



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA [Q~] Facultat de Ciències Biològiques

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

Facultad de CC. Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Programa Oficial de Doctorado en Biotecnología

Predicción de desarrollo a Blastocisto e implantación durante el proceso rutinario de incubación mediante time-lapse.



Memoria realizada por:

D^a Yamileth Motato Moscoso

Para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valencia

Dirigida por:

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

Dra. Dña. María José Escribá

Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt

Valencia, Junio 2017

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad, IVI Valencia, y en las instalaciones del Instituto FIVIR, Valencia.



Dr. D. **Marcos Meseguer Escrivá**, Doctor cum laude en ciencias biológicas por la Universidad de Valencia y Doctor europeo. Máster en Métodos de Investigación, Diseño y Estadística, Universidad Autónoma de Barcelona y embriólogo del laboratorio de embriología clínica del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia.

Dra. Dña. **María José Escrivá**, Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad Politécnica de Valencia y embrióloga Senior certificada por la ESRHE y ASEBIR, del laboratorio de embriología clínica del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia.

Dr. D. **Nicolás Garrido Puchalt**, Doctor en ciencias biológicas por la Universidad de Valencia. Máster en Metodología de la Investigación Diseño y Estadística de la Universidad Autónoma de Barcelona y Director de la Fundación IVI del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia.

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado:

Predicción del desarrollo a Blastocisto e implantación durante el proceso rutinario de incubación mediante time-lapse.

Ha sido realizado íntegramente por Yamileth Motato Moscoso, bajo nuestra dirección y supervisión. Dicho trabajo está concluido y reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa pública ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, se expide la presente certificación en Valencia, 2017.



Fdo. Marcos Meseguer E.



Fdo. María José Escrivá



Fdo. Nicolás Garrido P

"La conclusión es que sabemos muy poco y sin embargo es asombroso lo mucho que conocemos. Y más asombroso todavía que un conocimiento tan pequeño pueda dar tanto poder."(Bertrand Russell)

Agradecimientos

Cuando me planteé iniciar con los agradecimientos ya en este punto final de mi proceso, no pude evitar echar la mirada atrás y caer en la cuenta de todo lo que ha ocurrido, de los cambios que he afrontado, el desafío que implican los nuevos retos, los sentimientos encontrados e incluso lágrimas de por medio, pero realmente lo que me fortalece, satisface y me dibuja una sonrisa es que he llegado hasta aquí y no lo he hecho sola, lo he hecho de la mano de personas que siempre han estado presente, me han apoyado y han creído en mí. No tengo otro punto más por empezar que agradecer a mi familia, a mis padres, ese par de personas, Marcelino y Carmen, que con tanto tesón, amor y como digo yo...berrquera!! han sacado adelante a 6 hijos, se han esforzado a niveles inigualables por enseñarnos lo que es trabajar duro y ganarse las cosas con esfuerzo y coraje, con respeto y dignidad; A mi hermano Alfredo “cuasi” papá, mi homólogo y gran ejemplo, que sin proponérselo me introdujo en este mundo de la Reproducción Humana, por tantas charlas e incluso discusiones que hemos tenido sobre los temas de la vida, por guiarme y siempre impulsarme a buscar la excelencia; a mis hermanas Magali y Elizabeth por ser esas mujeres aguerridas, fuertes y echadas pa'lante, entregadas a la familia, con un corazón inmenso y dignas de toda mi admiración y respeto; a mi hermano Héctor Jairo por confiar en mí y facilitarme el punto de partida para soñar y cumplir en este apartado de mi vida profesional, a mi tío/hermano/compradre Hernando por su constante compañía, consejos, apoyo incondicional y punto de referencia. A mis sobrinos y sobrinas porque han sido un motor y motivación constante.

En segunda instancia, quiero agradecer a mis suegros Maribel y Damià, y mi cuñada Lourdes, por apoyarme en todo momento, por “regalarme” horas cuando se quedararon con Ariadna para que pudiera dedicarme a mi tesis, por estar a mi lado en momentos de stres y ansiedad, por convertirse en mi segunda familia.

En tercer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, María José Escrivá (he de decir que aunque no siempre te entiendo, admiro tu capacidad de ver lo que normalmente los demás no perciben), Nicolás Garrido (siempre dispuesto a escuchar y orintarme) y Marcos especialmente, porque además de ser mi director de tesis, es un gran compañero, una persona que me apoyó y valoró mi trabajo, me brindaste la oportunidad e impulsaste a continuar con este proceso, y a ver en la investigación un campo tanto diverso como interesante y aunque en alguna ocasión me llamas “ceniza” junto a Alberto mira.....no

me equivoqué. A mis ex compañeros de laboratorio del IVI Valencia, por su paciencia, amabilidad e inmensa colaboración a la hora de recoger en un principio datos del EmbryoScopeTM, por enseñarme el trabajo en un equipo tan grande y diverso, en especial a Arantxa Delgado por su disponibilidad y buena energía al transmitirme tus conocimientos desde que fuiste mi tutora del máster hasta ahora, José María por ser unos de esos bonitos “bichos raros”, María José de los Santos y Pep Romero por darme la oportunidad, Mar Nohales por apoyarme y a AlbertoTejera por dedicarme tiempo dentro del lab y enseñarme ese “Truquillo” al microinyectar, aunque quizá no sepas de qué te hablo, me acuerdo y lo pongo en práctica...todavía. A mis ex compañeros del Departamento de semen y de Vitricación, en especial a Ana Cobo quien me dio su voto de confianza inicial.

A Marita Espejo-Catena, Esther Espejo-Catena, Ana Espejo-Catena, Ana Ortega García y Vicente E. Abadía, mis compañeros del Instituto FIVIR, por entender mi necesidad de tiempo para continuar con esta etapa de mi vida profesional y apoyarme para seguir en ella.

Finalmente, a Damià, mi esposo, mi compañero no sólo de trabajo si no de vida, gracias por tu infinito apoyo, compañía, paciencia, por comprenderme a la perfección, por ser incondicional, por estar siempre ahí donde y cuando te he necesitado. Sin ti...gran parte de lo que tengo y soy no existiría y por supuesto...por último y no por eso menos importante... A mi gran amor pequeñito...mi hija, Ariadna, mi muñeca preciosa, lo mejor de mi vida. Gracias por ser ese motivo para seguir adelante cuando las circunstancias no fueron las más fáciles, por tus travesuras y esa hermosa risa que me contagia y alegra. Por ser quienes y como son, les dedico mi trabajo, mi esfuerzo y todo lo que significa, les dedico mi tesis.

Gracias a todos y cada uno.... de todo corazón

Tabla de contenido

	Página
I. INTRODUCCIÓN	23
1.1. Definición de Infertilidad	25
1.1.1. Epidemiología y causas de la infertilidad	25
1.1.2. Infertilidad Masculina	26
1.1.3. Infertilidad Femenina	26
1.2. Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).....	28
1.2.1. Consecuencia de la transferencia de dos embriones: Gestación Múltiple.....	29
1.3. Desarrollo Pre-Implatacional	30
1.3.1. Ciclo celular	32
1.4. Métodos de selección embrionaria	33
1.4.1. Selección Morfológica	33
1.4.2. Selección No morfológica con técnicas invasivas.....	36
1.4.3. Selección No morfológica con técnicas No invasivas.....	36
1.4.3.1 Birrefringencia (BF).....	37
1.4.3.2. Medición del consumo de oxígeno.....	37
1.4.3.3. Las “Ómicas” como método adicional de estudio.....	37
1.4.3.4. Antígeno Leucocitario Humano-G soluble (sHLA-G).....	38
1.4.3.5. Sistema de <i>time-lapse</i> (TLS).....	38
<i>Time-lapse</i> y eventos del desarrollo embrionario.....	41
<i>Time-lapse</i> y selección embrionaria	46
2. OBJETIVOS	57
2.1. Objetivo Principal.....	59
2.2. Objetivos específicos.....	59
3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1. Diseño del estudio	63
3.1.1. Donación de ovocitos	64
3.1.2. Criterios de inclusión y exclusión	64

3.1.3. Estimulación ovárica (Donantes y donantes)	65.
3.1.4. Punción ovárica y recuperación de ovocitos	66.
3.1.5. Preparación endometrial de receptora de ovocitos/embriones	67.
3.1.6. Obtención, procesamiento de la muestra seminal e ICSI	68.
Exámen microscópico	69.
Capacitación	70.
ICSI	71.
3.1.7. Cultivo embrionario en sistema de <i>time-lapse</i> EmbryoScope™	72.
3.1.7.1. Análisis del desarrollo embrionario en EmbryoScope™	74.
3.1.8. Transferencia embrionaria.....	76.
3.1.9. Determinación de la gestación	77.
3.2. Fases del estudio	78.
Fase 1. Estudio de las variables morfocinéticas y generación de algoritmo para la formación de Blastocisto	78.
Fase 2. Generación de algoritmo de implantación con modelo de llegada a blastocisto	79.
Fase 3. Validación del algoritmo para la implantación de Blastocistos.....	80.
Fase 4. Exploración de las nuevas variables del segundo y tercer ciclo celular como predictores de la formación de blastocito e implantación	80.
3.3. Análisis estadístico.....	82.
4. RESULTADOS	85.
Fase 1. Resultados del análisis embrionario en la identificación de eventos morfocinéticos que predicen la llegada a blastocisto. Generación de algoritmo	87.
Fase 2. Resultados obtenidos de la transferencia en estado de blastocisto. Algoritmo de implantación.....	95.
Resultados de la clasificación morfológica y morfocinética de blastocistos transferidos.....	101
Fase 3. Resultados obtenidos de la validación del modelo de implantación en estadio de blastocisto.....	105
Fase 4. Resultados de la exploración de nuevas variables del segundo y tercer ciclo celular.....	107.

Asociación del segundo ciclo celular con la formación de blastocisto e implantación.....	109
Asociación del tercer ciclo celular con la habilidad de desarrollo a blastocisto e implantación.....	111
5. DISCUSIÓN.....	115
6. CONCLUSIONES.....	129
7. ANEXOS.....	133
8. BIBLIOGRAFÍA.....	137

INDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1. a) Prevalencia de infertilidad primaria femenina, año 2010 b) Prevalencia de infertilidad secundaria femenina, año 2010	26
Figura 2. Tasas de gestación según edad	27
Figura 3. Esquema de desarrollo embrionario desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto.....	32
Figura 4. a) Blastocisto temprano b) Blastocisto en expansión c) Blastocisto expandido	35
Figura 5. Sistema de <i>time-lapse</i> utilizado durante el desarrollo <i>in vitro</i> de embriones humanos	39
Figura 6. Representación esquemática de los ciclos celulares y las sincronías en el desarrollo embrionario temprano	43
Figura 7. División Directa a) con generación de más de dos células de la primera división y b) producción de más de dos células como resultado de la división de células hijas	44
Figura 8. Modelo de selección embrionaria según riesgo de aneuploidía	50
Figura 9. Modelo de selección según probabilidad de euploidia embrionaria	50
Figura 10. Intervalos de tiempo determinados mediante tecnología de <i>time-lapse</i>	51
Figura 11. Modelo de selección jerárquica de embriones basado en criterios de inclusión y exclusión por Meseguer <i>et al.</i> , (2011).	52
Figura 12. Modelo de selección jerárquica de embriones basado en criterios de inclusión y exclusión de Basile <i>et al.</i> , (2015).	53
Figura 13. Modelo de selección jerárquica de embriones según su género	54

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 14. Tipos de motilidad espermática a) móviles progresivos rápidos b) móviles progresivos lentos c) móviles no progresivos d) inmóviles.....	70
Figura 15. Esquema del proceso de selección espermática mediante técnicas de gradientes de densidad y de Swim-up	71
Figura 16. Sistema de <i>time-lapse</i> EmbryoScope™	72
Figura 17. Selección embrionaria a través de <i>time-lapse</i> EmbryoScope™	73
Figura 18. Tiempos de eventos celulares registrados en el EmbryoScope™	75
Figura 19. Esquema de variables relacionadas con los ciclos celulares.....	76

4. RESULTADOS

Figura 20. Distribución de los embriones analizados con base en el estadio de Blastocisto y no Blastocisto en día 5 de desarrollo.....	87
Figura 21. Valor predictivo ROC para modelo de formación de blastocisto según tM y t5.	91
Figura 22. Valor predictivo ROC para modelo de formación de blastocisto eliminando tM del 84modelo	91
Figura 23. Rango óptimo de tiempo para la tercera sincronía (s3)	92
Figura 24. Rango de tiempo óptimo para la formación de mórula	93
Figura 25. Valor predictivo ROC para modelo de formación de blastocisto	95
Figura 26. Modelo de clasificación jerárquica de los embriones con base en rango óptimo para tM y s3.....	94
Figura 27. Distribución de los Blastocistos obtenidos, donde 832 fueron transferidos	95
Figura 28. Valor predictivo ROC para implantación con modelo de formación de blastocisto ...	96
Figura 29. Tasa de implantación para embriones que presentan o no rangos óptimos para las variables s3 y BE.....	99
Figura 30. Modelo de clasificación jerárquica de implantación en el estadio de Blastocisto con base en rangos óptimos de tiempo para s3 y BE.	100
Figura 31. Valor predictivo mediante análisis de curva ROC para modelo de implantación en transferencia en estadio de blastocisto	100
Figura 32. Distribución por categoría morfocinética y morfológica de Blastocistos implantados	102
Figura 33. Distribución de Blastocistos transferidos por categorías según metodología de clasificación.....	103
Figura 34. Valor predictivo mediante análisis de curva ROC para modelo de implantación en transferencia en estadio de Blastocisto teniendo en cuenta su morfología y edad de la donante y/o paciente	105
Figura 35. Valor predictivo mediante análisis de curva ROC para validación del modelo de implantación en transferencia en Blastocisto según s3 y EB	106
Figura 36. Distribución de los embriones analizados mediante <i>time-lapse</i> con base en el estadio de Blastocisto en día 5 de desarrollo	107
Figura 37. Esquema de variables del segundo y tercer ciclo celular.....	108

Figura 38. Representación gráfica de los seis modelos posibles de embriones durante su tercer ciclo celular, de acuerdo con los patrones de escisión de sus células	108
Figura 39. Distribución de formación de Blastocisto de acuerdo con los rangos óptimos de las variables del segundo ciclo celular, cc2a, cc2b y SR2	110
Figura 40. Distribución de formación de Blastocisto de acuerdo con los rangos óptimos de las variables cc3a y SR3 del tercer ciclo celular.	112
Figura 41. Distribución de Blastocistos que implantan y no implantan de acuerdo con los rangos óptimos de las variables del tercer ciclo celular.....	113

INDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Características de los equipos de <i>time-lapse</i> con aplicación clínica	40
--	----

4. RESULTADOS

Tabla 2. Media de los tiempos embrionarios analizados mediante <i>time-lapse</i> hasta estadio de blastocisto.....	88
Tabla 3. Tiempos exactos de los eventos de acuerdo con su cuartil (Q1, Q2, Q3 y Q4) y número y proporción de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto	89
Tabla 4. Modelo de regresión logística mediante el modelo de selección hacia adelante para cc3, cc2, tM y t5	90
Tabla 5. Modelo de regresión logística mediante el modelo de selección hacia adelante para s3, t3, cc3, cc2, tM.....	92
Tabla 6. Formación de blastocistos de acuerdo con la categoría en el modelo de clasificación jerárquica.....	95
Tabla 7. Tiempos exactos de los eventos de acuerdo con su cuartil, número y proporción de embriones que implantan en el estadio de Blastocisto	97
Tabla 8. Datos obtenidos del análisis de χ^2 en la tabla de contingencia para las variables t7, t8, EB y s3	98
Tabla 9. Modelo de regresión logística mediante el método de selección hacia adelante en el que las variables introducidas corresponden a BE y s3	99
Tabla 10. Distribución de blastocistos implantados de acuerdo con las categorías morfocinéticas.....	101

Tabla 11. Distribución de blastocistos transferidos e implantados de acuerdo con la categoría morfológica ASEBIR	101
Tabla 12. Análisis de regresión logística de la implantación en curso en referencia a los Blastocistos con implantación conocida como afectados por la combinación de categorías morfológicas de blastocisto y morfocinética	104
Tabla 13. Clasificación de Blastocistos transferidos según categoría en modelo de implantación de acuerdo con tiempo de s3 y BE	106
Tabla 14. Promedio de los eventos del segundo ciclo celular en embriones que alcanzan y no, el estadio de blastocisto.....	109
Tabla 15. Promedio de los eventos del segundo ciclo celular en Blastocistos que implantan y no implantan.....	111
Tabla 16. Tiempo de los eventos del tercer ciclo celular en embriones que alcanzan y no, el estadio de blastocisto.....	111
Tabla 17. Tiempos de los eventos del tercer ciclo celular en embriones que implantan y no implantan.....	112

GLOSARIO

Variable/Parámetro	Definición
ICSI o t0	Tiempo de microinyección espermática
MII	Ovocito en Metafase II
2CP	Aparición del segundo corpúsculo polar
2PN	Aparición de dos pronúcleos
Desaparición PN	Tiempo de desaparición de los pronúcleos
t2	Tiempo de división a dos células
t3	Tiempo de división a tres células
t4	Tiempo de división a cuatro células
t5	Tiempo de división a cinco células
t6	Tiempo de división a seis células
t7	Tiempo de división a siete células
t8	Tiempo de división a ocho células
t9	Tiempo de división a nueve células
tM	Tiempo de mórula compacta
tB	Tiempo de formación de blastocisto
tBE	Tiempo de Blastocisto expandido
tBH	Tiempo de Blastocisto eclosionado
cc2= t3-t2	Duración del segundo ciclo celular
cc3= t5-t3	Duración del tercer ciclo celular
s2= t4-t3	Sincronía del segundo ciclo celular
s3= t8-t5	Sincronía del tercer ciclo celular
cc2a=t3-t2	Duración del cc de la célula que primero se divide, en un embrión de dos células a uno de tres células
cc2b=t4-t2	Duración del cc de la célula que en segundo lugar se divide, en un embrión de dos células a uno de cuatro células
acc2= cc2a+cc2b/2	Promedio del segundo ciclo celular
SR2= cc2a/cc2b	Sincronía en las divisiones del segundo ciclo celular
cc3a=t5-t3	Duración del tercer ciclo celular de la célula que se divide en primer lugar, de un embrión de cuatro células a un embrión de cinco células
cc3b=t6-t3	Duración del tercer ciclo celular de la célula que se divide en segundo lugar, de un embrión de cuatro células a un embrión de seis células
cc3c=t4-t7	Duración del tercer ciclo celular de la célula que se divide en tercer lugar, de un embrión de cuatro células a un embrión de siete células
cc3d=t8-t4	Duración del tercer ciclo celular de la célula que se divide en cuarto lugar, de un embrión de cuatro células a un embrión de ocho células
acc3=(cc3a+cc3b+cc3c+cc3d)/4	Promedio del tercer ciclo celular
SR3= acc3/(t8-t3)	Sincronía en las divisiones del tercer ciclo celular
ROC	Receiver Operating Characteristic
AUC	Area Under Curve

1.

INTRODUCCIÓN.

