



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102012031953-5 A2

(22) Data do Depósito: 14/12/2012

(43) Data da Publicação: 08/03/2016
(RPI 2357)



(54) Título: MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES

(51) Int. Cl.: C12N 5/073

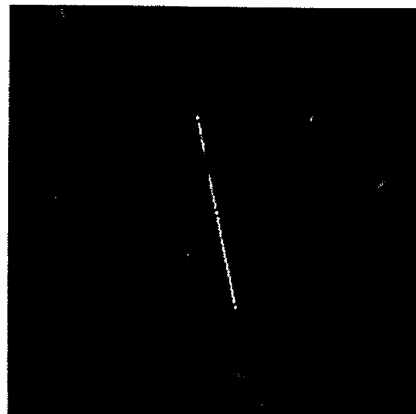
(52) CPC:

(73) Titular(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

(72) Inventor(es): FELIPE DELESTRO MATOS, MARCELO FABIO GOUVEIA NOGUEIRA, JOSÉ CELSO ROCHA

(74) Procurador(es): LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI

(57) Resumo: MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES. E descrita a invenção de um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que permite uma avaliação rápida e com mínima interferência no desenvolvimento embrionário, utilizando um sistema de microscopia associado à captura digital de imagens, provendo um conjunto de valores para cada embrião que representa o quanto Q embrião está apto a ser considerado em cada um dos quatro graus possíveis, utilizando a técnica de Redes Neurais Artificiais, provendo objetividade e reprodutibilidade.



MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção descreve um método para determinação da
5 viabilidade e qualidade de embriões. Mais especificamente
compreende um método que permite determinar a qualidade de
embriões a partir da análise morfológica de uma figura bidimensional,
utilizando a técnica de redes neurais artificiais (RNA), provendo um
índice de qualidade objetivo e reprodutível.

10 ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Desde o desenvolvimento das primeiras técnicas bem sucedidas
de fertilização artificial e transferência embrionária em embriões de
mamíferos, tornou-se visível uma relação direta da qualidade
embrionária com a taxa de sucesso das transferências destes
15 embriões em fêmeas receptoras, sendo que embriões
morfolologicamente classificados como de qualidade alta possuem uma
maior taxa de sucesso (H.R. Tervit, M.W. Cooper, Pamela G. Goold,
G.M. Haszard, Non-surgical embryo transfer in cattle, *Theriogenology*,
Volume 13, Issue 1, January 1980, Pages 63-71, ISSN 0093-691X,
20 10.1016/0093-691X(80)90015-1) e (H.J. Schneider Jr., R.S.
Castleberry, J.L. Griffin, Commercial aspects of bovine embryo
transfer, *Theriogenology*, Volume 13, Issue 1, January 1980, Pages
73-85, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(80)90016-3).

A classificação morfológica embrionária possui grande
25 importância para inúmeras técnicas laboratoriais, de pesquisa básica
a aplicadas na reprodução assistida. É a partir dela que podem ser
inferidas taxas de sucesso (gestação), de utilização de biotécnicas
associadas (criopreservação, biópsia, bipartição, microinjeção etc.) ou

mesmo de padronização dos embriões utilizados em experimentos científicos.

Para tanto, foram desenvolvidos métodos de padronização dos elementos que categorizam os embriões em diferentes graus de acordo com sua qualidade (e, portanto, também segundo sua viabilidade), sendo atualmente amplamente utilizado o sistema de quatro graus: Excelente (Excellent), Bom (Good), Regular (Fair) e Ruim ou Pobre (Poor) (Gary M. Lindner, Raymond W. Wright Jr., Bovineembryomorphologyandevaluation, *Theriogenology*, Volume 20, Issue4, October 1983, Pages 407-416, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(83)90201-7) e (R.W. Wright Jr., J. Ellington, Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro- produced pre implantatio nembryos from live stock species, *Theriogenology*, Volume 44, Issue 8, December 1995, Pages 1167-1189, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(95)00327-5). Esse sistema se baseia na análise qualitativa morfológica visual do embrião, comumente feita por meio de microscopia óptica (estereomicroscópio). A técnica depende da experiência e acurácia do embriologista em analisar e categorizar desde os evidentes fatores até as nuances que tornam um embrião mais ou menos apto ao desenvolvimento. Nessa análise morfológica clássica, tais fatores não são objetivamente mensurados, de forma que se torna subjetiva e de baixa repetibilidade (BalázsBényei, IstvánKomlósi, Anna Pécsi, GeoffryPollott, Cruvinel Heraldo Marcos, Alexandre de Oliveira Campos, Maida Paula Lemes, The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment, *Animal Reproduction Science*, Volume 93, Issues 3–4, July 2006, Pages 268-279, ISSN 0378-4320, 10.1016/j.anireprosci.2005.07.012).

