. *Hum Reprod*. 2014;29(12):2650-60. DOI: 10.1093/humrep/deu278.
35. Dal Canto M, Coticchio G, Renzini MM, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(5):474-80. DOI: 10.1016/j.rbmo.2012.07.016.
36. Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril*. 2012;97(2):332-7. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.11.042.
37. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril*. 2013;99:738-44. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2012.11.028.
38. Tejera A, Castelló D, de Los Santos JM, Pellicer A, Remohí J, Meseguer M. Combination of metabolism measurement and a time-lapse system provides an embryo selection method based on oxygen uptake and chronology of cytokinesis timing. *Fertil Steril*. 2016 Jul;106(1):119-126.e2. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2016.03.019.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0015028216300528>