INTRODUCCIÓN

1.1 Definición de Infertilidad.

En las parejas jóvenes sanas, la probabilidad de obtener una gestación en un ciclo reproductivo está entre el 20% y el 25%, alcanzando el 60% dentro de los primeros 6 meses, el 84% en el primer año, y el 92% en el segundo año con una actividad sexual regular (1). Sin embargo, si al alcanzar el primer año no se logra, se utiliza el término de "**infertilidad**" que como en la mayoría de los estudios clínicos, epidemiológicos así como en medicina reproductiva es empleado para definir a “una enfermedad del sistema reproductivo, determinado por el fracaso para lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más, de regularidad en relaciones sexuales sin protección”(2).

Existen dos tipos de infertilidad: la primaria cuando no es posible lograr un embarazo en 1-2 años y no se ha gestado previamente y la secundaria cuando, a diferencia de la anterior, sí se ha logrado un embarazo previo (3).

1.1.1. Epidemiología y causas de la Infertilidad.

La infertilidad, en términos generales constituye un problema médico común que afecta entre 13 al 15% de las parejas de todo el mundo (4) con una distribución general para países desarrollados entre el 5% y el 8% (5) a expensas de infertilidad de tipo primario y entre el 5.8% al 44 % (6), en países en vía de desarrollo en especial de tipo secundario (Figura 1).

INTRODUCCIÓN

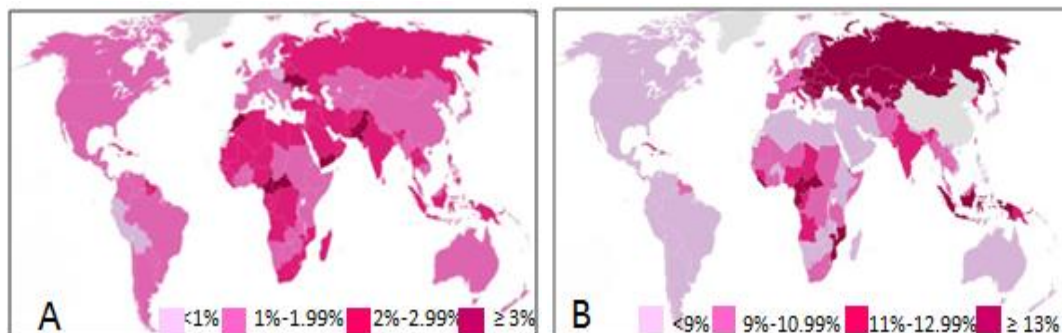


Figura 1. A) Prevalencia de infertilidad primaria femenina, año 2010. B) Prevalencia de infertilidad secundaria femenina, año 2010 (12).

De acuerdo con la literatura, la infertilidad se debe a factor: masculino, femenino, mixto y desconocido.

1.1.2. Infertilidad Masculina.

La infertilidad de origen masculino representa entre el 40% y el 60% de los casos de infertilidad (7,8) y para su diagnóstico el primer paso es el análisis de las características seminales, que pueden verse afectadas por diversos factores tanto extrínsecos (medio ambientales) como intrínsecos (anatómicos, endocrinológicos o genéticos). La causa genética se encuentra presente en aproximadamente el 30% de los casos y además de afectar la producción y función de los espermatozoides (9) presentan el riesgo de ser transmitidos a su descendencia. Finalmente, en aproximadamente el 25% de los casos, la etiología de la infertilidad masculina es desconocida o inexplicada.

1.1.3. Infertilidad Femenina.

Las infertilidad por factor femenino es la responsable del 40 al 60% de los casos y puede deberse a: i) causas mecánicas en las que existe alguna dificultad para depositar el eyaculado en el tracto genital femenino, ocurre en el 40% de los casos de infertilidad y puede presentar un origen congénito como la ausencia o alteración irreversible de órganos genitales femeninos internos o un origen adquirido como las secuelas de

enfermedades de transmisión sexual; ii) causas endocrinas: en las que existe alteración de la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, representa aproximadamente el 40% de los casos y, iii) causas inexplicadas que representan alrededor del 10-20% de los casos. Sin duda, el factor más importante en la infertilidad femenina es la edad de la mujer, en la que con el paso del tiempo, principalmente a partir de la tercera década (10,11), se produce una reducción cualitativa y cuantitativa de los ovocitos, descenso que no puede ser controlado ni modificado y que se pone de manifiesto no sólo por un declive en la capacidad para gestar y tener hijos (12,13) sino también, por un aumento de la tasa de abortos principalmente ocasionados por el incremento de aneuploidías o cromosomopatías (14) (Figura 2). Así mismo, el aumento de la edad de la mujer es asociado con disminución de la receptividad endometrial y un aumento de enfermedades ginecológicas (15).

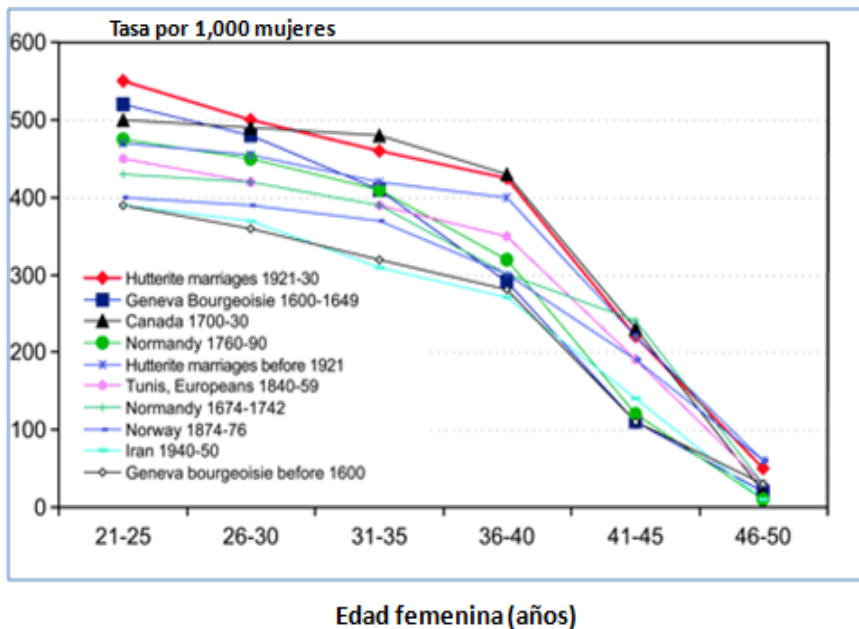


Figura 2. Tasas de gestación según edad (11)

INTRODUCCIÓN

1.2. Técnicas de Reproducción Asistida (TRA).

Se refiere a un conjunto de técnicas de baja y alta complejidad empleadas en el tratamiento de la pareja infértil, con el único fin de lograr un embarazo que concluya en un recién nacido sano. Una de las primeras técnicas utilizada y que surge a finales del siglo XVIII es la Inseminación Artificial (IA). Se caracteriza por depositar directamente los espermatozoides capacitados en el interior del útero mediante una cánula ya sea de la pareja recibiendo el nombre de inseminación Artificial Conyugal (IAC) o de donante (IAD). Las indicaciones de esta técnica son básicamente: la incapacidad para depositar el semen en la vagina; la infertilidad femenina por factor cervical, uterino, endometriosis o disfunción ovulatoria; infertilidad inmunológica e infertilidad de origen desconocido. La IA presenta una tasa general de embarazo que oscila entre 5-70% por paciente y por ciclo de 10-20% (16).

Por otro lado y dentro de las técnicas de alta complejidad, se encuentran la Fecundación *in Vitro* (FIV) convencional utilizada por primera vez en 1978 y la microinyección Intracitoplasmática de espermatozoides o ICSI (del inglés *Intra Cytoplasmic Sperm Injection*) desarrollada por primera vez en 1992; ambas consisten en la recuperación por aspiración ecoguiada de los ovocitos, su fecundación *in vitro*, desarrollo embrionario y finalmente su transferencia al útero materno. La FIV está indicada en pacientes con patología tubárica, endometriosis e infertilidad de origen desconocido mientras que la ICSI, está dirigida principalmente a parejas con infertilidad por factor masculino severo, aunque en la actualidad su utilización se ha extendido a diversos casos como por ejemplo: pacientes incluidos en el programa de Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP), screening de aneuploidías, ciclos de TRA con ovocitos vitrificados y en ciclos de maduración ovocitaria *in vitro*.

Desde el nacimiento del primer bebé a través de la FIV, trabajo pionero realizado por Edwards y Steptoe en el año 1978, estas técnicas se han convertido en la herramienta más utilizada para tratar la infertilidad y, a pesar de su mejora y avances en las áreas de biología y la medicina, su eficiencia (definida como porcentaje de nacido vivo) continúa siendo relativamente bajo encontrándose entre el 30 y el 40% (17) probablemente, por las características intrínsecas de los gametos, la poca información a la hora de seleccionar el embrión más competente (18) así como a la falta de conocimiento a nivel molecular y celular de las diferentes etapas que forman parte del proceso reproductivo. Adicionalmente, y a pesar de que existen diversas etiologías que resultan en el fallo de implantación, entre las que se incluyen anomalías genéticas, anomalías uterinas, autoinmunidad, calidad seminal y factores medio ambientales, la causa exacta continúa siendo desconocida.

Es por este motivo que además de que las parejas deban someterse, en su mayoría, a varios tratamientos antes de alcanzar el éxito de tener un recién nacido vivo en casa, se genera la “necesidad” de requerir más de un embrión por transferencia con el efecto adverso de aumentar las gestaciones múltiples así como la complicaciones en la madre y el recién nacido (18).

1.2.1. Consecuencia de la transferencia de dos embriones: Gestación Múltiple.

El embarazo múltiple es el desarrollo simultáneo en el útero de dos o más fetos y por lo general, presenta un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad perinatal, de tal forma que prácticamente todos los riesgos del embarazo único aumentan de forma significativa en este tipo de gestaciones. Según los datos registrados en Canadá, Asia, Europa y EE.UU las tasas de nacimientos múltiples comenzaron a aumentar a mediados de la década de 1980 con un aumento vertiginoso después de 1990 (19). En Europa y EE.UU durante la década de 1980 (20) se registraron entre 8 y 12 gestaciones múltiples

INTRODUCCIÓN

por cada 1000 nacimientos mientras que, 20 años después (2005-2008) esta tasa se ha duplicado a 14-24 por cada 1000 partos (21,22). Este incremento se debe principalmente a dos factores: el primero es la postergación de la maternidad en el que estudios realizados en diversas poblaciones (23,24) han reportado un aumento principalmente de carácter dicigótico (DZ) en mujeres con edades comprendidas entre 35-39 años y el segundo, a la transferencia de más de un embrión, asociado al creciente uso de las técnicas de reproducción humana asistida (25). Es importante resaltar que en un intento de minimizar el riesgo de la multigestación, en países como Suecia, Finlandia, Bélgica y Dinamarca es frecuente la transferencia de un solo embrión o *Single Embryo Transfer*, **SET** (26), estrategia aceptada cada vez más por las parejas que se someten a estas técnicas, razón por la cual se hace cada vez más necesarias las mejoras en los métodos de selección que permitan identificar el mejor embrión que muestre la mayor capacidad de implantar dentro de una cohorte embrionaria.

1.3. Desarrollo Pre-Implantacional.

El desarrollo del embrión humano comienza con la unión del espermatozoide, transcripcionalmente inerte, y el óvulo (ambos gametos haploides) mediante el proceso de la fecundación. En el cual es posible observar: i) dos corpúsculos polares (CP) aproximadamente entre 3-7 horas post-ICSI (27,27) y, ii) dos pronúcleos (PN) momento a partir del cual el óvulo fecundado recibe el nombre de *cigoto*. Posteriormente, los PN inician la replicación de su DNA, migran uno junto al otro (morfológicamente observados como singamia), se produce la reprogramación epigenética de los pronúcleos gaméticos, posteriormente desaparecen y dan paso a la primera de una serie de divisiones mitóticas que caracterizan esta etapa. Aunque el espermatozoide aporta ADN para la formación del pronúcleo masculino y es esencial para la activación

ovocitaria, sus mitocondrias así como los precursores del centro organizador de los microtúbulos y sus componentes celulares almacenados, desempeñan roles menores en el proceso de la fecundación y la embriogénesis temprana (28-31). Por el contrario, el ovocito gracias a las reservas de mRNA y proteínas en su citoplasma, se convierte en el responsable de diversas funciones que van desde la remodelación del genoma paterno y la transcripción cigótica que culminan con la activación del genoma embrionario, proceso conocido como transición materno zigótica (MZT) (32), asegurándose con ello una conversión exitosa del control transcripcional desde aquél exclusivamente materno a una responsabilidad propiamente embrionaria (Figura 15). La actividad transcripcional embrionaria se caracteriza porque las células carecen de actividad transcripcional propia, mostrando flexibilidad y habilidad de diferenciarse en otros tipos celulares, propiedad que recibe el nombre de *totipotencia*. A continuación y tras sucesivas mitosis, el embrión aumenta su número de células en ausencia de un crecimiento celular significativo y cuando alcanza más de 10 (16-32 células) logra el nuevo estadio llamado *mórula*. Las células de una *mórula* pierden progresivamente su forma esférica y se unen estrechamente unas con otras, en un proceso denominado *compactación* generando así, hacia el día 4 de desarrollo, la *mórula compacta*, hecho que constituye el primer evento morfológico de diferenciación celular.

Poco después, hacia el día 5 de desarrollo, las células que conforman la *mórula compacta* se desplazan por la secreción de un líquido hacia el interior del embrión, conformando una cavidad llamada *blastocèle* a partir de la cual se constituye el nuevo estadio que es el *blastocisto* (B), en el que si el *blastocèle* ocupa menos del 50% del volumen total se denomina *blastocisto temprano* (BT) y si es mayor del 50%, *blastocisto cavitado* (BC). Seguidamente y como resultado de la secreción de fluido

INTRODUCCIÓN

blastocélico, se inicia el crecimiento del tamaño total del blastocisto y adelgazamiento de la zona pelúcida generándose el *blastocisto expandido* (BE), estadio en donde podemos diferenciar claramente tanto la masa celular interna como el trofoctodermo y en el que el embrión se encuentra preparado para implantar (Figura 3). Finalmente, el blastocisto se desprende de la zona pelúcida, momento en el cual recibe el nombre de *blastocisto eclosionado* o *hatched* (BH).



Figura 3. Esquema del desarrollo embrionario desde el estadio de cigoto hasta el estadio de blastocisto.

1.3.1. Ciclo Celular.

El ciclo celular (cc) comprende una serie de eventos complejos que conducen al crecimiento de la célula y, finalmente, a la generación de dos células hijas, garantizando con ello la continuidad de la información hereditaria. En los embriones humanos tempranos, la duración media del ciclo celular oscila entre 10 y 12 horas.

Dentro del ciclo celular se distinguen dos grandes períodos:

- i) Fase de no división o *Interfase* durante la cual se produce la preparación y duplicación del ADN, subdividida a su vez por : **Fase G₁** (del inglés *Growth* o *Gap* 1) es la etapa en la cual la célula comprueba las condiciones internas para “decidir” si continuar o no con el ciclo celular, **Fase S** (del inglés *Synthesis*) en la que se producen dos eventos importantes: *la* replicación del ADN y *la* duplicación de los centrosomas, necesarios para la organización del huso mitótico y **Fase G₂** (del inglés *Growth* o *Gap* 2), en la que continúa la síntesis de proteínas, RNA y en la que se acumulan

progresivamente las moléculas que serán necesarias durante la posterior fase M. Durante la fase G₂, las células también aumentan en tamaño y los centrosomas, duplicados durante la fase S, se dirigen a sitios opuestos en la célula para formar posteriormente el huso mitótico.

ii) Fase de división o *Fase M*, durante la cual se produce el reparto o segregación idéntica del material antes duplicado. La Fase M se divide en varias etapas: profase, metafase, anafase, telofase y citocinesis. Las primeras están relacionadas con las modificaciones que se producen en el ADN: compactación, formación y movimiento de los cromosomas y descondensación; por su parte, la citocinesis es el proceso de división del citoplasma en dos partes por estrangulamiento celular, lo que provoca la fusión y rotura de la membrana plasmática, dando como resultado dos células hijas independientes.

1.4. Métodos de selección embrionaria.

La identificación de los embriones con el mayor potencial de implantación sigue siendo un desafío en las TRA motivo por el cual, han sido diversos los enfoques adoptados. Entre estas estrategias encontramos:

1.4.1. Selección Morfológica.

La clasificación morfológica de los gametos y embriones utilizando el microscopio, es el procedimiento más tradicional y habitualmente utilizado para seleccionar el/los embriones, previo a su transferencia. Aunque se trata de una metodología de bajo costo y fácil de implementar, es subjetiva, requiere de experiencia e incluso, de tenerla, no siempre resulta exacta, ya que embriones considerados de baja

INTRODUCCIÓN

calidad han demostrado tener potencial para continuar su desarrollo e implantar y por el contrario, embriones con buenas características morfológicas no lo logran. Además, la observación morfológica de los embriones, altera las condiciones de cultivo al necesitar ser extraídos del incubador al tiempo que utiliza diferentes sistemas de clasificación embrionaria que dificulta la estandarización de los parámetros con los que debe contar el embrión óptimo. Por estas razones, en algunos países, se ha intentado unificar y validar conceptos relacionados con la morfología embrionaria a través de la creación de consensos nacionales como la Sociedad Británica de Fertilidad (BFS) en el Reino Unido y la Asociación Española para el Estudio de la Biología Reproductiva (ASEBIR).

Puesto que la morfología del embrión es actualmente el factor más importante para la predicción de la gestación, ASEBIR ha definido un sistema dinámico en el que se incluyen todas las etapas del desarrollo embrionario desde el gameto hasta el estadio de blastocisto.

- **Evaluación Ovocitaria:** los factores asociados a la evaluación de la calidad de los ovocitos incluyen: los dismorfismos citoplasmáticos ovocitarios, el complejo ovocito-corona-cúmulo y los dismorfismos extracitoplasmáticos no mostrando relevancia y siendo considerados únicamente como desviaciones fenotípicas.

- **Evaluación del Cigoto:** los parámetros morfológicos que se tienen en cuenta en la evaluación cigótica incluyen: la polarización, la presencia de un halo citoplasmático, el número de pronúcleos y la apariencia pronuclear. Dado que las características morfológicas están relacionadas con el tiempo transcurrido desde la fecundación, la evaluación del cigoto debe realizarse dentro de un período de tiempo concreto después de la inseminación establecida en 16-22 horas.

- **Evaluación de los Embriones en División (D2 y D3 de desarrollo):** los embriones en estadios iniciales de división se clasifican en cuatro categorías en función de su calidad: **A:** máxima calidad, **B:** buena calidad, **C:** mala calidad embrionaria y **D:** pésima calidad o no viable, siendo recomendado en estos casos su no transferencia; esta categoría incluye todos los embriones multinucleados. Esta evaluación considera además el medio de cultivo así como el sistema de cultivo empleado, ya que ambas variables ejercen un impacto significativo en la morfología embrionaria.

- **Evaluación de Blastocisto:** El estadio de blastocistos se alcanza a las 114-118 horas post inseminación (D5) o 136-140 horas post inseminación (D6), dependiendo del sistema y medio de cultivo utilizado. Para su evaluación, ASEBIR ha propuesto una clasificación que permite combinar el grado de expansión del blastocele (Figura 4), la forma y compactación de la masa celular interna (MCI) y el número y estructura de las células del trofoectodermo (TE), dando origen a cuatro categorías de mejor a peor calidad: A, B, C y D.