Disso resulta que um mesmo embrião mensurado por diferentes especialistas pode obter diferentes graus de classificação. Tal discordância ocorre principalmente entre graus próximos, como entre embriões bons e excelentes (P.W. Farin, J.H. Britt, D.W. Shaw, B.D. Slenning, Agreement among evaluators of bovine embryos produced in vivo or in vitro, *Theriogenology*, Volume 44, Issue3, August 1995, Pages 339-349, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(95)00189-F).

Buscando soluções para a questão da subjetividade da análise morfológica, diversos métodos alternativos foram desenvolvidos.

- 10 Dentre eles podem ser destacados o cultivo in vitro de embriões, integridade da membrana blastomérica, análise do metabolismo embrionário (Eric W. Overström, In vitro assessment of embryo viability, *Theriogenology*, Volume 45, Issue 1, 1 January 1996, Pages 3-16, ISSN 0093-691X, 10.1016/0093-691X(96)84625-5.),
- 15 mensuração da respiração celular (HiroyoshiHoshi, In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer, *Theriogenology*, Volume 59, Issue 2, 15 January 2003, Pages 675-685, ISSN 0093-691X, 10.1016/S0093-691X(02)01247-5), análise com microscopia eletrônica (López-Damián E. P, Galina C. S., Merchant H., Cedillo-Peláez C., Aspron M., Assessment of Bostaurus embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy. *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 2 (3), pp. 072–078, March 2008, ISSN 1996-0867© 2008 AcademicJournals) e
- 20 uso de índices de birrefringência da zona pelúcida (Held, Eva, Mertens, Eva-Maria, Mohammadi-Sangcheshmeh, Abdollah, Salilew-Wondim, Dessie, Besenfelder, Urban, Havlicek, Vitezslav, Herrler, Andreas, Tesfaye, Dawit, Schellander, Karl, and Hölker, Michael (2011). Zonapellucida birefringence correlates with developmental capacity of

bovine oocytes classified by maturational environment, COC morphology and G6PDH activity. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 568–579).

Entretanto, nenhum método até o momento apresentou uma solução definitiva para a mensuração de qualidade e viabilidade, sendo ainda necessário o desenvolvimento de métodos que sejam rápidos, não invasivos e objetivos.

Outro fator a ser analisado é o alto custo de alguns métodos, o que impede sua ampla utilização. Assim, apesar da subjetividade e baixa repetibilidade, a análise morfológica visual continua sendo amplamente utilizada para a determinação da qualidade embrionária.

Portanto, a presente invenção descreve um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que permite uma avaliação rápida e com mínima interferência no desenvolvimento embrionário, pois é necessário um sistema de microscopia associado à captura digital de imagens, provendo um conjunto de valores para cada embrião que representa o quanto o embrião está apto a ser considerado em cada um dos quatro graus possíveis, utilizando a técnica de Redes Neurais Artificiais, provendo objetividade e reprodutibilidade.

20 **SUMÁRIO**

É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões a partir da análise morfológica de uma figura bidimensional, utilizando a técnica de Redes Neurais Artificiais (RNA).

25 É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que fornece como resultado um índice de qualidade embrionária de modo objetivo e reprodutível.

É característica da invenção um método para determinação da

viabilidade e qualidade de embriões com potencial aplicação em pesquisa científicas envolvendo embriões de camundongos/ratos, na classificação da qualidade de embriões bovinos produzidos para o uso comercial (produção *in vitro*), bem como para a avaliação da
5 qualidade embrionária de embriões humanos em clínicas de reprodução assistida.

É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões baseada na objetividade da análise e que independe da qualidade do microscópio, da experiência
10 do embriologista e da capacidade restrita dos graus de qualidade embrionária, classicamente utilizados para a avaliação.

É característica da invenção um método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões que não danifica os embriões, não é invasiva e pode ser realizada em pouco tempo, permitindo que
15 o avaliador "interprete" a resposta, de modo que a experiência clínica individual pode maximizar o resultado obtido pelo método.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 apresenta a representação da marcação da medida do primeiro diâmetro do embrião (DE1).

20 A figura 2 apresenta a representação da marcação da medida do segundo diâmetro do embrião (DE2).

A figura 3 apresenta a representação da marcação do Primeiro diâmetro da zona pelúcida (DZP1).

25 A figura 4 apresenta a representação da marcação do Segundo diâmetro da zona pelúcida (DZP2).

A figura 5 apresenta a representação da marcação da área do embrião (AE).

A figura 6 apresenta a representação da marcação da Área da

zona pelúcida (AZP).