Figura 4. A) Blastocisto temprano B) Blastocisto en expansión C) Blastocisto expandido.

A pesar de que se han publicado diversos estudios sobre la selección embrionaria basados en las características de los ovocitos (33); los pronúcleos (34-37), día 2 y/o día 3 de desarrollo (38-41), capacidad para llegar hasta el estadio de

INTRODUCCIÓN

blastocisto (42-44) y la evaluación morfológica en conjunto (45) no ha sido posible, hasta la fecha, una selección inequívoca del mejor embrión. Además, el conocimiento de las divisiones celulares así como los cambios morfológicos de procesos activos del crecimiento y desarrollo, han sido deducidos a partir de evaluaciones en puntos discretos en el tiempo o imágenes fijas del mismo, con lo cual, su información es restringida, omitiendo eventos de relevancia en el momento de decidir qué embrión cumple con las mejores características para implantar; razón por la cual, se ha optado por explorar nuevas metodologías diagnósticas.

1.4.2. Selección No morfológica con técnicas invasivas.

Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP): se utiliza para analizar embriones antes de su transferencia al útero. Dentro del DGP existen dos tipos: i) **PGD, del inglés *preimplantational genetic diagnosis*** que consiste en analizar el ADN del embrión para la detección de una mutación específica (enfermedad monogénica) y así seleccionar los embriones que no la han heredado, no padecerán la enfermedad y por tanto, candidatos a transferir y ii) **PGS, del inglés *preimplantational genetic screening*** que permite la selección de embriones cromosómicamente normales dentro de una cohorte en la que se sospecha una probabilidad mayor de embriones aneuploides (46-48).

1.4.3. Selección No morfológica con técnicas No invasivas.

Los métodos de selección embrionaria basados en técnicas no invasivas son métodos complementarios a la selección morfológica de diversa complejidad y orientados a determinar la competencia de los ovocitos que comprende la capacidad

intrínseca de los gametos para ser fecundados correctamente, alcanzar el estadio de blastocisto e implantar en el útero:

1.4.3.1. Birrefringencia (BF): se refiere a la propiedad que tienen la zona pelúcida (ZP) y el huso meiótico (HM) de desdoblar un rayo de luz determinado. Esta metodología emplea sistemas de microscopía de luz polarizada (Polscope). Una intensidad alta o positiva se ha asociado significativamente con mejores índices de calidad embrionaria, formación de blastocisto (49) e implantación (50-52); no obstante, existe controversia (53) respecto a su eficiencia predictiva.

1.4.3.2. Medición del consumo de oxígeno: El consumo de oxígeno es un indicador bastante fiable de la actividad metabólica general del ovocito y de su contenido mitocondrial, permitiendo una valoración cuantitativa, objetiva del potencial reproductivo (54). Tejera y colaboradores (55) en un estudio realizado sobre 349 ovocitos, demostraron que este consumo está relacionado con la capacidad de fecundación, por lo que, ovocitos con baja producción de ATP (bajo consumo de oxígeno), podrían comprometer el proceso de la fecundación y posterior desarrollo embrionario.

1.4.3.3. Las “Ómicas” como método adicional de estudio. Estas nuevas tecnologías han intentado cambiar la percepción sobre la fisiología humana al tratarse de instrumentos que amplían la descripción fenotípica. Entre ellos destacan la *Transcriptómica*, que estudia el contenido de RNA de las células, en especial las del cúmulo ovocitario y permiten una aproximación a los niveles de expresión de los genes importantes en el proceso de competencia ovocitaria. Se han postulado que los genes GREM1(56), BCL2L11 y el PCK1, asociados con la gestación (57) y la regulación de la

INTRODUCCIÓN

transcripción del factor NFIB, se relacionan con la capacidad de los ovocitos para generar embriones susceptibles de implantar y dar lugar a nacidos vivos (58). Por su parte, la ***Proteómica***, permite la caracterización de las proteínas/péptidos expresados y secretados (secretoma) por el embrión en el medio de cultivo en el que es cultivado (59). Algunos estudios indican que existen diferentes perfiles de secretomas, en embriones morfológicamente similares, que podrían potencialmente correlacionarse con su viabilidad (60,61). Por último, la ***Metabolómica*** permite el estudio de los metabolitos (moléculas de bajo peso: azúcares, aminoácidos y lípidos) que se encuentran presentes en los medios de cultivo de los embriones. Por ejemplo, se han identificado los aminoácidos Alanina (Ala), Arginina (Arg), Glutamina (Gln), Metionina (Met) y Asparagina (Asn) como predictores de la la capacidad de desarrollo hasta el estadio de blastocisto (62) e implantación (62,63).

1.4.3.4. Antígeno Leucocitario Humano-G soluble (sHLA-G) es una molécula HLA tipo I no clásica (Ib) expresada principalmente por las células del trofoblasto placentario aunque también se ha encontrado en diversos órganos. Esta molécula está asociada con la implantación, ya que protege al embrión del ataque inmunitario materno por proporcionar un estado de inmunosupresión local (64,65).

1.4.3.5. Sistema de time-Lapse (TLS) consiste en la captura consecutiva de imágenes digitales en intervalos de tiempo conocido, bajo condiciones óptimas y constantes de cultivo embrionario. Esta tecnología permite un seguimiento continuo del conjunto de cambios morfológicos que ocurren desde el momento posterior a la microinyección espermática hasta la finalización del cultivo que acontece previamente a su transferencia al útero materno. A su vez, este sistema de cultivo facilita la comprensión de los mecanismos que forman parte de la fecundación y el desarrollo temprano embrionario.

Aunque se ha utilizado durante décadas, especialmente en el área de la investigación (66,67), no fue hasta 1997 (68) cuando se describió por primera vez la extrusión del segundo corpúsculo polar y la aparición de los pronúcleos (PN), eventos que se presentan entre las horas 17 y 20 después de la ICSI en los embriones humanos. En esta versión temprana del sistema de cultivo embrionario en *time-lapse*, se recogieron imágenes cada minuto de los ovocitos microinyectados, utilizando una cámara de vídeo en color con poca luz y un microscopio invertido con aumento de 200x, localizado dentro de una caja de resina para mantener las condiciones de cultivo estables (37°C de temperatura y 5% de CO₂). La imagen posteriormente fue magnificada en un monitor externo a 1064x.

Algunos años más tarde, Mio y Maeda describen la cinética de los eventos embrionarios hasta el estadio de blastocisto (69), incluyendo el proceso de la fecundación, el desarrollo de los embriones desde el estadio de dos células y hasta el estadio de blastocito, para lo cual emplearon una versión inicial de sistema de *time-lapse* (Figura 5).

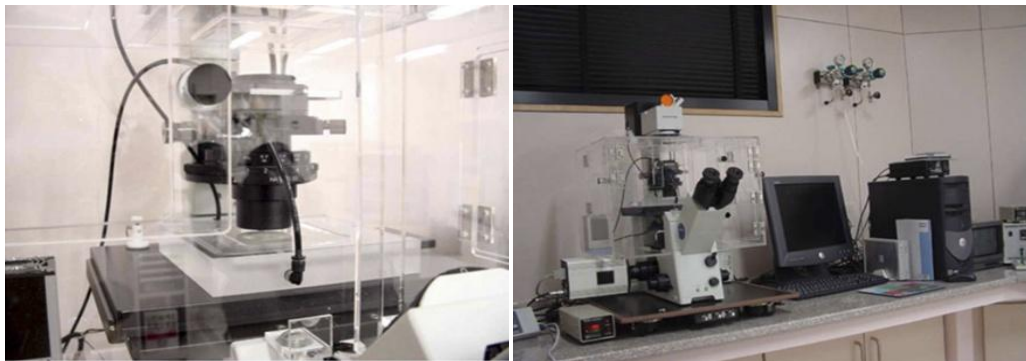


Figura 5 .Sistema de *Time-lapse* utilizado durante el desarrollo *in vitro* de embriones humanos(69).

Desde entonces, esta metodología ha avanzado y, gracias a la bioinformática ha evolucionado a equipos de aplicación clínica (Tabla 1) combinando tres componentes

INTRODUCCIÓN

básicos: un incubador, un microscopio y la aplicación de un software. Los sistemas actuales de cultivo embrionario en *time-lapse* incorporan además, sistemas de control para los parámetros de la incubación embrionaria, CO₂, O₂ y temperatura, y un sistema óptico adaptado a luces en un rango entre 550-650 nm para evitar el efecto nocivo que las luces de alta intensidad puedan causar al embrión.

Características	Primo Vision	Eeva	Embryoscope	Miri	Geri
Campo	Campo claro (LED verde)	Campo oscuro	Campo claro (LED roja)	Campo claro (LED roja)	Campo claro (LED naranja)
Imagen embrionaria	Cada 10 minutos	Cada 5 minutos	Cada 10 minutos	Cada 5 minutos	Cada 5 minutos
Campos focales	1	1	7	4	11
Capacidad	1 cámara	1 cámara	6 sistemas	6 sistemas	6 sistemas
Cultivo embrionario	Grupo	Grupo	Individual	Individual	Individual
Características la placa	9 o 16 embriones por placa	9 embriones por placa	12 embriones por placa EmbryoSlide®	14 embriones por placa CultureCoins	16 embriones por placa
Total embriones	54 o 96/ 6 pacientes	48/ 5pacientes	72/ 6 pacientes	84/ 6 pacientes	96/ 6 pacientes
Incubador integrado	no	no	si	si	si
Análisis información	Manual	Tiempo real	Manual	Manual	Manual

Tabla 1. Características de los equipos de *time-lapse* con aplicación clínica.

En 2010, Wong *et al.*, (70) combinaron la imagen y la expresión génica, proponiendo nuevos marcadores predictivos de competencia embrionaria, centrándose en la formación del blastocito. En el mismo año, Pribenszky *et al.*, (71) reportan el primer nacimiento vivo a partir de la transferencia de un blastocisto seleccionado dentro de una cohorte de 5 embriones monitorizados hasta día 5 de desarrollo.

Así pues y debido a la facilidad de su aplicación y su naturaleza objetiva, gran parte de la investigación reciente se ha centrado en explorar la utilidad del sistema de cultivo embrionario en *time-lapse* mediante la búsqueda de marcadores de competencia ovocitaria y embrionaria, sin someter a los embriones a cambios de temperatura o pH. Así como a exposiciones prolongadas de luz, que pueden ejercer un efecto adverso en su desarrollo y calidad.

➤ ***Time-lapse y eventos del desarrollo embrionario.***

- ***Proceso de Fecundación.***

Durante las últimas décadas, la fecundación se ha evaluado entre las 16 y 22 horas después de la inseminación, mediante observación estática. Sin embargo, con la incorporación de los sistemas de *time-lapse* ha sido posible observar su progresión entera así como las divisiones mitóticas posteriores, convirtiéndose en unas de las estrategias más desarrolladas en la búsqueda de nuevos marcadores de selección embrionaria. Es así como características observadas durante las primeras divisiones han sido identificadas por algunos autores como un parámetro objetivo con valor predictivo sobre la viabilidad (72), calidad (73) e implantación embrionaria (27). De hecho, un estudio realizado por Aguilar y colaboradores (74) describe en detalle los eventos del primer ciclo celular y concluyen que, los embriones que en su primer ciclo celular presentan una fase S (tiempo entre la aparición y desaparición de los PN) entre 5,7 y 13,8 horas; una desaparición pronuclear entre 22,2 y 25,9 horas y; una extrusión del segundo corpúsculo polar entre 3,3 y 10,6 horas post-ICSI, presentan mejores tasas de implantación.

INTRODUCCIÓN

De igual forma, el uso de esta tecnología en la práctica rutinaria del laboratorio de embriología, ha permitido identificar anomalías durante este período como por ejemplo: la aparición de un tercer corpúsculo polar que, aunque ocurre de forma transitoria y finaliza con su reabsorción, se ha planteado como posible desencadenante la cromatina espermática, o la aparición del tercer pronúcleo que ocurre principalmente por la incapacidad del ovocito para eliminar un set de cromátidas a través de la extrusión del segundo corpúsculo polar y puede ocurrir hasta 15 horas después de la incorporación del espermatozoide al ovocito (75).

- *División Celular.*

El estudio de las divisiones celulares (69,76,77) ha permitido determinar el tiempo exacto de cada una de ellas, desde el mismo instante de la aparición del primer surco de división hasta la separación total en células hijas; estos estudios también han permitido descubrir que la división de células hermanas rara vez se produce al mismo tiempo, dando así lugar al estudio de la sincronía entre ellas y para lo cual, se definen dos sincronías (s) que son: s₂ o sincronía en el segundo ciclo celular que se define como el tiempo transcurrido desde el estadio de dos células al de cuatro, calculado mediante la diferencia del tiempo en que el embrión alcanza el estadio de tres células (t₃) al tiempo en el que alcanza el estadio de cuatro células (**t₄-t₃**) y s₃ o sincronía en el tercer ciclo celular, definido como el tiempo de transición de un embrión en estadio de cinco células a un embrión de ocho células (**s₃=t₈-t₅**). Esta variable de sincronía dentro de un ciclo celular se ha asociado además, a la viabilidad embrionaria (77). Así pues, es posible identificar las divisiones irregulares definidas en base al tiempo o duración del ciclo celular (cc), ya sea por muy cortos o muy largos, o por el patrón de división, lo que presenta una variable dinámica en períodos cortos de tiempo (Figura 6).

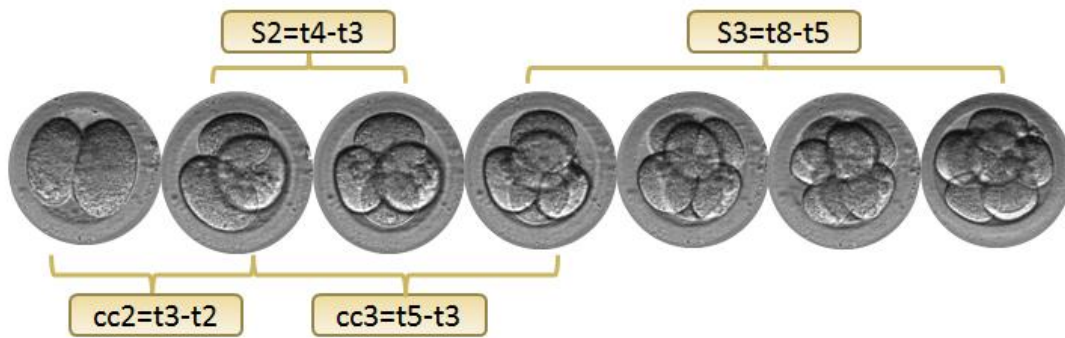


Figura 6. Representación esquemática de los ciclos celulares y las sincronías en el desarrollo embrionario temprano.

Las variaciones observadas pueden ser causadas por diversos motivos entre los que citamos la presencia de gametos diploides o alteraciones en la formación del huso debido a la incorporación de espermatozoides con centrosomas defectuosos y/o centriolos incapaces de controlar adecuadamente las primeras divisiones mitóticas del ovocito (78) y en consecuencia pueden dar lugar a: i) **División directa** evento que puede ocurrir en cualquier estadio, con o sin multinucleación celular y por el que una célula se divide directamente en tres células hijas o incluso más o cuando la transición de dos a tres células ocurre en menos de cinco horas; está estrechamente relacionado con bajas tasas de implantación, aproximadamente 1.2%; (79). En un estudio realizado por Athayde Wirka K y colaboradores (80) identificaron dos tipos de división directa: i) fenotipo AC1 que se caracteriza por la formación de más de dos células como resultado de la primera división y ii) fenotipo AC2 se presenta cuando la célula hija da origen a más de dos células durante la segunda división (Figura 7). Adicionalmente, dichos autores observaron una anomalía de la primera división a la que llaman A_1^{cyt} que consiste en la presencia de irregularidad en el citoplasma justo antes y durante la primera división mitótica, acompañado por lo general de pequeños surcos. ii) **División**

INTRODUCCIÓN

Caótica es una alteración en los patrones de división durante la primera y segunda mitosis, caracterizada por divisiones erróneas, movimiento constante de las membranas celulares y, generalmente, células desiguales en tamaño y/o fragmentos (80). iii)

División Reversa proceso embrionario que consiste tanto en la fusión de las células (Tipo I) como en la citocinesis fallida (Tipo II); este evento puede ocurrir en diversas ocasiones y en cualquier etapa del desarrollo embrionario, aunque es más frecuente en el estadio de cuatro células (81).

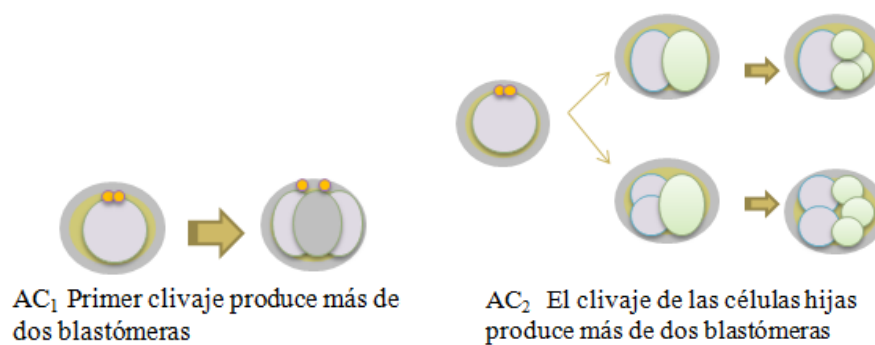


Figura 7. División Directa a) con generación de más de dos células de la primera división y b) producción de más de dos células como resultado de la división de células hijas (80).

- **Fragmentación (Fg) en embriones tempranos.**

Los fragmentos son estructuras nucleares, formadas por citoplasma delimitado por una membrana celular y en cuyo interior usualmente se encuentran cromosomas secuestrados (41,82,83). Su presencia es una característica común en los embriones humanos, aunque no es exclusiva del cultivo embrionario *in vitro* (84). La viabilidad del embrión fragmentado es extremadamente difícil de predecir puesto que algunos embriones que la presentan pueden dar origen a nacidos vivos, aunque en general se reconoce que tienen un menor potencial de implantación y embarazo que aquéllos no fragmentados dentro de su misma cohorte (85). Con el uso del *time-lapse* en la rutina de los laboratorios de fecundación *in vitro*, se ha podido dilucidar la morfología dinámica

de la fragmentación citoplasmática, ya que pueden cambiar su localización dentro del embrión. Además, se han observado más fragmentos durante la segunda división mitótica que durante la primera, siendo algunos de ellos absorbidos (86) por la célula en las dos horas siguientes a la primera y segunda división.

- **Compactación celular.**

Durante el proceso de compactación celular se producen diversos cambios que incluyen la redistribución de las microvellosidades, la proliferación mitótica y, la polarización citoplasmática entre otras. La compactación celular tiene una influencia importante en el posterior proceso de formación de blastocisto, inicio de la formación de la masa celular interna y la diferenciación del trofoectodermo. Con el empleo del sistema de cultivo embrionario en *time-lapse*, se ha podido identificar el momento exacto del inicio de la compactación celular, mostrando que los embriones que la presentan durante o después del estadio de 8 células presentan mayores tasas de formación de blastocisto e implantación (87), comparado con aquéllos que presentan una compactación celular prematura, lo que se asocia con un desarrollo alterado y una mayor incidencia de células multinucleadas (88). Por lo que respecta a su duración, ésta es variable y se ha asociado incluso con la ploidía del blastocisto resultante (89); así, embriones aneuploides, presentan un proceso de compactación aproximadamente 5 horas más largo que los embriones euploides. Por último, indicar que el tipo de compactación es decir, completa (incluye todo el embrión) o incompleta (excluye parte del embrión) parece ser un evento relevante en el posterior potencial de desarrollo embrionario. Al igual que la mayoría de los eventos descritos, se han podido observar anomalías en el proceso de compactación celular como es el caso de la **Compactación Reversa** (CR) en el que una vez el embrión se ha compactado, sus células vuelven a

INTRODUCCIÓN

estar redondas y bien diferenciadas, sin presentar una segunda fase de compactación. Este fenómeno es difícil de interpretar porque *per se*, la compactación no es muy susceptible de análisis morfocinético. Sin embargo, este hecho sugiere que una alteración en esta etapa del desarrollo podría permitir predecir la viabilidad posterior del embrión (75).

➤ ***Time-lapse y selección embrionaria.***

Como resultado de las diferentes investigaciones del desarrollo embrionario, se han propuesto tiempos y características para seleccionar el mejor embrión a transferir, tomando como referencia eventos entre los que se encuentra: el tiempo de la extrusión del segundo corpúsculo polar, la sincronía en la aparición de los PN, la singamia de los PN, la duración de la primera mitosis, los tiempos de las divisiones de dos a ocho células y el tiempo en el que es alcanzado el estadio de mórula, lo que ha dado lugar a la definición de sus rangos óptimos y al establecimiento de su relación con el potencial de desarrollo *in vitro* e *in vivo* (77,90-92). La presencia de la multinucleación e irregularidad en el estadio de dos células y la división directa a tres células (79) han sido propuestas como variables de selección negativa de embriones con bajo potencial de implantación.

Por otra parte, se han estudiado los efectos que diversos protocolos de estimulación ovárica controlada ejercen sobre el desarrollo cinético embrionario (27,93) y además, el posible efecto de los medios de cultivo en la división embrionaria sin encontrar diferencia en los medios utilizados (94). Adicionalmente, algunos autores han intentado estandarizar los conceptos relacionados con el uso del *time-lapse* en la evaluación embrionaria (95) y han analizado el comportamiento de los embriones así

como el efecto que sobre ellos ejerce la incubación con esta tecnología en comparación con un incubador convencional sin llegar a un consenso claro (96,(96).

Así pues, al estudiar y concebir el desarrollo embrionario *in vitro* como un proceso completamente dinámico, variable y capaz de ser analizado de forma concreta y precisa, se da paso a un nuevo concepto en la evaluación embrionaria, la **morfocinética** que se refiere al estudio de el/los tiempo(s) exacto(s), el patrón del desarrollo embrionario y el movimiento (cinética) en combinación con su morfología. Durante los últimos 5 años, su uso clínico se ha incrementado considerablemente y en especial en Europa debido a las limitaciones en el número máximo de embriones a transferir según la legislación, lo que exige una mejor y cada vez mayor selección embrionaria.

Por lo anterior, diferentes grupos de investigación se han centrado bien en identificar marcadores cinéticos y con ello crear modelos algorítmicos para seleccionar el mejor embrión dentro de una cohorte (selección positiva) o bien deseleccionar y/o identificar los embriones menos óptimos para transferir (selección negativa).

- **Morfocinética y formación de blastocisto.**

Los primeros datos morfocinéticos con tiempos específicos para predecir el potencial embrionario de desarrollo a blastocisto, fueron publicados por Wong y sus colaboradores (70). En este estudio, se analizaron 242 cigotos humanos descongelados y cultivados hasta día 5, proponiendo tres parámetros predictivos del potencial de desarrollo y obtenidos de los estadios embrionarios tempranos: i) Duración de la primera citocinesis ($14,3 \pm 6,0$ min); ii) intervalo de tiempo que discurre entre el final de la primera mitosis y el inicio de la segunda mitosis (P2: $11,1 \pm 2,2$ h) y iii) el intervalo entre la segunda y tercera (P3: $1,0 \pm 1,6$ h). Wong *et al.*, sugieren que es posible predecir la formación del blastocisto con una sensibilidad del 94% y una especificidad

INTRODUCCIÓN

del 93% si los tiempos de las variables antes citadas se encuentran entre 0-33 minutos; 7,8-14,3 h y 0-5,8 h, respectivamente. Por su parte, embriones que mostraron valores fuera de estos rangos presentan mayor probabilidad de bloqueo de su desarrollo. Por otra parte, Herrero *et al.*, (97) en uno de los estudios de mayor casuística reportado de embriones humanos, observaron que aunque los parámetros tempranos (t_2 , t_3 y t_4) son predictores del desarrollo a corto plazo, realmente los parámetros tardíos (t_5 y t_8) son los que mejor predicen la competencia de los embriones a etapas tardías como es el estadio de blastocisto.

Con respecto a las sincronías y duración de los ciclos celulares, diversos estudios han permitido determinar que la duración de cc_2 y s_2 son significativamente más cortos en los blastocistos que expanden, en comparación con los que no lo hacen (90). La duración de s_2 facilita la selección de los blastocistos de buena calidad (98) y, finalmente cc_3 y s_3 pueden ser consideradas herramientas útiles para identificar el embrión viable con competencia a alcanzar el estadio de blastocisto expandido (99).

Más recientemente, un estudio de Milewski *et al.*, (100) basado en 432 embriones, utiliza los tiempos t_2 , t_3 , t_4 y t_5 y los intervalos entre la segunda y la tercera división ($cc_2 = t_3 - t_2$ y $s_2 = t_4 - t_3$) para proponer un modelo predictivo del desarrollo embrionario hasta blastocisto. De esta manera, se determina un nuevo parámetro, S_c que se obtiene a través de un modelo de regresión logística multivariable. Más específicamente, esta variable representa la suma de los productos de los tres parámetros del modelo multiplicado por las razones de posibilidades correspondientes y se describe por la fórmula:

$$S_c = s_{t_2} * OR_{s_{t_2}} + s_{t_5} t_5 + * OR_{s_{s_{CC2}}} CC_2 * OR_{s_{s_{CC2}}}$$

- **Morfocinética y normalidad cromosómica.**

La correlación entre el contenido cromosómico y la duración de los estadios específicos del desarrollo embrionario también han sido analizados. Chávez *et al.*, (82) mediante el uso del *time-lapse* determinaron que i) la fragmentación junto con la duración de la primera citocinesis (P1: $14,4 \pm 4,2$ min); (ii) tiempo de duración del ciclo celular de dos a tres células (cc2: $11,8 \pm 0,71$ h) y; (iii) tiempo de sincronía de tres a cuatro células (s2: $0,96 \pm 0,84$ h) pueden potencialmente ser utilizados para distinguir embriones euploides de los aneuploides en el estadio de cuatro células.

Posteriormente, Campbell y colaboradores estudiaron el comportamiento morfocinético de embriones euploides y aneuploides con el fin de hallar diferencias en ellos. Para ello utilizaron los datos obtenidos de 98 blastocistos biopsiados para PGS (89) encontrando que los embriones euploides presentan un inicio de compactación (tC) a las 79,7 horas, un inicio de blastulación (tSB) a las 95,1 horas y llegada a blastocisto (tB) a las 105,9 horas mientras que, los embriones aneuploides presentan un retraso en estos tiempos siendo de 85,1 horas para tC, 103,4 horas para tSB cuando presentan única alteración cromosómica o de 101,9 horas para múltiples alteraciones y 110,9 horas para tB. Sin embargo, las únicas variables significativamente identificadas, de entre más de 20 variables analizadas fueron tSB y tB a partir de las cuales generan un modelo no invasivo que permite seleccionar los embriones con reducido riesgo de aneuploidía (Figura 8).

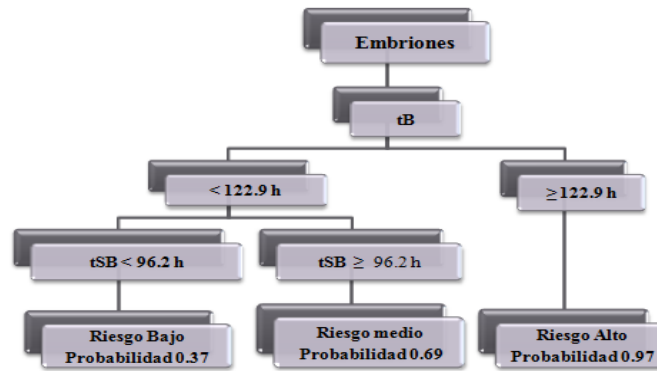


Figura 8. Modelo de selección embrionaria según riesgo de aneuploidía (89).

Más recientemente y partiendo también de la hipótesis que los embriones cromosómicamente normales y anormales tienen diferente comportamiento cinético, Basile y colaboradores (101) proponen con base en el análisis de 504 embriones biopsiados para PGS, un modelo de clasificación establecido según la probabilidad de normalidad cromosómica. Las variables morfocinéticas más significativas fueron $t5-t2 (>20,5h)$ y $cc3=t5-t3 (11,7-18,2h)$; Figura 9).

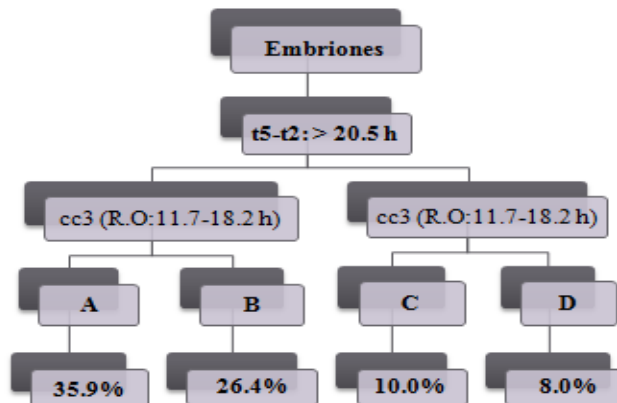


Figura 9. Modelo de selección según probabilidad de euploidía embrionaria (101).

- **Morfocinética e implantación.**

El primer modelo de clasificación jerárquica en el que se combinan los conceptos de morfocinética y potencial de implantación embrionaria, fue propuesto por

Meseguer y colaboradores (77) a partir del análisis de 247 embriones transferidos en D3 y en el que se identificaron las variables t_5 , s_2 (t_4-t_3) y cc_2 (t_3-t_2) como aquellas variables con mayor valor predictivo, definiendo así sus rangos óptimos de tiempo (Figura 10).

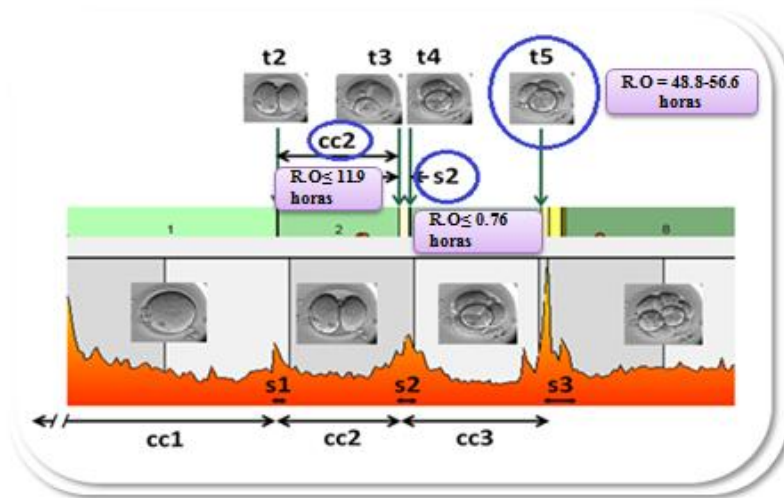


Figura 10. Intervalos de tiempo determinados mediante tecnología de *time-lapse*. Tiempo para la división de los embriones a 5 células (t_5), la duración de la transición de un embrión de dos células a cuatro ($s_2=t_4-t_3$) y la duración del segundo ciclo celular ($cc_2=t_3-t_2$). (77)

El modelo jerárquico propuesto se fundamenta en seis categorías (Figura 11) en el que el punto de partida consiste en descartar los embriones morfológicamente no viables para transferir (categoría F). Posteriormente, se tienen en cuenta criterios de exclusión como: asimetría en el estadio de dos células, división directa de cigoto a embrión de tres células y/o multinucleación en cuatro células (categoría E). Las categorías posteriores se fundamentan en una estricta graduación basada en los tiempos de las variables t_5 , s_2 y cc_2 . En primer lugar, si los valores de t_5 están dentro de su rango óptimo, el embrión se clasifica como A o B y si están fuera se clasifican como C o D. Además si el tiempo para s_2 se encuentra dentro del rango óptimo el embrión es A o C dependiendo del valor de t_5 y si el valor de s_2 está fuera del rango óptimo, el

INTRODUCCIÓN

embrión es B o D según t5. Finalmente, el embrión es categorizado con un valor adicional positivo (+) si $cc2 \leq 11.9$ horas (A+/B+/C+/D+) o negativo (-) si $cc2 > 11.9$ horas (A-/B-/C-/D-). Los porcentajes de implantación obtenidos fueron: 52%, 27%, 19%, 14% y 8% para A+, B+, C+, D+ y E respectivamente.

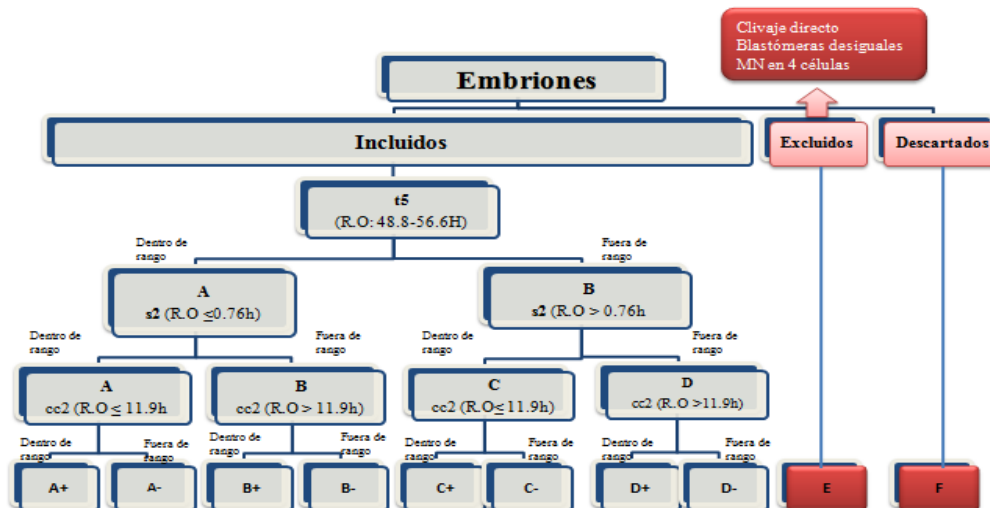


Figura 11. Modelo de selección jerárquica de embriones basado en criterios de inclusión y exclusión por Meseguer *et al.*, (2011). Los tiempos son expresados en horas post-ICSI.

Un resultado similar fue obtenido por Cruz y colaboradores en el que mediante el análisis de 834 embriones identificaron igualmente a t5 y s2 como las variables morfocinéticas más importantes, permitiendo la subdivisión de los embriones en cuatro categorías de la A a la D, en orden decreciente según porcentaje de implantación (98).

Posteriormente y, tomando como base este algoritmo publicado por Meseguer y colaboradores, el grupo de Basile publica otra versión de éste (102), obtenido del estudio prospectivo randomizado multicéntrico de 754 embriones en el que identifican a t3 como el parámetro más efectivo para identificar el/los embriones que implantan vs embriones que no implantan dentro de una cohorte. La variable t3 es además suplementada por cc2 y t5 en combinación con la morfología y los criterios de exclusión previamente considerados (Figura 12).

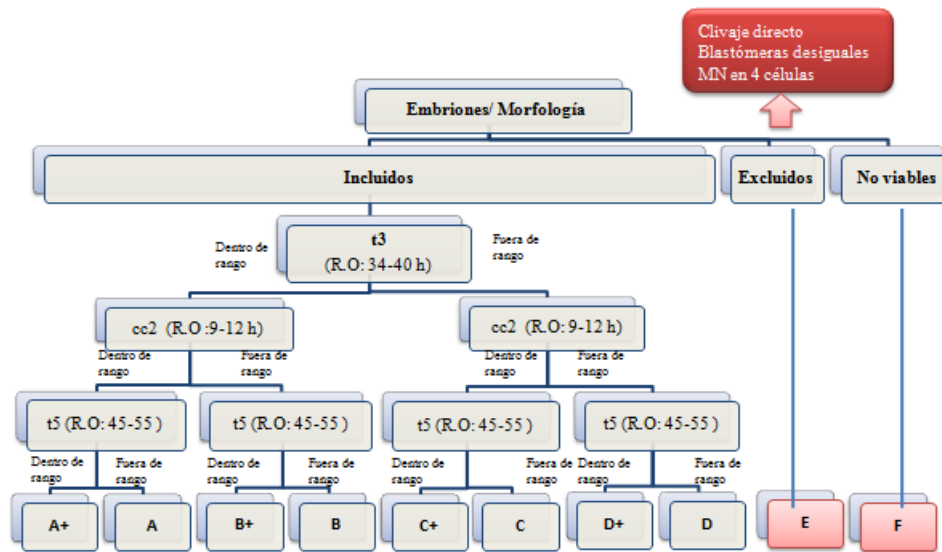


Figura 12. Modelo de selección jerárquica de embriones basado en criterios de inclusión y exclusión de Basile *et al.*, (102).

Posteriormente, y a fin de evaluar el valor predictivo de este nuevo algoritmo, se aplicó en la selección de un grupo diferente de embriones obtenidos de 885 ciclos, considerando sólo los que presentaron implantación conocida (n=1122) es decir, 100% o 0% según el número de embriones transferidos. Así A+, B+, C+, D+ y E presentan una tasa de implantación de: 32%, 28%, 26%, 20% y 17% respectivamente.

Finalmente, Freour y colaboradores (103) proponen un nuevo modelo de clasificación en base a la información recopilada de 191 embriones con tasas de implantación conocida (160 implantados y 31 no implantados) procedentes de pacientes fumadores y no fumadoras, en el que identificaron a t4 y s3 como las variables morfocinéticas más relevantes con significativamente mayor porcentaje de implantación en los dos primeros cuartiles comparados con los dos cuartiles finales (32.3% vs 18.1% para t4 y 32.1% vs 15% para S₃) generando cuatro categorías: A+, A-, B+ y B- con 38.7%, 33.3%, 30.7% y 15.3% respectivamente.

INTRODUCCIÓN

- *Morfocinética y género embrionario.*

Aunque actualmente existe controversia algunos autores han informado que el sexo del embrión podría tener un efecto sobre el desarrollo en mamíferos (ratón), ovinos y bovinos, siendo más rápido en los embriones masculinos comparados con los femeninos (104). Sin embargo, otros autores no han encontrado ninguna relación (105). Con respecto al desarrollo de embriones humanos, también se han llevado a cabo algunos estudios principalmente con evaluación morfológica estática tratando de encontrar una correlación entre el sexo y su desarrollo, generándose debate. Algunos autores han observado un desarrollo más rápido en los embriones masculinos así como mejor morfología (106) mientras que otros autores no han encontrado ninguna relación (107). Pese a ello, el grupo de Bronet y colaboradores (108), mediante el análisis por *time-lapse* de 421 embriones pertenecientes al programa de screening genético para aneuploidías y a través del estudio mediante regresión logística, identificaron a s_2 y tM como las variables más relevantes relacionadas con el sexo del embrión, creando un modelo de selección jerárquica que clasifica los embriones en cuatro categorías basado en la probabilidad de obtener un embrión femenino (108); Figura 13.