A figura 7 apresenta a representação da marcação da Área de células mortas (ACM).

5 A figura 8 apresenta a marcação da Densidade de cor da zona pelúcida (DCZP).

A figura 9 apresenta o fluxograma do método utilizado para avaliação da arquitetura de RNA.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

10 O método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões, objeto da presente invenção, permite a avaliação morfológica de embriões de forma objetiva, mediante a extração de informações a partir de imagens dos embriões e sua posterior análise através de um programa de computador baseado em Redes Neurais Artificiais (RNA), uma técnica de Inteligência Artificial indicada para a
15 resolução de problemas não lineares e com variáveis interconectadas (Guoqiang Zhang, B. Eddy Patuwo, Michael Y. Hu, Forecasting with artificial neural networks: The state of the art, *International Journal of Forecasting*, Volume 14, Issue 1, 1 March 1998, Pages 35-62, ISSN 0169-2070, 10.1016/S0169-2070(97)00044-7) e (Eldon Y. Li, Artificial
20 neural networks and their business applications, *Information & Management*, Volume 27, Issue 5, November 1994, Pages 303-313, ISSN 0378-7206, 10.1016/0378-7206(94)90024-8).

Basicamente, uma Rede Neural Artificial é um sistema que atua na resolução de problemas, simulando o funcionamento de um
25 conjunto de neurônios biológicos. Tais neurônios da RNA (também chamados de perceptrons) precisam ser expostos a dados de treinamento, de forma a aprenderem a generalizar uma saída a partir de um conjunto de dados de entrada. Uma vez devidamente treinada,

a RNA é capaz de realizar predições, sem os dados de saída (Guoqiang Zhang, B. Eddy Patuwo, Michael Y. Hu, Forecasting with artificial neural networks: The state of the art, *International Journal of Forecasting*, Volume 14, Issue 1, 1 March 1998, Pages 35-62, ISSN 0169-2070, 10.1016/S0169-2070(97)00044-7) e (Haykin, S. , *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, 2nd edition, Prentice Hall, 1999 ISBN: 0132733501).

No presente método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões, as informações são extraídas da imagem do embrião mediante um protocolo, sendo em seguida processadas por um programa de computador que trabalha os dados recebidos, transformando-os em variáveis de entrada para a RNA e realiza o processamento, fornecendo como resultado um índice de qualidade embrionária nos mesmos padrões que um embriologista forneceria (graus "Excelente", "Bom", "Regular" e "Ruim").

Em uma primeira etapa do método para determinação da viabilidade e qualidade de embriões, são obtidas imagens do embrião, sendo preferentemente selecionadas imagens de blastocistos, desde a fase de blastocisto inicial até blastocisto expandido.

Necessariamente, a imagem deve apresentar integralmente o embrião, com nitidez da zona pelúcida e a delimitação da blastocèle devendo estar visível.

Em uma segunda etapa, a imagem do embrião é processada por um software de processamento de imagens, sendo obtidas mensurações a partir da seleção de pontos da imagem.

As variáveis obtidas utilizando o programa de computador de processamento de imagens compreendem:

a) Primeiro diâmetro do embrião (DE1), que compreende a

medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha que une os pontos mais extremos do embrião, não levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 1);

b) Segundo diâmetro do embrião (DE2), que compreende a
5 medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha aproximadamente perpendicular à linha DE1, que liga os pontos mais extremos do embrião, não levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 2);

c) Primeiro diâmetro da zona pelúcida (DZP1), que compreende
10 a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha que liga os pontos mais extremos do embrião, levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 3);

d) Segundo diâmetro da zona pelúcida (DZP2), que compreende
a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha
15 perpendicular à DZP1, ligando os pontos mais extremos do embrião e levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida (Figura 4);

e) Área do embrião (AE), sendo feito um contorno que envolve toda a área do embrião (sem ser considerada a área da zona pelúcida). A precisão dessa seleção é importante, pois várias
20 informações são extraídas da mensuração de área (Área do embrião, densidade de cor do embrião, circularidade do embrião) (Figura 5);

f) Área da zona pelúcida (AZP), sendo feito um contorno que envolve toda a área do embrião, sendo considerada a área da zona pelúcida. A precisão dessa seleção é importante, pois várias
25 informações são extraídas da mensuração de área (Área da zona pelúcida, densidade de cor total, circularidade da zona pelúcida) (Figura 6);

g) Área de células mortas (ACM), sendo feito um contorno que

envolve toda a área de células mortas, devendo ser incluídas tanto células mortas que se apresentem ainda aderidas como soltas do embrião (Figura 7);

h) Densidade de cor da zona pelúcida (DCZP), sendo feito um contorno que envolve somente a área da zona pelúcida, sem incluir a área do embrião. Esta variável não precisa ser obtida se o espaço perivitelino for ausente, pois nesse caso específico pode ser calculada através de AE (área do embrião) e AZP (área da zona pelúcida) (Figura 8).