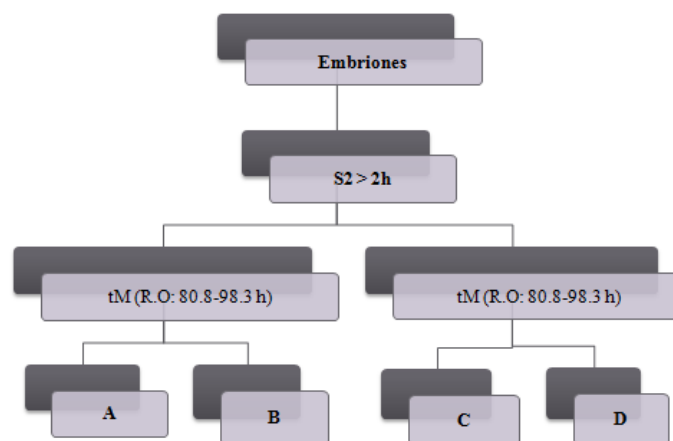


Figura 13. Modelo de selección jerárquica de embriones según su género (108).

Así, la incorporación de la tecnología de *time-lapse* ha suministrado información exacta sobre el desarrollo de los embriones, percibiéndolos desde un punto de vista dinámico, permitiendo su evaluación, determinado con exactitud la duración de los primeros ciclos celulares, la simetría entre las células (76), el tiempo transcurrido entre dos divisiones celulares consecutivas, la identificación de fenómenos novedosos entre los que se encuentra la reabsorción de los fragmentos (86) y la presencia de división directa (79). Por ello, esta tecnología es considerada una herramienta segura en los laboratorios de fecundación *in vitro*, debido principalmente a que la observación y el escrutinio de los embriones no ejerce un efecto negativo sobre ellos (96,109-111).

INTRODUCCIÓN

2.

OBJETIVOS.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal.

Identificar mediante morfocinética los eventos más determinantes dentro del desarrollo embrionario que permitan predecir la formación del blastocisto, comprobar su capacidad para predecir el potencial implantatorio y con ello seleccionar el embrión más competente a transferir.

2.2. Objetivos Específicos.

1. Introducir un nuevo método cuantitativo para la evaluación de la calidad embrionaria en cultivo prolongado (estadio de blastocisto) y compararla con los criterios morfológicos convencionales.

2. Explorar nuevas variables relacionadas con la duración del segundo y tercer ciclo celular (cc).

OBJETIVOS

3.

***MATERIALES Y
MÉTODOS.***

3.1. Diseño del estudio.

El comité ético de investigación clínica del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) Valencia aprobó este estudio retrospectivo (Código 1404-VLC-014-YM) que cumple con las leyes gubernamentales españolas de tecnología de Reproducción asistida (14/2006).

Este trabajo consta de cuatro partes perfectamente diferenciadas en las que se plantean distintos objetivos.



La población sujeta a estudio está formada por embriones cultivados hasta día 5 (D5) de desarrollo en el sistema de *time-lapse* EmbryoScope™ para su selección y posterior transferencia, procedentes de parejas infértiles que se sometieron a su primer ciclo de ICSI. En conjunto, registramos el desarrollo embrionario de 7483 cigotos procedentes de 990 parejas (627 ciclos con donante y 363 ciclos autólogos) entre Mayo de 2010 y Mayo de 2014 en las que se incluyen las fases 1 y 2 del estudio. Para la fase 3

MATERIALES Y MÉTODOS

empleamos 328 ciclos entre mayo 2013 y Mayo 2014 y finalmente, la fase 4 del estudio está desarrollada sobre los mismos ciclos de la fase 1 y 2 con nuevos análisis en profundidad.

Se consideran las donantes de óvulos pertenecientes al programa de donación de ovocitos del IVI(112,113) y las receptoras (que recibirán los embriones originados a partir de estos óvulos).

Al principio de esta sección se describirán los materiales y métodos comunes a todos los estudios realizados para luego pasar a detallar las variables y grupos de estudio de cada uno de ellos.

3.1.1. Donación de ovocitos.

La donación de ovocitos es una opción dentro de las TRA que facilita el estudio de las variables externas que pueden afectar los resultados de estos tratamientos ya que por una parte permite estandarizar las características de la población de estudio, reduciendo la variabilidad en la calidad ovocitaria así como en la receptividad endometrial afectada por los protocolos de estimulación ovárica controlada (114) y por otra parte, suministra objetividad a la hora de valorar la morfocinética embrionaria.

3.1.2. Criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión de las donantes en el programa de donación de ovocitos están basados en una serie de características que incluyen la edad, comprendida entre 18 y 35 años según la legislación actual; ciclos regulares de menstruación con una duración entre 26-34 días, índice de masa corporal (IMC) entre 18-28 kg/m² (115) buen estado

tanto psicológico como físico, carencia de antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias, esquizofrenia, depresión, epilepsia, alcoholismo, entre otros y no haber sido sometida a tratamientos endocrinos o anticonceptivos orales tres meses previos al estudio. Así mismo, presentar cariotipo normal (112), serologías negativas para HIV, citomegalovirus, hepatitis B y C y tener útero y ovarios normales a la valoración ecográfica con un recuento de folículos antrales cercano a 20 el primer día de la estimulación con gonadotropinas después de la desensibilización hipofisaria con el análogo de la GnRH. Una vez evaluados estos parámetros, se selecciona la donante con mayor similitud fenotípica e inmunológica (Grupo sanguíneo y Rh) con la posible receptora y su entorno familiar.

Todas las donantes de ovocitos fueron informadas respecto al tratamiento de fecundación *in vitro*, posibles complicaciones, y aspectos legales de su donación. Las que estuvieron de acuerdo, firmaron el debido consentimiento informado entregado por el centro y formaron parte del programa de donación de ovocitos.

Los criterios de exclusión con respecto a este estudio fueron: baja respuesta (menos de cinco ovocitos en metafase II), endometriosis, síndrome de ovario poliquístico (SOP), hidrosalpinx, IMC > 30kg/m², endocrinopatías, trombofilia, patologías crónicas, adquirida o anormalidades uterinas congénitas, pérdida recurrente de embarazo, edad materna superior a 45 años, factor masculino severo (< 1x10⁶ espermatozoides en muestra total).

3.1.3. Estimulación ovárica (Donantes y pacientes).

La finalidad de los protocolos de estimulación ovárica es generar una respuesta supra fisiológica, en la que se aumenta el número de ovocitos aspirados y como

MATERIALES Y MÉTODOS

consecuencia, el número de embriones disponibles a seleccionar para transferir; evitar los picos espontáneos y prematuros de hormona luteinizante (LH) e inducir la maduración folicular, mediante la administración tanto de análogos de la GnRH como de gonadotropinas.

Las donantes y las receptoras iniciaron las píldoras anticonceptivas sobre el día 1-2 del inicio de la menstruación del ciclo anterior y continuaron durante 12-16 días, 5 días después de suspender las píldoras, recibieron una dosis inicial de FSH recombinante (Gonal-F®; Serono, Madrid, España; Puregon®; MSD, Madrid, España) con una dosis que oscilaba entre 150 a 225 UI. Aproximadamente en el día 5 o 6 de iniciar la FSH fue administrado el antagonista de la GnRH (0.25 mg Ganirelix, Orgalutran, Organon) hasta la administración del análogo de la GnRH (Decapeptil, IPSEN Pharma) día en el que al menos 3 folículos presentaron un diámetro mayor o igual de 18 mm, con la finalidad de desencadenar la ovulación (93).

3.1.4. Punción ovárica y recuperación de ovocitos.

La recuperación de los ovocitos es realizada con sedación, en condiciones asépticas, 36 horas después de la administración de la hCG, bajo guía ecográfica y con aguja de punción ovárica 19G (Kitazato Medical, Tokio, Japón) con la cual, se puncionan los folículos uno a uno aspirando el contenido y vertiendo el mismo en tubos determinados para su recogida (Falcon 2057, BectonDickinson, Reino Unido) que previamente se han mantenido a 37°C en bloques térmicos calefactados. El contenido del líquido folicular es vertido en placas petri precalentadas para la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito. Una vez localizados, son aspirados con una pipeta

Pasteur y depositados en un placa en la que son lavados y que contiene Gamete Medium (COOK™, Sydney, Australia). En caso de que el ovocito se encuentre adherido a un coágulo de sangre, se procede a eliminarlo con la ayuda de agujas y jeringas de insulina. Después de lavados, los ovocitos rodeados por las células de la granulosa, son cultivados individualmente en gotas de 50 µL de Fertilization Medium (Cleavage Medium, COOK™, Sydney, Australia) a 5.5% de CO₂ y 37°C durante 4 horas antes del proceso de decumulación.

La decumulación de los ovocitos, consiste en la eliminación de las células que lo rodean mediante acción mecánica con pipeta Pasteur y la utilización de 40 IU/ml de la enzima hialuronidasa en proporción 1:1 con el medio de cultivo que los contiene, durante 20-30 segundos; es importante realizarla por dos aspectos: en primer lugar, permite comprobar el grado de madurez (MI, MII o VG) que presentan los ovocitos y en segundo lugar, para poder realizar la microinyección espermática.

3.1.5. Preparación endometrial de receptoras de ovocitos/embriones.

El objetivo del tratamiento sustitutivo en la receptora de ovocitos es lograr la maduración normal del endometrio mediante el suministro de manera exógena, de estrógenos que promueven la proliferación endometrial y de progesterona que inducen la transformación secretora del endometrio generando así un ambiente óptimo para la implantación embrionaria y el mantenimiento de los estadios iniciales de la gestación (116).

MATERIALES Y MÉTODOS

La edad de las pacientes incluidas en el estudio oscila entre 32 y 45 años y aquéllas con función ovárica activa fueron desensibilizadas con una única administración intramuscular de Triptorelina 3.75 mg "depot." (Decapeptyl 3.75 mg; Ipsen-Pharma, Barcelona, España) administrada entre los días 18 y 21 del ciclo previo. La sustitución de estrógenos fue iniciada en el día 3-5 del nuevo ciclo de menstruación, después de confirmar la quiescencia ovárica y un determinado grosor endometrial mediante ecografía transvaginal (117). Durante los 8 primeros días, se administraron 2 mg/día de valerianato de Estradiol (VE; Progynova; Schering, Madrid, Spain), posteriormente fue incrementado a 4 mg/día durante los 3 días siguientes y finalmente, fue aumentada la dosis a 6 mg/día hasta el momento del test de embarazo. Al comprobar la fecundación, las pacientes iniciaron la administración de progesterona (P4) micronizada por vía vaginal (Progeffik, LaboratoriesEffik S.A., Madrid, Spain), con una dosis diaria de 800 mg/día, continuando con esta dosis al menos hasta el resultado del embarazo (118,118,118). Si la paciente no presenta función ovárica, se omite la administración del antagonista de la GnRH, siguiendo el protocolo tal y como ha sido descrito anteriormente.

Si el test de embarazo es positivo, se mantiene el VE y la P4 con las mismas dosis hasta la semana 12 de gestación (119).

La tasa de embarazo clínico fue confirmada por ecografía mediante visualización de saco gestacional con latido cardíaco fetal después de 7 semanas de embarazo.

3.1.6. Obtención, procesamiento de la muestra seminal e ICSI.

La muestra seminal utilizada para la ICSI es obtenida mediante masturbación; en algunos de los casos previamente ha sido congelada y en otros, fresca o recogida el

mismo día del procedimiento. En ambas situaciones es analizada según los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (120) en el que se incluye:

➤ **Examen microscópico.**

Durante el estudio microscópico inicial de la muestra de semen se estima la concentración, movilidad y aglutinación, así como la presencia de otros elementos celulares como leucocitos o células germinales inmaduras para lo cual, se deposita una gota de 10 μ l de la muestra sobre una Cámara Makler (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) cubierta con un cubre objeto de cristal. La preparación es examinada a un aumento de 20x y se determina:

- **Movilidad:** es el primer aspecto a analizar y por tanto, debe ser estudiada lo antes posible. Se realiza solamente a los espermatozoides libres y nunca a los que se encuentran agregados entre sí, o a otras células. El recuento de espermatozoides móviles e inmóviles se realiza en varios campos seleccionados al azar de la Cámara Makler contando al menos 100 espermatozoides y expresado en porcentaje. Primero se deben contar aquéllos con movilidad progresiva (rápida y lenta) dentro de un área determinada, y a continuación se cuentan los móviles no progresivos y los inmóviles dentro del mismo campo o área (Figura 14).

MATERIALES Y MÉTODOS

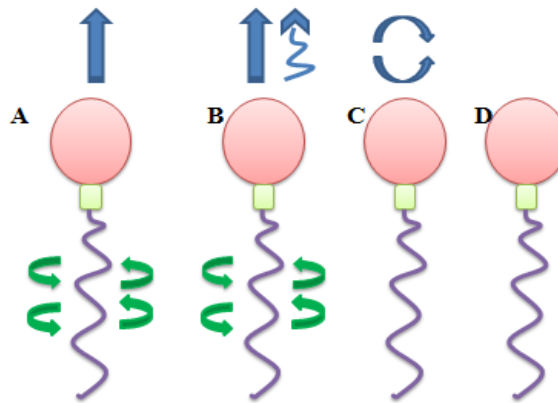


Figura 14. Tipos de motilidad espermática. **A** : Móviles progresivos rápidos: se desplazan de forma rectilínea y rápida **B**: Móviles progresivos lentos: se desplazan más lentamente, de forma rectilínea o curva. **C**: Móviles no progresivos: giran sobre su mismo eje, no se desplazan. **D**: Inmóviles: no se mueven.

- **Concentración:** la determinación exacta de la concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mililitro de semen) y su cantidad total (millones de espermatozoides por eyaculado) son de gran importancia para evaluar la calidad de una muestra seminal. Su valor de referencia se encuentra por encima de 20 millones/ml y si es menor, la muestra se clasifica como:

- ✓ Oligozoospermica moderada: entre 10 y 20 millones/mL.
- ✓ Oligozoospermica severa: entre 0,1 y 10 millones/mL.
- ✓ Criptozoospermica: menos de 0,1 millones/mL.
- ✓ Azoospermica: no existen espermatozoides en el eyaculado.

➤ **Capacitación.**

La capacitación espermática consiste en eliminar el plasma seminal del eyaculado y seleccionar los espermatozoides viables con mejor movilidad. Para las muestras congeladas se utiliza el protocolo de centrifugación en *gradientes de densidad* basada en la capacidad que tienen los espermatozoides de atravesar los gradientes (90% y 45%)

hacia el fondo del tubo de ensayo (121,121) y para las muestras frescas la técnica de “swim up” que consiste en el desplazamiento ascendente de los espermatozoides móviles con mejores características (122), Figura 15.

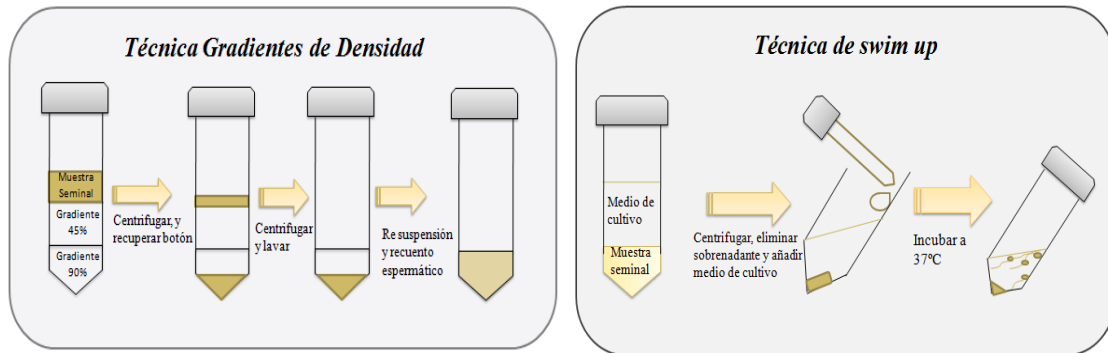


Figura 15. Esquema del proceso de selección espermática mediante técnicas de gradientes de densidad y de Swim-up.

➤ **ICSI.**

Para el ICSI se utilizan placas de microinyección con microgotas de un medio de cultivo con HEPES (Gamete Medium, COOK™, Sydney, Australia) para cada uno de los ovocitos a microinyectar y gotas de Polivinil-polirridona (PVP) cubiertos con aceite mineral testado para embriones. El PVP se utiliza para disminuir la movilidad espermática facilitando su manipulación y captura, ayuda al control del fluido en la aguja de inyección y evita que los espermatozoides se queden adheridos a la pipeta. Posteriormente se añade 1-3 µl del capacitado espermático.

Para el proceso de microinyección se emplea un microscopio invertido con óptica Hoffman (IX7 Olympus) en 400x de magnificación con platina calefactada y un equipo de micromanipulación; con la pipeta de sujeción (Precision Holding PipetteCOOK™, Sydney, Australia), se mantiene fijo al ovocito mientras que con la pipeta de inyección

MATERIALES Y MÉTODOS

(Precision Microinjection Pipette COOK™, Sydney, Australia) se aspira el espermatozoide morfológicamente normal que será microinyectado.

3.1.7. Cultivo embrionario en sistema de *time-Lapse EmbryoScope™*.

El EmbryoScope™ (UnisenseFertiliTech A/S, Aarhus, Denmark) es un incubador con un sistema incorporado para la captura de imágenes, cada 15 minutos, en 7 planos focales y de forma automática. Está conformado por una cámara CCD monocroma, un dispositivo Leica 20x con un objetivo de contraste de óptica Hoffmann LWD 0.40, iluminación tipo LED de 635 nm con el que logra una exposición diaria de los embriones a la luz inferior a 50 segundos (entre 15 y 30 ms por imagen) minimizando el riesgo de la foto-oxidación embrionaria y un software conocido como EmbryoViewer (EV) o estación de trabajo (UnisenseFertiliTechA /S, Aarhus, Dinamarca). Éste registra gráfica y automáticamente los movimientos o la *actividad blastomérica* producida entre dos imágenes consecutivas de la filmación que normalmente coincide con las divisiones del embrión. Así mismo, cuenta con un conjunto de aplicaciones que permite el registro de datos para cada embrión (multinucleación, simetría, fragmentación, división directa), la identificación de la paciente mediante número de historia clínica, protocolo u otros y controla las condiciones de cultivo relacionadas con el CO₂ y la temperatura (Ver Figura 16).



Figura 16. Sistema de *time-lapse EmbryoScope™*

Para el seguimiento embrionario requiere de placas EmbryoSlide[®] que constan de 12 pocillos individualizados con una depresión central de 250 μm o micropocillo donde se cultiva el ovocito/embrión y que coincide con la posición de la cámara en el EmbryoScope[™]. Cada micropocillo tiene asignado un número lo que facilita la monitorización embrionaria y la manipulación fuera del incubador.

Así pues, el EmbryoScope[™] funciona como un incubador clásico que admite la incubación simultánea de hasta 72 embriones distribuidos en 6 placas, pero con la ventaja añadida de visualizar en tiempo real un conjunto de parámetros fundamentales del desarrollo embrionario sin necesidad de manipular a los embriones fuera del incubador (77) Figura 17.



Figura 17. Selección embrionaria a través de *time-lapse* EmbryoScope[™] desde el momento posterior a la ICSI hasta su evaluación final previo a la transferencia.

Finalmente, una vez realizado el ICSI, los ovocitos microinyectados son puestos en las placas EmbryoSlide[®] (UnisenseFertiliTech, Aarhus, Denmark) con medio de cultivo pre-equilibrado Cleavage Medium (Cook[™], Sydney, Australia) cubierto con 1,2 mL de aceite mineral y colocados en el EmbryoScope[™] (UnisenseFertiliTech A/S,

MATERIALES Y MÉTODOS

Aarhus, Denmark) en condiciones estables de cultivo (37°C y 5.5% de CO₂) hasta día 3 de desarrollo (72 horas post-ICSI) en el que se cambia el medio por CCM™ Medium (Vitrolife, Göteborg, Sweden) hasta el día 5 de desarrollo (120 horas post-ICSI).

3.1.7.1. Análisis del desarrollo embrionario en EmbryoScope™.

Mediante las imágenes digitales obtenidas, es evaluado en primera instancia el éxito de la fecundación entre las 16 y 19 horas post-ICSI. Así mismo la morfología embrionaria en los días 2 (48 horas post-ICSI) y 3 (72 horas después de la ICSI) teniendo en cuenta el número, la simetría y la granularidad de las células, el tipo y porcentaje de fragmentación, la presencia de multinucleación y el grado de compactación según lo describe Alikani y colaboradores (123). Para cada embrión se registran los tiempos en los que fueron completadas las divisiones es decir, la primera imagen en el que las dos células hijas nuevas están completamente segregadas y encerradas por su propia membrana citoplasmática y se presenta como en horas post-ICSI. El registro se realiza desde un embrión de dos células hasta un embrión de 9 células siendo:

- **t2:** tiempo de la división a dos células
- **t3:** tiempo de la división a tres células
- **t4:** tiempo de la división a cuatro células
- **t5:** tiempo de la división a cinco células
- **t6:** tiempo de la división a seis células
- **t7:** tiempo de la división a siete células
- **t8:** tiempo de la división a ocho células
- **t9:** tiempo de la división a nueve células

Además, se registra otra variable, **tM** o tiempo de mórula compacta: que consiste en el momento en el que se observa una masa esférica maciza en la que no se distinguen los contornos celulares y que representa una fase intermedia entre el cigoto y el blastocisto. Posteriormente en Día 5 (120 h post-ICSI) se evalúa la expansión de la cavidad del blastocele y la integridad tanto de la MCI como las células del TE (124) e igualmente se registra:

- **tB:** tiempo de formación de blastocisto en el que es posible distinguir la cavidad blastocélica o cavidad central llena de líquido.
- **tBE:** tiempo de blastocisto expandido.
- **tBH:** tiempo de Blastocisto Eclosionado o hatching (Ver Figura 18).

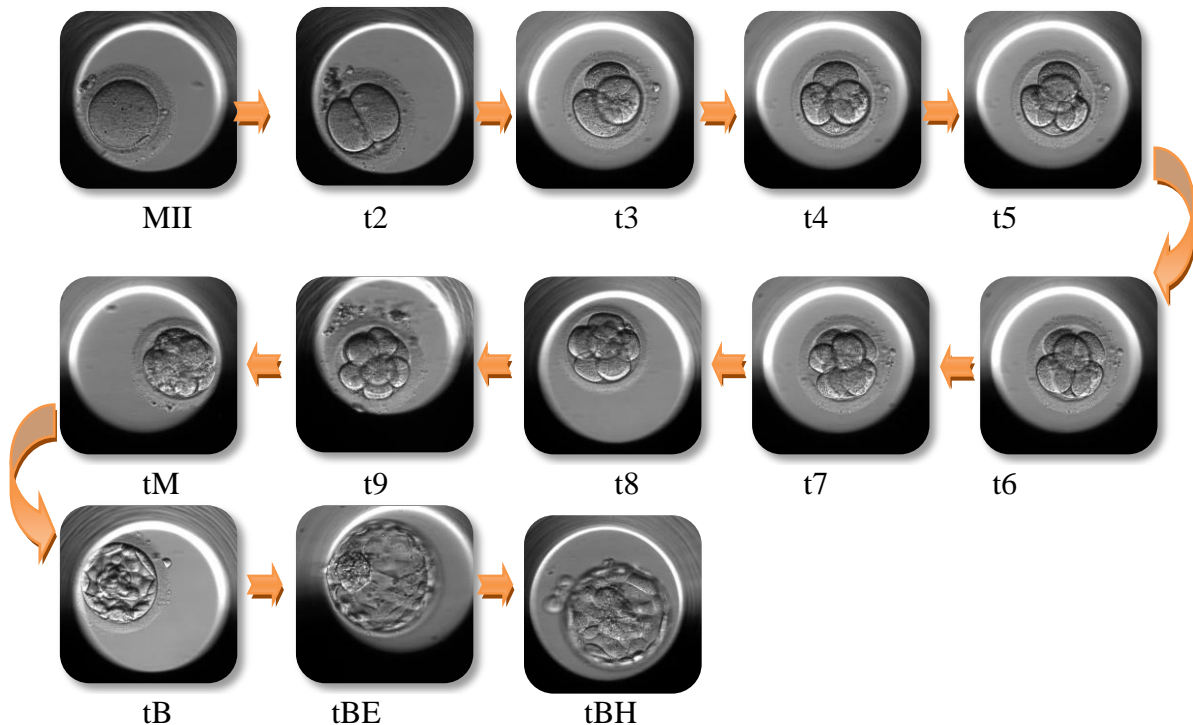


Figura 18. Tiempos de eventos celulares registrados en el EmbryoScope™.

MATERIALES Y MÉTODOS

También se determinaron variables indirectas relacionadas con la duración del segundo ciclo celular definido como la duración del periodo en estadio de 2 células ($cc2 = t3 - t2$), $cc3$ o duración del tercer ciclo celular que comprende el tiempo desde un embrión de tres células hasta un embrión de cinco células ($cc3 = t5 - t3$), $s2$ como la Sincronía en la división de dos a cuatro células ($s2 = t4 - t3$), $s3$ o Sincronía en la división de cuatro a ocho células ($s3 = t8 - t5$) y el intervalo entre dos y cinco células como la variable $t5 - t2$, el cual combina los conceptos de ciclo celular y sincronía (Figura 19).

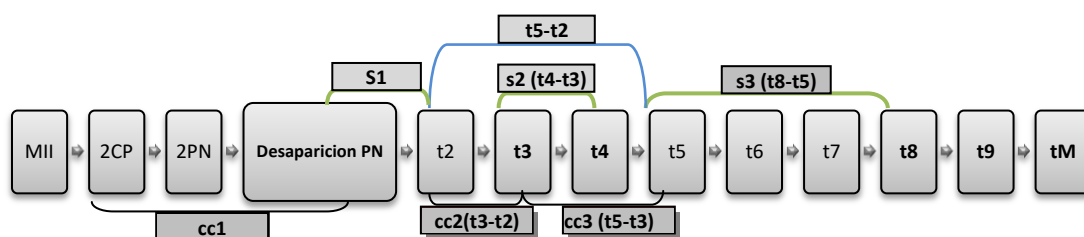


Figura 19. Esquema de variables relacionadas con los ciclos celulares.

3.1.8. Transferencia embrionaria.

La selección de los blastocistos a transferir en D5 se lleva a cabo teniendo en cuenta el modelo de clasificación descrito por Meseguer y colaboradores en 2011(77) para embriones de D3 y las características morfológicas de los blastocistos según los criterios ASEBIR de valoración morfológica de blastocistos humanos (125). En la mayoría de los casos se transfirieron dos blastocistos (*Double Embryo Transfer o DET*), excepto aquéllos que por indicación ginecológica o decisión propia de la paciente sólo se transfiere un blastocisto. En el caso de tener blastocistos sobrantes éstos fueron criopreservados mediante la técnica estándar de vitrificación del IVI para un posible uso futuro.

3.1.9. Determinación de la gestación.

En cualquier caso y siempre y cuando la transferencia embrionaria haya tenido lugar, doce o trece días tras la transferencia embrionaria, las pacientes fueron sometidas a pruebas diagnósticas de embarazo mediante medición cuantitativa de los niveles séricos de β -hCG; considerándose positivo un resultado >10 UI/mL. Cuando un resultado fue positivo, se realizó un segundo test β -hCG y un control ecográfico una semana más tarde. Los controles ecográficos fueron repetidos semanalmente hasta la detección de latido embrionario y desde ahí, se repitieron mensualmente. En los casos de ciclos sustituidos, las dosis de valerianato de estradiol y progesterona intravaginal se continuaron a la misma dosis hasta el día 80 de gestación. En aquellos casos de ciclos naturales, las dosis de progesterona se continuaron hasta la misma fecha.

La viabilidad in vivo de los pre-embriones generados a partir del cultivo *in vitro* se analizó mediante el estudio de los parámetros clínicos, presentados a continuación y definidos por Zegers-Hochschild *et al.*,(126):

Una gestación bioquímica es diagnosticada cuando un test de Embarazo es positivo pero hay una pérdida temprana de embarazo sin llegar a visualizar el saco embrionario.

Una gestación ectópica se define como una gestación fuera de la cavidad uterina, demostrada mediante ecografía o laparoscopia o cuando existe una alta sospecha dados los síntomas y/o el patrón sérico de β -hCG de la paciente.

Una gestación clínica se considera en curso cuando hay evidencias de gestación por medios clínicos o parámetros ecográficos (visualización de saco gestacional). Una gestación clínica incluye también la gestación ectópica.

MATERIALES Y MÉTODOS

La tasa de implantación se define como el porcentaje de sacos gestacionales por número de pre-embryones transferidos.

Un aborto clínico (espontáneo) se define como aquella pérdida gestacional que ocurre antes de la semana 20 de gestación, habiéndose detectado un(os) saco(s) gestacional (es) mediante ecografía.

3.2. Fases del estudio.

Fase 1. Estudio de las variables morfocinéticas y generación de algoritmo para la formación de blastocisto.

Se realiza un estudio retrospectivo de cohortes en el que fueron analizados 7483 cigotos procedentes de 990 parejas en su primer ciclo de ICSI de los cuales 627 formaron parte del programa de donación de ovocitos.

La morfología de los embriones en cultivo se evaluó a las 48-72 horas post-ICSI (hpi) teniendo en cuenta los criterios descritos anteriormente. Los blastocistos se valoraron en día 5 (120 hpi) de acuerdo con la expansión del blastocisto y con las características de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TE). Teniendo en cuenta este sistema de clasificación, se consideraron embriones óptimos o de buena calidad aquella que presentan un trofoectodermo cohesivo con numerosas células mitóticas así como a una masa celular interna con un elevado grado de compactación.

Variables del estudio

Variables independientes: están conformadas por las variables directas que corresponden a los tiempos de división (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9, tM, tB) y por las variables indirectas, (cc2, cc3, s2, s3) analizadas automáticamente mediante el software incorporado en el EmbryoScope™.

Variables dependientes: Formación de blastocisto en día 5 de desarrollo: análisis de la llegada a este estadio y características morfológicas según los criterios de valoración definidos previamente.

Tasa de blastocisto: análisis del porcentaje de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto, blastocistos transferidos, vitrificados y/o descartados de la población inicial de estudio.

Fase 2. Generación de algoritmo de implantación con modelo de llegada a blastocisto.

Los datos para desarrollar el nuevo algoritmo fueron obtenidos a partir de 3215 blastocistos, de los cuales 832 fueron transferidos y presentaron implantación conocida (KID, del inglés, *Known Implantation Data*) es decir, el número de sacos gestacionales corresponde con el número de embriones transferidos 100% o 0% (no gestación).

Variables independientes: que incluye las variables directas que corresponden a los tiempos de división (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9, tM, tB, tBE, tBH) y las variables indirectas, (cc2, cc3, s2, s3) analizadas automáticamente mediante el software incorporado en el EmbryoScope™.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variables dependientes: implantación embrionaria tras transferencia de embriones en el estadio de blastocisto, día 5 de desarrollo.

Tasa de implantación: número de sacos gestacionales en relación al total de embriones transferidos.

Fase 3. Validación del algoritmo para la implantación de blastocistos.

El algoritmo fue validado en 328 ciclos realizados entre mayo de 2013 y mayo de 2014, con 257 blastocistos transferidos que presentaron implantación conocida (KID). La tasa de embarazo clínico fue confirmada a través de ultrasonido por la existencia de latido cardíaco fetal después de 7 semanas de gestación.

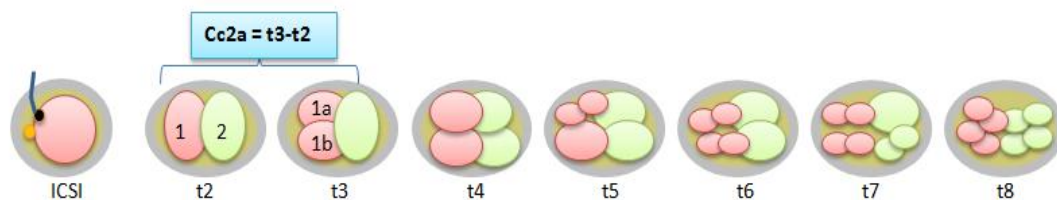
Fase 4. Exploración de nuevas variables del segundo y tercer ciclo celular como predictores de la formación de blastocisto e implantación.

Esta fase final del estudio retrospectivo de cohortes aunque está desarrollada en los mismos ciclos de la fase 1 (990 ciclos), debido a la dificultad de realizar el seguimiento y división celular de algunos embriones por la presencia de fragmentación y/o superposición de las células, fue analizado el desarrollo de un total de 6970 embriones, de los cuales 3107 llegaron hasta el estadio de blastocisto mientras que, 3863 no lo hicieron. Después de la transferencia, los embriones fueron identificados como 100% (donde el número de sacos gestacionales fue igual al número de embriones transferidos) o 0% (no gestación). Los tiempo de división desde dos hasta ocho células (t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8) fueron obtenidos y registrados a partir de imágenes adquiridas por

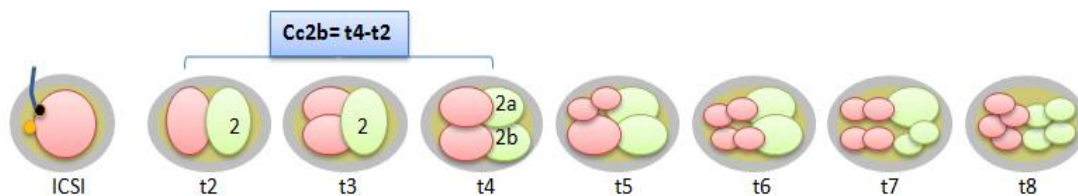
time-lapse y expresados en horas post-ICSI, con el objetivo de estudiar el segundo y tercer ciclo celular y su asociación tanto con la formación del blastocisto como con la implantación.

Las variables indirectas estudiadas con respecto al segundo ciclo celular (**cc2**) fueron:

- **cc2a**: definido como la duración del cc de la célula que primero se divide en un embrión de dos células a uno de tres células.



- **cc2b**: la duración del cc de la célula que se divide en segundo lugar en un embrión de dos células a uno de cuatro.

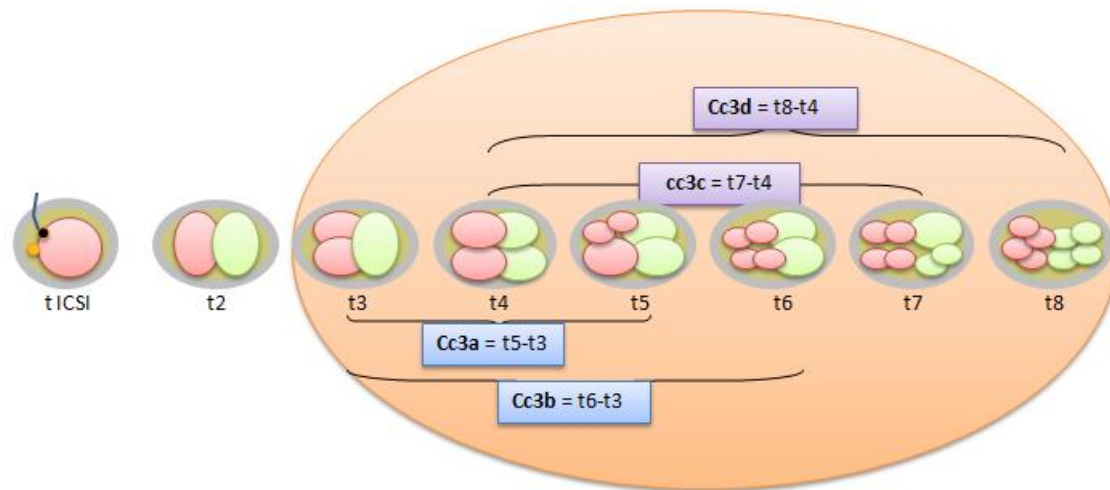


- **Promedio cc2** ($acc2$): $acc2 = (cc2a + cc2b) / 2$
- **Sincronía en división de cc2** ($SR2 = cc2a / cc2b$). Con valores comprendidos entre 0 y 1, donde 1 representa la sincronía absoluta.

2. Las variables analizadas y que corresponden al tercer ciclo celular (**cc3**) fueron:

cc3 a, b, c, d: la duración del tercer ciclo celular de las células que se dividen en primer, segundo, tercer y cuarto lugar respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS



- **Promedio cc3 (acc3):** $acc3 = (cc3a + cc3b + cc3c + cc3d) / 4$
- Sincronía en las divisiones en cc3 ($SR3 = acc3 / (t8 - t3)$). Con valores comprendidos entre 0 y 1, donde 1 representa la sincronía absoluta.

Variables independientes: incluye las variables directas (tiempo de división celular) y las variables indirectas (cc2a, cc2b, acc2, SR2, cc3a, b, c y d, acc3, SR3) analizadas automáticamente mediante el software incorporado en el EmbryoScope™.

Variables dependientes: Formación de blastocisto en día 5 de desarrollo e implantación.

3.3. Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron de forma retrospectiva, para describir la distribución de probabilidades relacionada con este estadio de desarrollo e implantación, los datos cinéticos fueron convertidos de variables continuas a variables categóricas así el parámetro de respuesta binaria fue “1” para los embriones que alcanzaron la etapa de

blastocisto o "0" para aquellos que no lo hicieron y " 1 " para la presencia de saco (s) gestacional (es) (blastocisto implantado) o " 0 " en ausencia de saco (s) gestacional (s), según la fase del estudio.

Mediante el modelo estadístico de regresión logística (Método hacia adelante: Razón de verosimilitud) se seleccionaron las variables más relevantes, tomando como punto de partida si los embriones cultivados en el EmbryoScopeTM alcanzaron o no el estadio de blastocisto en el Día 5 de desarrollo, y si logran implantar o no, según la fase del estudio.