Em uma terceira etapa, as variáveis obtidas pelo programa de computador para análise de imagens dão processadas para servirem de entrada na RNA, sendo armazenadas em um banco de dados.

O dado referente ao diâmetro do embrião (DE) é obtido pela fórmula 1.

Fórmula 1: diâmetro do embrião (DE)

$$DE = \frac{DE1 + DE2}{2}$$

O dado referente ao diâmetro da zona pelúcida (DZP) é obtido pela fórmula 2.

Fórmula 2: diâmetro da zona pelúcida (DZP)

$$DZP = \frac{DZP1 + DZP2}{2}$$

O dado referente à área de células vivas (ACV) é obtido pela fórmula 3.

Fórmula 3: ACV (Área de células vivas)

$$ACV = AE - ACM$$

O dado referente à densidade de cor do embrião (DCE) é obtido pelo primeiro programa de computador juntamente com a área do

que o embrião está (EDE) e o estágio ideal para o tempo decorrido desde a fertilização.

O dado referente à Relação com a Média do Grupo (RMG) compreende a relação entre a fase de desenvolvimento (EDE) e a Média do Grupo, determinada pela fórmula 5. Dessa forma, valores maiores que 1 indicarão que o embrião está adiantado em relação ao seu grupo, enquanto que valores menores do que 1 indicarão que o embrião está atrasado em relação ao seu grupo.

Fórmula 5: relação com a média do grupo (RMG):

$$RMG = \frac{EDE}{EDE_{grupo}}$$

Onde:

EDE grupo corresponde à média da fase embrionária de todos os outros embriões da mesma colheita.

O grau de rugosidade ou de granulação dos embriões (EDG) é obtido através de um macro para o programa de computador, permitindo identificar as regiões de contraste no embrião e contar estas regiões, de forma a representar numericamente essa característica visual.

O macro denominado de Sharp Edges (EDG) utiliza as operações básicas Sharpen e FindEdges de um software de análise de imagens, sendo constituído pelas operações:

```
run("UnsharpMask...", "radius=10 mask=0.50");
```

```
run("FindEdges");
```

Após, deve ser utilizada a opção FindMaxima (Noise:100 ; Sem light background).

O dado de relação de diâmetro médio (RDM) do embrião é obtido pela fórmula 6, onde DE (diâmetro do embrião) e DZP (diâmetro da

zona pelúcida) são obtidos por meio da média entre o maior e o menor diâmetro, respectivamente para o embrião e a zona pelúcida, favorecido pela grande constância do diâmetro da zona pelúcida, quando comparada com a do embrião propriamente dito.

5 Fórmula 6: relação de diâmetro médio (RDM)

$$RDM = \frac{DE}{DZP}$$

O dado referente à relação de células vivas (RCV) é obtido pela fórmula 7.

Fórmula 7: relação de células vivas (RCV)

$$RCV = \frac{ACV}{AZP}$$

10 O dado referente à Relação de Células Mortas (RCM) é obtido através da fórmula 8. Quanto maior o valor de RCM, maior será a proporção de células mortas no embrião, o que terá um impacto negativo em sua qualidade.

Fórmula 8: relação de células mortas (RCM)

$$RCM = \frac{ACM}{ACV}$$

15 O dado referente à relação de densidade de cor do embrião (RDC) é obtido através da fórmula 9. A cor do embrião é um fator importante a ser analisado, pois é diretamente influenciado pela sua densidade de células e como está a viabilidade destas. Esta variável é altamente dependente das condições nas quais foi obtida a imagem. Entretanto, estas variações são compensadas quando é estabelecida
20 uma relação da cor do embrião (DCE) com a da zona pelúcida (DCZP).

Fórmula 9: relação de densidade de cor do embrião (RDC)

$$RDC = \frac{DCE}{DCZP}$$

Valores de RDC menores que 1 indicam um embrião mais claro que a sua zona pelúcida, enquanto que valores maiores do que 1 um embrião mais escuro.

A intensidade de cor (DCE e DCZP) é medida pela média dos valores de brilho de cada pixel da área em questão. Este valor varia de 0 para completamente escuro até 255 para completamente branco.

O dado referente à Relação de circularidade ao quadrado (RCE2) é obtido pela fórmula 10.

Fórmula 10: relação de circularidade (RCE)

$$RCE2 = \left(\frac{CE}{CZP} \right)^2$$

Um círculo ideal terá um valor igual a 1. Quanto mais próximo de zero, menos a forma mensurada se assemelha a um círculo.

A circularidade é definida como $RCE = CE/CZP$, onde CE é a circularidade do embrião e CZP é a circularidade da zona pelúcida.

Como a zona pelúcida é constante e muito circular, valores próximos a 1 indicam uma circularidade alta do embrião, enquanto valores próximos a 0 indicam uma circularidade muito baixa.

No entanto, para fins de atribuição de características diferentes a embriões circulares ou pouco circulares por parte da RNA, tendo em vista que os valores são sempre muito próximos de 1, é utilizada a RCE2 (razão de circularidade elevada ao quadrado) de modo a ressaltar as diferenças numericamente pequenas de circularidade, onde os embriões mais circulares continuam tendendo a 1.

O dado referente à qualidade embrionária (Q) varia em uma escala de Excelente, Bom, Regular e Ruim, sendo utilizado como

gabarito para o treinamento da Rede Neural Artificial. A RNA possui 4 neurônios em sua camada de saída, cada um representando uma das possíveis classes de qualidade (Neurônios com valores 0 ou 1).

Em uma quarta etapa, é desenvolvida a arquitetura de RNA, com
5 definição da quantidade de camadas, número de neurônios nas camadas, funções de transferência entre os neurônios e funções de treinamento.

A estrutura de uma Rede Neural é composta de diversos elementos, como a quantidade de camadas de neurônios, a
10 quantidade de neurônios em cada camada, suas funções de transferência e função de treinamento da rede. Embora a correta determinação desses fatores seja de suma importância para o melhor desenvolvimento da RNA, não há um protocolo fixo para a determinação da melhor arquitetura (Xin Yao, Yong Liu, Towards
15 designing artificial neural networks by evolution, *Applied Mathematics and Computation*, Volume 91, Issue1, April 1998, Pages 83-90, ISSN 0096-3003, 10.1016/S0096-3003(97)10005-4).

O programa foi executado, tendo como condição de parada 10.000 ciclos, intervalo de 5 a 20 neurônios na primeira e segunda
20 camadas, sorteio de funções de transferência entre tansig, logsig e purelin e sorteio de funções de treinamento entre trainlm, trainscg e traingdx. O erro foi calculado com confusion matrix (porcentagem de classificações errôneas). A RNA desenvolvida utilizando-se o algoritmo de backpropagation.

25 Assim, foi obtida a melhor arquitetura de RNA para este caso específico, sendo uma rede com 18 neurônios na primeira camada e função de transferência purelin (função linear), 13 neurônios na segunda camada e função de transferência logsig (função logística). A

função de treinamento, escolhida pelo algoritmo, foi `trainscg` (`ScaledConjugateGradientAlgorithm`).

Conforme apresentado na figura 9, as entradas (inputs) compreendem variáveis utilizadas para criar as diferentes configurações da RNA. O programa de computador sorteia valores para todas as variáveis e cria uma RNA que é treinada com o banco de dados definido na terceira etapa do presente método contendo os dados relativos aos embriões, utilizando a divisão dos dados em treinamento, validação e teste de acordo com a escolha no início do programa. Tal processo ocorre ciclicamente, sendo que a cada ciclo o programa compara o erro da rede atual com as redes passadas, guardando a RNA com o menor erro. Uma vez atingida alguma das variáveis de parada, o programa encerra o ciclo e mostra o melhor resultado.

A seguir, é utilizada uma interface gráfica dotada de campos para entrada das variáveis obtidas por meio do programa de análise de imagens, sendo realizada a padronização das variáveis e uma simulação com a RNA previamente treinada.

As variáveis de entrada da RNA compreendem o EDE (Estágio do Desenvolvimento Embrionário), o DPC (Dias Pós Cópula), o RMG (Relação entre estágio de desenvolvimento e a Média do Grupo), o RDM (Relação entre Diâmetro Médio do embrião e da zona pelúcida), o RCV (Relação entre área de Células Vivas com a área total), o RCM (Relação entre área de Células Mortas com a área de células vivas), o RDC (Relação entre Densidade de Cor do embrião), o RCE2 (Relação entre Circularidade do Embrião e da zona pelúcida ao quadrado), o EDG (Macro Sharp EDGes), o RAB (Relação entre Área da Blastocle e área do embrião), o RDCB (Relação entre Densidade de Cor da

Blastocele com a densidade de cor do embrião), o RCB2 (Relação entre Circularidade da Blastocele e circularidade do embrião ao quadrado).