Al ordenar los datos, éstos se dividieron en cuartiles, es decir, en intervalos que generan cuatro partes porcentualmente iguales y nos informaron de la posición (en tanto por cien) que ocupa cada variable de interés respecto del conjunto de variables y con la cual, se evitan los sesgos introducidos por valores extremos. A continuación, fue calculado el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto así como aquéllos que implantaron para cada tiempo del cuartil lo que permite evaluar la distribución de la formación de blastocisto y del potencial de implantación en las diferentes categorías. La prueba χ^2 fue utilizada para comparar entre los datos categóricos. Posteriormente, para cada variable se definió un rango óptimo basado en los dos cuartiles con el mayor porcentaje de formación de blastocisto e implantación. Se consideró la presencia de significación estadística cuando el valor de $p \leq 0,05$.

En el análisis de regresión, las variables binarias fueron estudiadas por ordenador mediante el método de probabilidad, y aquellos con $P > 0,05$ no fueron considerados en el modelo final. El efecto de la odd ratio (OR) para todas las variables generadas sobre la

MATERIALES Y MÉTODOS

formación de blastocisto o implantación fueron expresadas en términos de 95% de intervalo de confianza (IC 95%) y significancia. Las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) fueron empleadas para evaluar el valor predictivo de todas las variables incluidas en las tres primeras fases del estudio. Las curvas ROC proporcionan un área bajo la curva o AUC (Area Under Curve) que está comprendida entre 0,5 y 1 y puede ser interpretada como una medida de la capacidad de clasificación del modelo. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico para las Ciencias Sociales 19 (SPSS inc., Chicago, IL).



4. *RESULTADOS.*

RESULTADOS

Fase 1. Resultados del análisis embrionario en la identificación de eventos morfológicos que predicen la llegada al estadio de blastocisto. Generación de algoritmo.

En esta primera fase del estudio y utilizando el EmbryoScope™ como sistema de *time lapse*, analizamos las imágenes adquiridas cada 15 minutos a lo largo de 120 horas de 7483 cigotos e identificamos dos grupos como punto de partida. El **Grupo 1** formado por los embriones que se desarrollan hasta blastocisto (n=3215) con una tasa de llegada a blastocisto 42.6% y el **Grupo 2** constituido por los embriones que no alcanzan el estadio de blastocisto (n=4268) y representan el 57.4 % de todos los embriones cultivados (Figura 20). En esta población estudiada la edad de las donantes está comprendida entre 18-35 años y la de las pacientes con ovocitos propios entre 32-45 años.

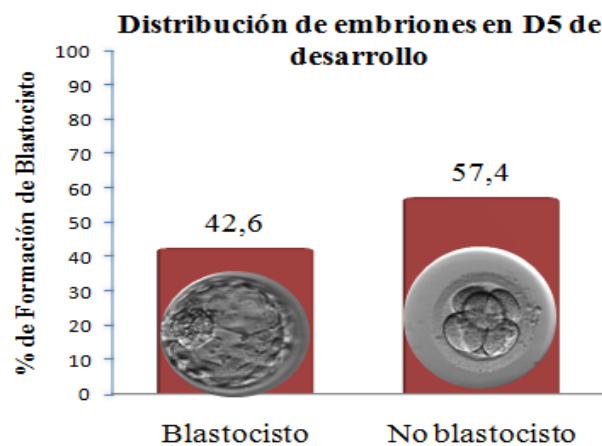


Figura 20. Distribución de los embriones analizados con base en el estadio de blastocisto y no blastocisto en día 5 de desarrollo.

RESULTADOS

Variable morfocinética	Tiempos observados en time lapse		Número de no blastocistos	Total	Valor de P
	Formación de blastocisto	No formación de blastocisto			
t2 (h)	27,23 ± 0,2	28,78± 0,2	4268	7483	< 0.05
t3 (h)	37,77 ± 0,2	38,46± 0,2	4191	7406	< 0.05
t4 (h)	39,54 ± 0,2	41,5± 0,2	3997	7212	< 0.05
t5 (h)	51,37 ± 0,2	51,13± 0,3	3941	7156	0.318
t6 (h)	54,15 ± 0,3	55,22± 0,3	3568	6783	< 0.05
t7 (h)	57,07 ± 0,3	59,34± 0,4	3417	6632	< 0.05
t8 (h)	60,96 ± 0,4	63,07± 0,5	1948	5193	< 0.05
t9 (h)	71,68 ± 0,4	72,14± 0,8	278	3493	0.286
tM (h)	87,60 ± 0,3	91,79± 0,9	112	3327	< 0.05
cc2=t3-t2 (h)	10,54 ± 0,1	9,82± 0,2	4191	7406	< 0.05
cc3=t5-t3 (h)	13,62 ± 0,2	13,41± 0,3	3941	7156	0.219
s2=t4-t3 (h)	1,78 ± 0,1	3,30± 0,2	3997	7212	< 0.05
s3=t8-t5 (h)	10,27 ± 0,3	13,73± 0,4	1948	5193	< 0.05
t5-t2 (h)	24,15 ± 0,3	22,97± 0,3	3941	7156	< 0.05

Tabla 2. Media de los tiempos embrionarios analizados mediante time-lapse hasta estadio de blastocisto.

En la tabla 2 se observa que en el Grupo 1, la mayoría de las divisiones desde t2 hasta el estadio de mórula (tM) ocurren antes que en los embriones del Grupo 2 con una diferencia estadísticamente significativa excepto para t5 y t9, donde no se observaron diferencias entre grupos.

Con respecto a la duración de los ciclos celulares, se observa una duración del segundo ciclo celular (cc2) más prolongado en el grupo 1 respecto al grupo 2; mientras que la duración de cc3 fue comparable entre ambos grupos. Por lo que respecta a la sincronía de las divisiones, la sincronía del segundo y tercer ciclo celular fueron claramente mas cortas en los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto (Grupo 1) en comparación con la observada en aquellos embriones que no alcanzaron el estadio de blastocisto (grupo 2) . En referencia al intervalo de tiempo que discurre entre dos y cinco células (t5-t2) se observa una duración significativamente mayor en los embriones que llegan hasta blastocisto cuando se compara con aquéllos que no alcanzan tal estadio.

Así pues y centrándonos en los embriones que se desarrollan a blastocisto, ordenamos los tiempos de cada variable en cuatro partes o cuartiles (Q1, Q2, Q3 y Q4) con el objetivo de estudiar su dispersión y establecer la proporción de blastocistos obtenidos en cada uno de ellos, expresado en porcentaje (% B). En este análisis fue posible evidenciar los dos cuartiles consecutivos dentro de cada variable con mayor número de blastocistos en D5, identificándose el rango óptimo de cada uno de ellos. Así por ejemplo, para t3 el rango óptimo corresponde a Q2 y Q3 que abarca desde 34,27 horas hasta 41,22 horas post-ICSI (Tabla 3).

Estadio del ciclo celular	Q1		Q2		Q3		Q4	
	limite	%B (n)	limite	%B (n)	limite	%B (n)	limite	%B (n)
t2 (h)	≤ 24,56	51.9 (976)	24,57-26,66	48.3% (902)	26,67 – 29,48	43.4% (812)	>29,49	28.1% (525)
t3 (h)	≤ 34,26	38.7% (711)	34,27 – 37,61	55.20% (1.015)	37,62 – 41,22	48.1% (882)	>41,23	33.1% (607)
t4 (h)	≤ 36,32	48.3% (873)	36,33 – 39,45	53.2% (956)	39,46 – 43,38	47.5% (857)	>43,39	29.3% (528)
t5 (h)	≤ 45,28	31.7% (591)	45,29-50,88	51.8% (975)	50,89-56,29	49.8% (938)	>56,30	38.2% (711)
t6 (h)	≤ 49,08	40.0% (752)	49,09-53,74	49.5% (929)	53,75-59,06	47.6% (882)	>59,07	34.7% (652)
t7 (h)	≤ 51,60	45.5% (852)	51,61-56,59	46.9% (878)	56,60-62,83	44.8% (837)	>62,84	34.7% (6489)
t8 (h)	≤ 53,98	46.1% (863)	53,99-59,83	44.3% (829)	59,84-67,20	41.0% (767)	>67,21	40.4% (756)
t9 (h)	≤ 63,60	38.9% (728)	63,61-70,26	43.1% (807)	70,27-79,01	49.2% (921)	>79,02	40.6% (759)
tM (h)	≤ 81,27	44.2% (827)	81,28-88,95	44.9% (771)	88,96-96,00	47.0% (951)	>96,01	35.6% (666)
cc2=t3-t2 (h)	≤ 9,75	31.3% (575)	9,76-11,51	55.7% (1045)	11,52-12,72	54.1% (972)	>12,73	33.9% (623)
cc3=t5-t3 (h)	≤ 11,34	35.5% (656)	11,35-13,90	50.2% (924)	13,91-16,49	49.8% (932)	>16,50	37.6% (703)
s2=t4-t3 (h)	≤ 0,25	48.8% (963)	0,26-0,89	47.7% (779)	0,90-2,33	48.9% (913)	>2,34	32.2% (559)
s3=t8-t5 (h)	≤ 3,75	50.1% (943)	3,76-8,78	46.8% (871)	8,79-18,00	38.3% (716)	>18,01	36.6% (685)
t5-t2 (h)	≤ 17,34	28.7% (537)	17,35-24,81	50.1% (936)	24,82-28,40	52.8% (989)	>28,41	40.3% (753)

Tabla 3. Tiempos exactos de los eventos de acuerdo con su cuartil (Q1, Q2, Q3 y Q4) y número y proporción de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto.

RESULTADOS

A continuación y con el objetivo de investigar y así seleccionar las variables de los eventos embrionarios con mayor relevancia entre los embriones que alcanzan y no el estadio de blastocisto, hemos realizado un análisis de regresión logística e identificado inicialmente a cc3, cc2, tM y t5 como las variables candidatas para la generación del modelo estadístico que nos permitirá, la clasificación embrionaria. Posteriormente, analizamos mediante el método de selección hacia adelante (Wald) con el objetivo de constatar el valor de cada una de las variables a medida que se van incorporando en la creación del modelo (Tabla 4). Como se observa en la tabla 5, la primera columna representa el coeficiente β de cada categoría que nos indica que favorece en este caso, la formación del blastocisto; seguida del error típico (E.T), posteriormente el estadístico de Wald y la última donde Exp (B) corresponde a la OR (odds ratio) representa el cociente entre la probabilidad de que se forme el blastocisto frente a la probabilidad de que no ocurra en presencia o ausencia del factor, es decir las variables analizadas. Con base en el valor del estadístico de Wald, de los cuatro parámetros los dos que centran nuestro interés son tM y t5.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 ^a								
cc3opt	,245	,064	14,802	1	,000	1,278	1,128	1,448
cc2opt	,372	,064	33,583	1	,000	1,451	1,279	1,645
tMopt	2,704	,063	1870,361	1	,000	14,942	13,218	16,890
t5	,019	,003	35,216	1	,000	1,019	1,013	1,025
Constante	-2,624	,179	213,984	1	,000	,073		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: cc3opt, cc2opt, tMopt, t5.

Tabla 4. Modelo de regresión logística mediante el método de selección hacia adelante en el que a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: cc3opt, cc2opt, tMopt y t5.

Sin embargo, cuando realizamos el análisis mediante curva ROC, que nos permite seleccionar dentro de un conjunto de modelos el más óptimo, tanto si se incluye a tM y t5 como si se considera solo a t5, los resultados no fueron satisfactorios ya que el AUC

obtenida fue de 0,824 (IC del 95%, desde 0,814 hasta 0,834; $P < 0.05$) como se observa en la Figura 21.

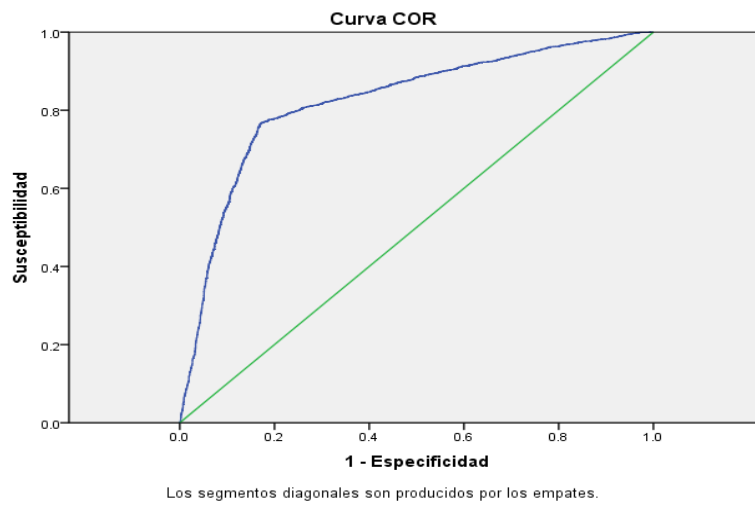


Figura 21. Valor predictivo ROC para modelo de formación de blastocisto según tM y t5.

Por ello, tM y t5 fueron desestimados y sólo consideramos a t5, pero obtuvimos una curva ROC aún inferior con un AUC de 0,709 (IC del 95%, desde 0,697 hasta 0,721; $P < 0.06$) Figura 22.

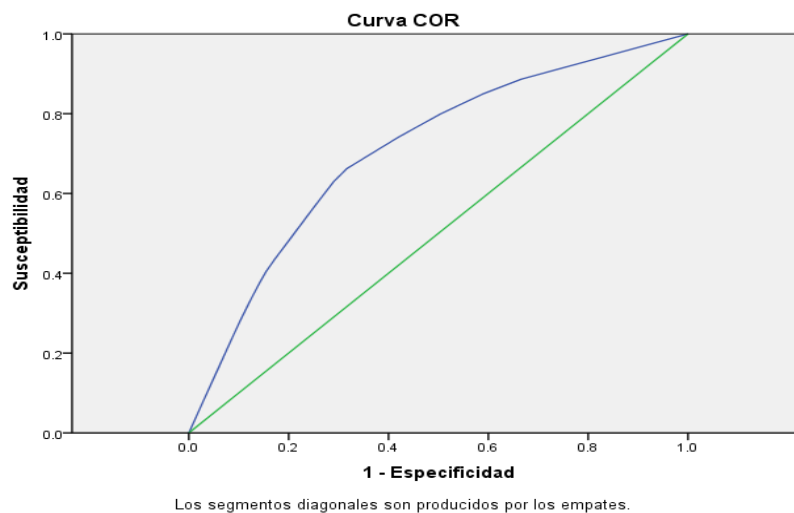


Figura 22. Valor predictivo ROC para modelo de formación de blastocisto eliminando tM del modelo.

RESULTADOS

Ante esta situación, seleccionamos otro grupo de parámetros esta vez formado por s3, t3, cc3, cc2 y tM en el que observamos que los valores 1,867 y 15,350 que corresponden a los tiempos óptimos de s3 y tM, respectivamente, son los mayores cocientes entre las probabilidad que se alcance el estadio de blastocisto y no se alcance entre todos los embriones analizados (Tabla 5). Así, sus tiempos de rangos óptimos se convierten en objeto de nuestra atención (Figura 23 y 24).

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
							Inferior	Superior
Paso 1 ^a s3opt	,624	,067	87,537	1	,000	1,867	1,638	2,128
t3opr	,178	,069	6,712	1	,010	1,195	1,044	1,367
cc3opt	,245	,066	13,933	1	,000	1,277	1,123	1,452
cc2opt	,210	,071	8,828	1	,003	1,233	1,074	1,416
tMopt	2,731	,062	1940,807	1	,000	15,350	13,594	17,333
Constante	-2,010	,056	1275,729	1	,000	,134		

a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: s3opt, t3opr, cc3opt, cc2opt, tMopt.

Tabla 5. Modelo de regresión logística mediante el método de selección hacia adelante en el que a. Variable(s) introducida(s) en el paso 1: s3opt, t3opr, cc3opt, cc2opt, tMopt.

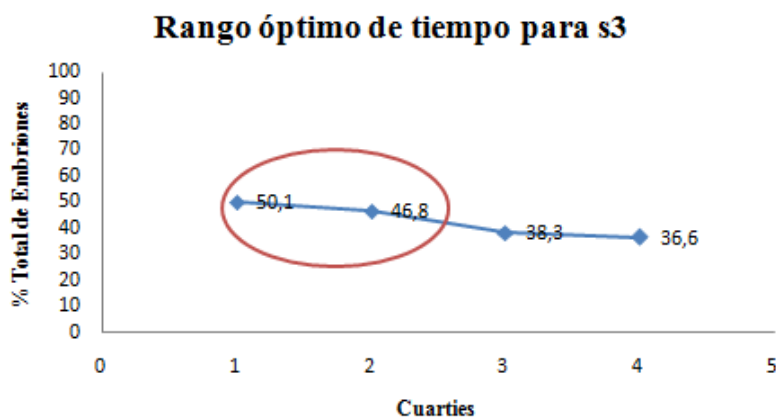


Figura 23. Rango de tiempo óptimo para la tercera sincronía (s3) definido como los dos cuartiles consecutivos que presentan el mayor porcentaje de formación de blastocistos (1 h 2) donde el cuartil 1 corresponde al tiempo: $\leq 3,75$ horas; cuartil 2: 3,76-8,78 horas; cuartil 3: 8,79-18,00 horas y finalmente cuartil 4: $> 18,01$ horas.

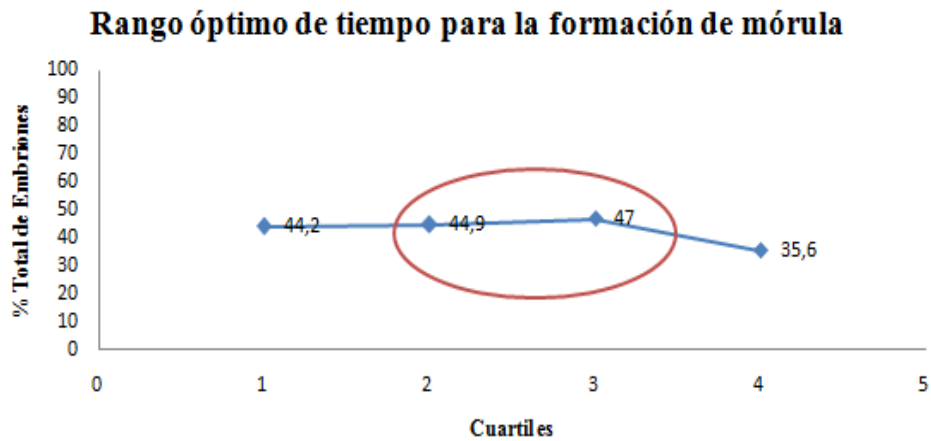


Figura 24. Rango de tiempo óptimo para la formación de mórula definido como los dos cuartiles consecutivos con el mayor porcentaje de blastocitos formados (2 y 3) donde el cuartil 1 corresponde al tiempo: $\leq 81,27$ horas; cuartil 2: 81,28-88,95 horas; cuartil 3: 88,96-96,00 horas y finalmente cuartil 4: $>96,01$ horas.

Finalmente, mediante el análisis de curva ROC obtuvimos un valor de AUC =0,849 (IC del 95%, desde 0,835 hasta 0,854; $P < 0.05$) como se observa en la Figura 25, siendo el mayor valor obtenido, convierten a tM y s3 como las variables más relevantes en el modelo de selección por su mayor valor predictivo con respecto a la formación de blastocisto. Donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y 0,5 es una prueba sin capacidad discriminadora diagnóstica, estos resultados nos muestran un 80% de probabilidad de seleccionar el embrión con mayor potencial para desarrollarse hasta D5.