A avaliação da qualidade embrionária por RNA pode ser apresentada mediante um gráfico de barras, que representa cada uma das saídas da RNA (os 4 graus de qualidade), sendo a altura de cada barra determinada pela magnitude do valor da saída; e/ou através de um índice de qualidade, de acordo com o maior valor de saída da rede, sendo os resultados preferentemente apresentado como Excelente, Bom, Regular e Ruim; e/ou um vetor descritivo, que é o vetor real de saída da RNA, representando os valores dos quatro neurônios da camada de saída ("Excelente", "Bom", "Regular" e "Ruim", respectivamente).

A Tabela 1 apresenta os resultados da RNA para os dados de Teste. A coluna ID representa a identificação do embrião no banco de dados. A coluna erro foi calculada pela subtração da qualidade fornecida pela RNA em relação a qualidade fornecida como gabarito (avaliação do embriologista), de forma que 0 indica um acerto, +1 que a RNA atribuiu uma qualidade inferior à do gabarito e -1 que a RNA atribuiu uma qualidade superior à do gabarito.

TABELA 1: Resultados da RNA para os dados de Teste. As quatro saídas da RNA representam os graus de qualidade do embrião analisado, sendo 1 (excelente), 2 (bom), 3 (regular) e 4 (ruim).

ID	Saídas da RNA				Qualidade RNA	Qualidade Gabarito	Erro
	1	2	3	4			
003D	0,11	0,84	0,03	0,01	2	1	1
004E	0,45	0,64	0,00	0,00	2	2	0
004F	0,83	0,10	0,01	0,01	1	2	-1
004G	0,86	0,09	0,01	0,01	1	2	-1
008C	0,53	0,40	0,11	0,00	1	1	0

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES caracterizado por compreender as etapas de:

- 5 a) obtenção da imagem digital do embrião;
- b) processamento da imagem digital do embrião em um programa de computador de processamento de imagens, com obtenção das mensurações a partir da seleção de pontos da imagem;
- 10 c) obtenção das variáveis:
 - c.1) primeiro diâmetro do embrião (DE1), que compreende a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha que une os pontos mais extremos do embrião;
 - c.2) segundo diâmetro do embrião (DE2), que compreende a
15 medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha aproximadamente perpendicular à linha DE1, que liga os pontos mais extremos do embrião;
 - c.3) primeiro diâmetro da zona pelúcida (DZP1), que compreende a medida de diâmetro do embrião obtida através
20 de uma linha que liga os pontos mais extremos do embrião, levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida;
 - c.4) segundo diâmetro da zona pelúcida (DZP2), que compreende a medida de diâmetro do embrião obtida através de uma linha perpendicular à DZP1, ligando os pontos mais
25 extremos do embrião e levando em consideração o diâmetro da zona pelúcida;
 - c.5) área do embrião (AE), sem ser considerada a área da zona pelúcida;

c.6) área da zona pelúcida (AZP), sendo considerada a área da zona pelúcida;

c.7) área de células mortas (ACM);

c.8) densidade de cor da zona pelúcida (DCZP);

5 d) processamento das variáveis obtidas, para servirem de entrada na Rede Neural Artificial, sendo:

d.1) diâmetro do embrião (DE) obtido pela fórmula $DE = \frac{DE1+DE2}{2}$;

10 d.2) diâmetro da zona pelúcida (DZP) obtido pela fórmula $DZP = \frac{DZP1+DZP2}{2}$;

d.3) área de células vivas (ACV) obtida pela fórmula $ACV = AE - ACM$;

d.4) densidade de cor do embrião (DCE) obtida juntamente com a área do embrião (AE);

15 d.5) densidade de cor total (DCTotal) obtida juntamente com a área da zona pelúcida (AZP);

d.6) densidade de cor da zona pelúcida (DCZP) obtida pela fórmula $DCZP = \frac{(DCTotal \times AZP) - (DCE \times AE)}{(AZP - Ae)}$;

20 d.7) circularidade do embrião (CE) obtida juntamente com área do embrião (AE);

d.8) circularidade da zona pelúcida (CZP) obtida juntamente com Área da Zona Pelúcida (AZP);

25 d.9) fase do Desenvolvimento Embrionário (EDE) obtido pela análise morfológica visual do embrião, sendo EDE=0,0 no caso de blastocisto inicial, FDE=0,5 no caso de blastocito e EDE=1,0 no caso de blastócito expandido;

d.10) dias Pós-cópula (DPC) compreende o tempo (em dias) decorridos desde a cópula do mamífero gerador do embrião;

d.11) relação com a média do grupo (RMG) compreende a relação entre a fase de desenvolvimento (EDE) e a Média do

5 Grupo, determinada pela fórmula $RMG = \frac{EDE}{EDE_{grupo}}$;

d.12) grau de rugosidade ou de granulação dos embriões (EDG) obtido por meio de um macro para o programa de computador de processamento de imagens;

d.13) relação de diâmetro médio (RDM) do embrião é obtida

10 pela fórmula $RDM = \frac{DE}{DZP}$;

d.14) relação de células vivas (RCV) obtida pela fórmula

$$RCV = \frac{ACV}{AZP};$$

d.15) relação de Células Mortas (RCM) obtida através da

$$fórmula RCM = \frac{ACM}{ACV};$$

15 d.16) relação de densidade de cor do embrião (RDC) obtida

$$através da fórmula RDC = \frac{DCE}{DCZP};$$

d.17) relação de circularidade ao quadrado (RCE2) obtido

$$pela fórmula RCE2 = \left(\frac{CE}{CZP} \right)^2;$$

e) desenvolvimento da arquitetura de Rede Neural Artificial, com
20 definição da quantidade de camadas, número de neurônios nas camadas, funções de transferência entre os neurônios e funções de treinamento;

f) padronização das variáveis e simulação com a RNA previamente treinada, utilizando-se uma interface gráfica

dotada de campos para entrada das variáveis obtidas através do programa de computador para análise de imagens;

g) avaliação da qualidade embrionária por Rede Neural Artificial.

2. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E

5 QUALIDADE DE EMBRIÕES, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de preferentemente a imagem digital ser selecionada de blastocistos.

3. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES, de acordo com a reivindicação 1,

10 **caracterizado pelo** fato da imagem digital do embrião apresentar a zona pelúcida com nitidez e a delimitação da blastocle.

4. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E QUALIDADE DE EMBRIÕES, de acordo com a reivindicação 1,

15 **caracterizado pelo** fato da avaliação da qualidade embrionária por Rede Neural Artificial ser apresentada mediante um gráfico de barras, que representa cada uma das saídas da RNA, sendo a altura de cada barra determinada pela magnitude do valor da saída; e/ou através de um índice de qualidade, de acordo com o maior valor de saída da rede, sendo os resultados preferentemente apresentado como
20 Excelente, Bom, Regular e Ruim; e/ou um vetor descritivo, que é o vetor real de saída da RNA, representando os valores dos quatro neurônios da camada de saída ("Excelente", "Bom", "Regular" e "Ruim", respectivamente).

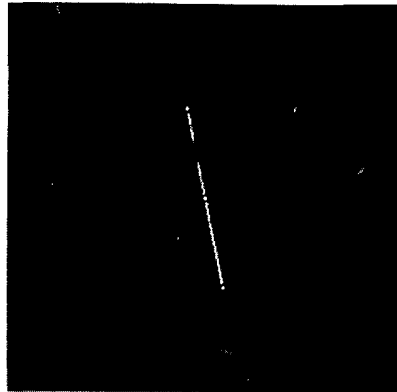


Figura 1

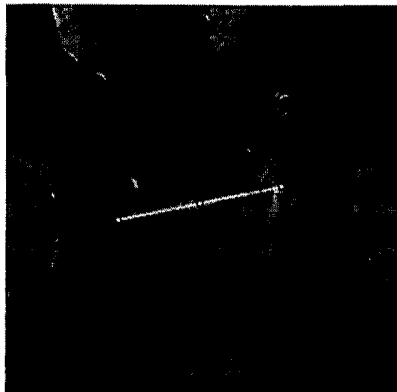


Figura 2

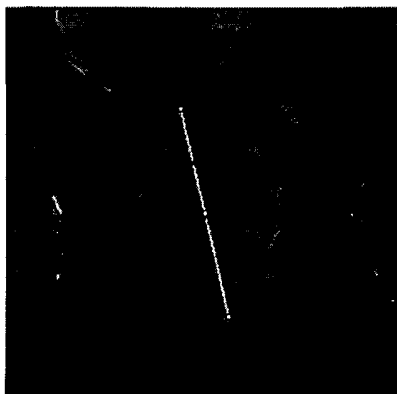


Figura 3



Figura 4



Figura 5

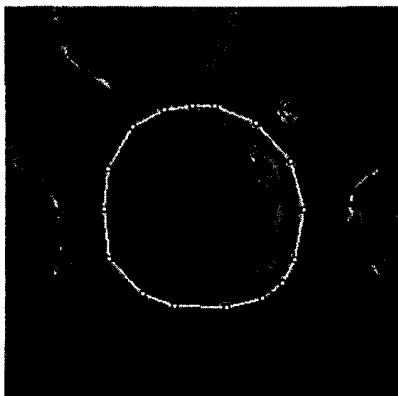


Figura 6



Figura 7

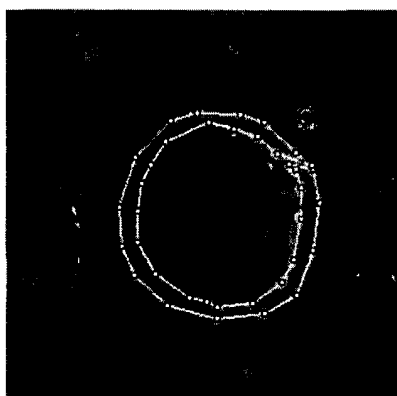


Figura 8

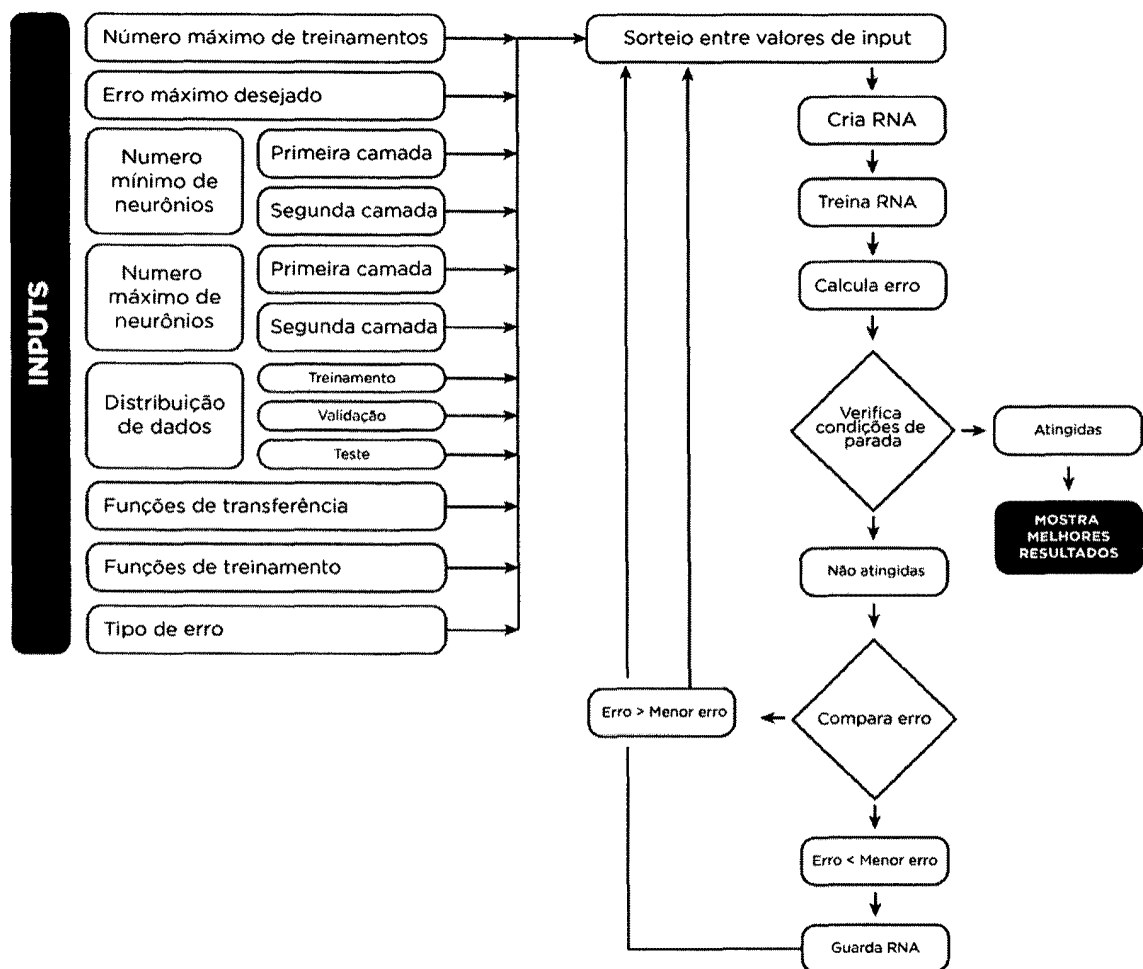


Figura 9

RESUMO
MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E
QUALIDADE DE EMBRIÕES

É descrita a invenção de um método para determinação da
5 viabilidade e qualidade de embriões que permite uma avaliação rápida
e com mínima interferência no desenvolvimento embrionário,
utilizando um sistema de microscopia associado à captura digital de
imagens, provendo um conjunto de valores para cada embrião que
representa o quanto o embrião está apto a ser considerado em cada
10 um dos quatro graus possíveis, utilizando a técnica de Redes Neurais
Artificiais, provendo objetividade e reprodutibilidade.