RESULTADOS

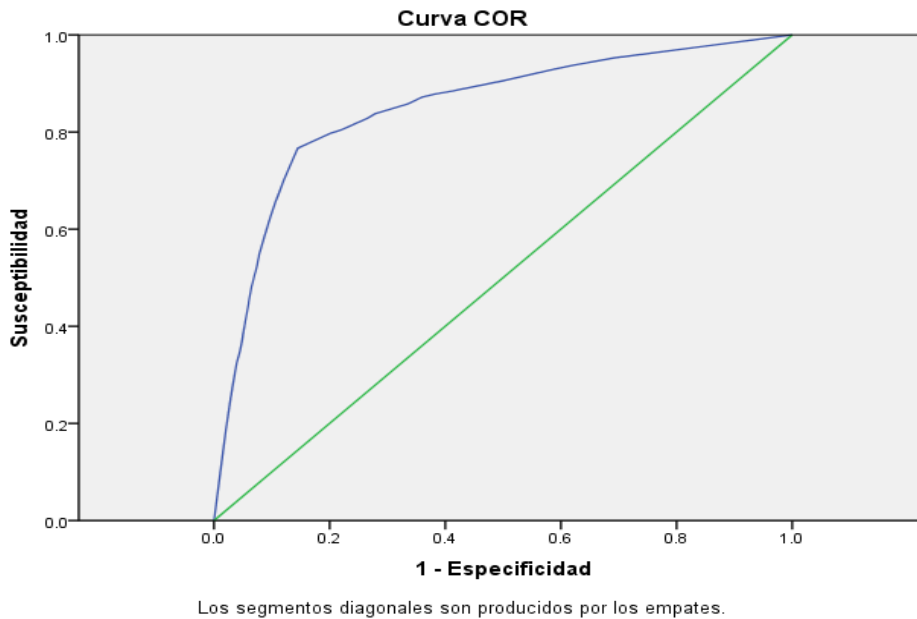


Figura 25. Valor predictivo ROC para modelo de formación de blastocisto.

Así pues y debido a que tM presenta el mayor valor en el análisis por el método de Wald, se toma su rango óptimo de tiempo (81,28 - 96,00 horas) como primera variable de selección seguida por $s3=t8-t5$ (rango óptimo $\leq 8,78$ horas) en la construcción de nuestro algoritmo que clasifica los embriones en cuatro categorías desde la A hasta la D. Así, si los valores de tM caen dentro de su rango óptimo el embrión se clasifica como A o B dependiendo de los valores de $s3$ y si el tM se encuentra fuera del rango óptimo, el embrión se clasifica como C o D dependiendo igualmente de los valores de $s3$, si se encuentran fuera del rango óptimo como se muestra en la figura 26.

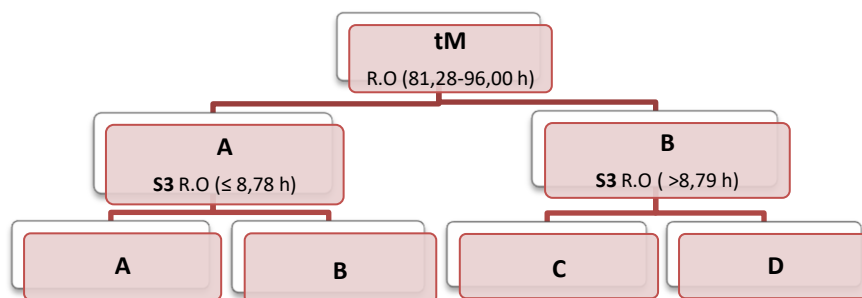


Figura 26. Modelo de clasificación jerárquica de los embriones con base en rango óptimo

(RO) para i) tiempo de mórula, y ii) s3 (t8-t5). La clasificación genera cuatro categorías de embriones con el aumento esperado de la formación de blastocisto (derecha a izquierda).

Adicionalmente y en base a las características de los embriones en cada categoría con respecto a estas variables, se determina la probabilidad de formación de blastocisto de forma decreciente de la A a la D como se observa en la tabla 6.

Categoría	n total embriones	n formación Blastocisto	% (IC 95%)
A	1.624	1.370	84.4 (82.64-86.16)
B	1.461	1.095	75.0 (72.89-77.1)
C	960	276	28.8 (26.6-31.0)
D	3.438	474	13.8 (12.12-15.48)

Tabla 6. Formación de blastocistos de acuerdo con la categoría en el modelo de clasificación jerárquica.

Fase 2. Resultados obtenidos de la transferencia en estadio de blastocisto.

Algoritmo de implantación.

En este estudio se incluyeron 3215 blastocistos, siendo 2383 vitrificados, por no ser seleccionados como primera opción para su transferencia en fresco a pesar de presentar calidad óptima pero sí como candidatos para posteriores ciclos (Figura 27) mientras que, 832 fueron tranferidos en ciclos frescos.

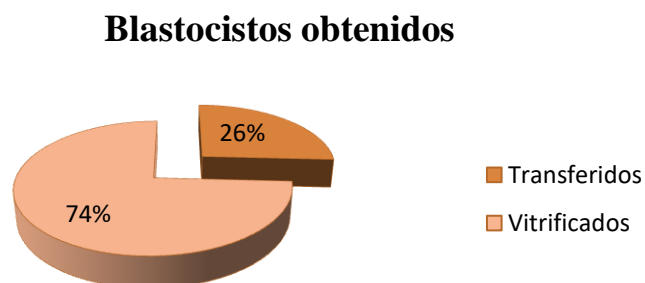


Figura 27. Distribución de blastocistos obtenidos, donde 832 fueron transferidos y representan el 26% del total.

RESULTADOS

Teniendo en cuenta solo la población de embriones de D5 transferidos (n=832) aplicamos el modelo de clasificación generado en la fase anterior para predecir el desarrollo hasta dicho estadio con la finalidad de evaluar adicionalmente su capacidad para predecir la implantación. Sin embargo, al realizar el análisis de curva ROC obtuvimos una AUC de 0,546 (IC del 95%, 0,507-0,585; P=0.023) que indica que tiene poca, si la hay, utilidad para predecir que embriones seleccionados con estas dos variables logran implantar (Figura 28).

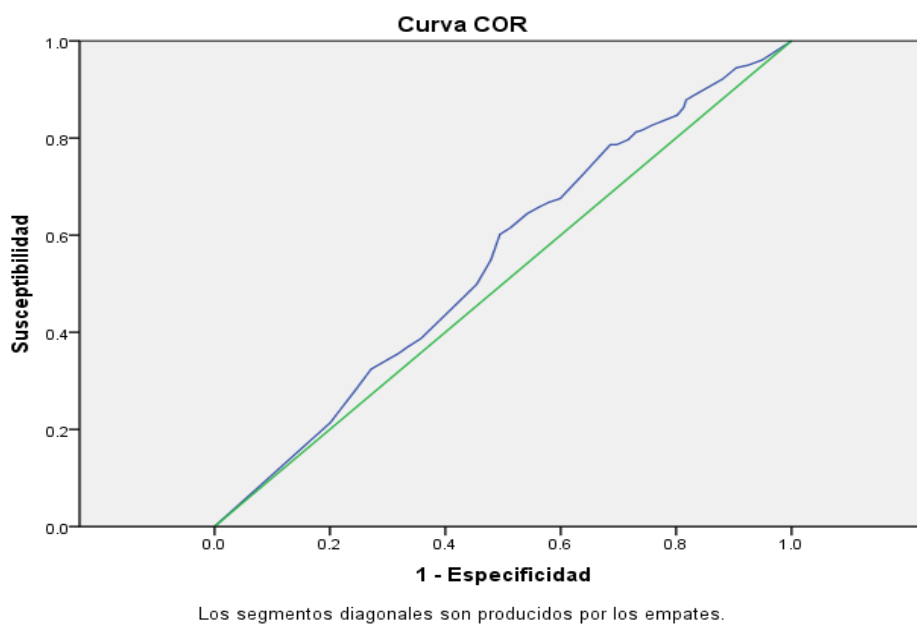


Figura 28. Valor predictivo ROC para implantación con modelo de formación de blastocisto.

Así que, debido a la falta de relación entre estos eventos morfocinéticos con el potencial implantatorio, se decidió realizar nuevamente un análisis del conjunto de los parámetros en búsqueda de nuevos marcadores cinéticos del desarrollo que permitieran predecir y/o identificar el/los blastocisto(s) con mayor capacidad para implantar. Para ello, los tiempos registrados de cada parámetro tanto de los que logran implantar (n=383) como de aquellos que no (n=449), fueron agrupados por cuartiles (Q) y comparados entre

sí. Adicionalmente se expresó el porcentaje de blastocistos que implantan (% BI) para seleccionar los dos cuartiles con la frecuencia más alta (Tabla 7).

Evento Celular	Q1		Q2		Q3		Q4	
	Limite	% BI (n)	Limite	% BI (n)	Limite	% BI (n)	Limite	% BI (n)
t2 (h)	≤ 24,08	49.50% (100)	24,09-25,78	42.59% (93)	25.79-27,90	50.00% (106)	27,91+	41.019% (84)
t3 (h)	≤ 34,70	51.50% 104	34,71-37,28	48.73% 97	37,29-39,84	44.64% 101	39,85+	38.64% 81
t4 (h)	≤ 35,93	49.24% 99	35,94-38,49	50.23% 111	38,50-41,14	41.97% 81	41,15+	41.94% 92
t5 (h)	≤ 47,55	48.02% 102	47,56-51,17	49.76% 108	51,18-55,22	43.90% 94	55,23+	42.21% 79
t6 (h)	≤ 49,55	50.75% 110	49,56-52,99	47.34% 104	53,00-56,99	46.43% 97	57,00+	39.90% 72
t7 (h)	≤ 51,28	53.57% 109	51,29-55,21	48.45% 94	55,22-59,69	41.03% 80	59,70+	40.0% 100
t8 (h)	≤ 53,25	53.14% 107	53,26-57,89	49.34% 89	57,90-64,70	41.46% 98	64,71+	41.67% 89
t9 (h)	≤ 65,23	46.9% 99	65,24-70,74	52.8% 95	70,75-77,13	45.6% 104	77,14+	40.8% 85
tM (h)	≤ 79,78	51.46% 104	79,79-86,57	51.37% 91	86,59-92,98	46.70% 101	92,99+	42.77% 87
tB (h)	≤ 96,22	55.1% 105	96,23-101,65	49.2% 86	101,66-107,47	47.0% 105	107,48+	43.9% 87
tBE (h)	≤ 107,94	67.0% 109	107,95-112,99	48.0% 94	113,00-116,13	37.9% 81	116,14+	53.4% 99
cc2 (h)	≤ 10,52	50.7% 108	10,53-11,51	49.8% 101	11,52-12,49	42.8% 90	12,50+	39.9% 84
cc3 (h)	≤ 12,33	48.3% 102	12,34-14,01	45.6% 96	14,02-16,00	48.3% 101	16,01+	41.8% 84
s2 (h)	≤ 0,00	46.4% 105	0,01-0,64	46.5% 110	0,68-1,50	47.3% 87	1,51+	43.1% 81
s3 (h)	≤ 3,00	58.1% 117	3,01-5,67	42.6% 89	5,68-12,57	40.4% 83	12,58+	43.0% 94
t5-t2 (h)	≤ 22,97	46.1% 97	22,98-25,48	53.6% 114	25,49-28,01	44.3% 92	28,02+	39.8% 80

Tabla 7. Tiempos exactos de los eventos de acuerdo con su cuartil (Q1, Q2, Q3 y Q4), número y proporción de embriones que implantan en el estadio de blastocisto.

A continuación y mediante el análisis de χ^2 en la tabla de contingencia que reúne todos los eventos, evaluamos la relación entre ellas e identificamos a t7, t8, tEB y s3 como las únicas variables que presentan un valor de significancia menor que 0,05. En consecuencia, las variables son dependientes entre sí (Tabla 8).

RESULTADOS

t7 * TASA_IMPLANTACION_CL#- Pruebas de chi-cuadrado				t8 * TASA_IMPLANTACION_CL#- Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	8,195	1	0,004	Chi-cuadrado de Pearson	6,836	1	0,009
Razón de verosimilitudes	8,204	1	0,004	Razón de verosimilitudes	6,832	1	0,009
Asociación lineal por lineal	8,185	1	0,004	Asociación lineal por lineal	6,828	1	0,009

EB * TASA_IMPLANTACION_CL# Pruebas de chi-cuadrado				s3 * TASA_IMPLANTACION_CL#- Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)		Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	17,019	3	0,001	Chi-cuadrado de Pearson	14,226	3	0,003
Razón de verosimilitudes	17,285	3	0,001	Razón de verosimilitudes	14,22	3	0,003
Asociación lineal por lineal	4,729	1	0,03	Asociación lineal por lineal	8,066	1	0,005

Tabla 8. Datos obtenidos del análisis de χ^2 en la tabla de contingencia para las variables t7, t8, EB y s3 en los que se evidencia su significancia (<0.05).

Posteriormente y mediante regresión logística a través del método Wald o Por pasos hacia adelante (Razón de verosimilitud) como se observa en la tabla 9, de los cuatro parámetros iniciales se identificó a tEB y s3 como las variables con mayor valor predictivo. Por tanto, sus rangos óptimos de tiempo $\leq 5,67$ horas y $\leq 112,99$ horas respectivamente (Tabla 7) fueron los puntos de referencia y se compararon entre los dos grupos, es decir entre los blastocistos que implantaban y aquéllos que no implantaron, observándose una diferencia estadísticamente significativa (Figura 29).

			Puntuación	gl	Sig.	
Paso 0	Variables	t3opt	5,768	1	,016	
		t4opt	5,299	1	,021	
		t5opt	3,184	1	,074	
		t7opt	8,195	1	,004	
		t8opt	6,836	1	,009	
		tMopt	6,598	1	,010	
		t5t2opt	5,541	1	,019	
		cc2opt	6,541	1	,011	
		t2opt	2,361	1	,124	
		s3opt	13,982	1	,000	
		tEBopt	19,965	1	,000	
		Estadísticos globales		37,586	11	,000

		B	E.T.	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	I.C. 95% para EXP(B)	
								Inferior	Superior
Paso 1a	s3opt	,578	,173	11,091	1	,001	1,782	1,268	2,504
	tEBopt	,934	,231	16,389	1	,000	2,543	1,619	3,997
	Constante	-,402	,083	23,304	1	,000	,669		

Tabla 9. Modelo de regresión logística mediante el método de selección hacia adelante en el que las variables introducidas en el paso 1 corresponden a s3 y BE.

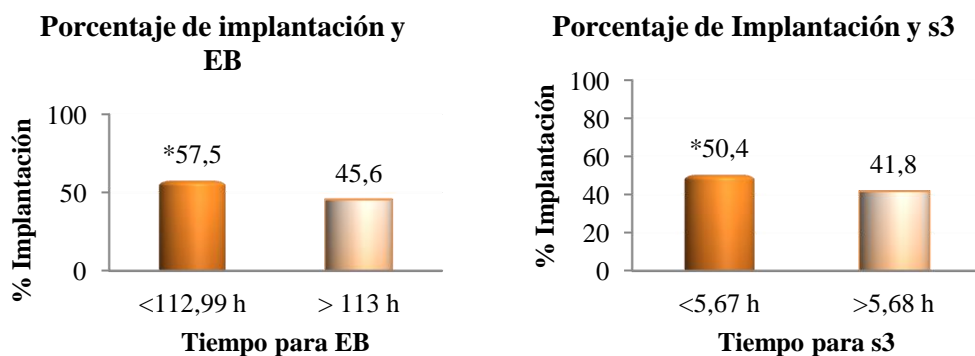


Figura 29. Tasa de implantación para embriones que presentan o no rangos óptimos para los parámetros cinéticos de s3 y tBE. Los intervalos de tiempo se describen en horas después de la ICSI.* P <0,05.

Finalmente y en base a estos hallazgos, es propuesto un nuevo modelo jerárquico de clasificación que subdividió los blastocistos transferidos en cuatro categorías de la A a la D (Figura 30) con mayor o menor tasa de implantación. Al efectuar el análisis de curva

RESULTADOS

ROC obtuvimos una AUC de 0,591 (IC del 95% desde 0,552 hasta 0,630; $p < 0,001$) como se observa en la Figura 31.

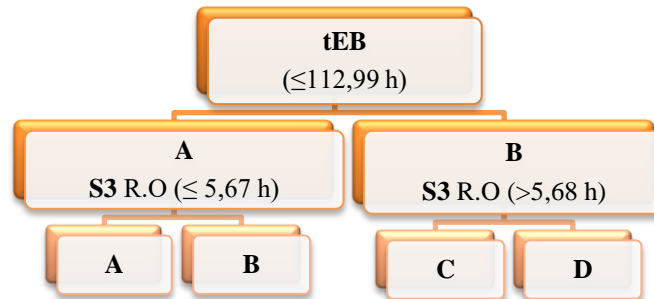
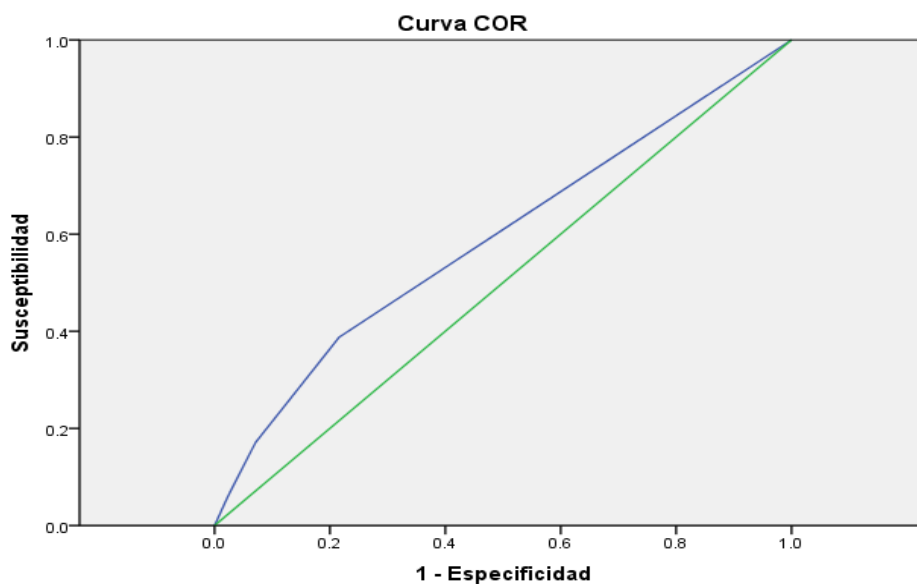


Figura 30. Modelo de clasificación jerárquica de implantación en el estadio de blastocisto con base en rangos óptimos de tiempo para s3 y BE.



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Figura 31. Valor predictivo mediante análisis de curva ROC para modelo de implantación en transferencia en estadio de blastocisto.

Así por ejemplo, para la categoría A la tasa de implantación es del 72.2% mientras que para la categoría D es de 39.7% como se observa en la tabla 10.

Categoría	n Blastocistos transferidos	n Blastocistos implantados	% (IC 95%)
A	36	26	72.2 (57.56-86.84)
B	65	43	66.2 (54.70-77.70)
C	147	82	55.8 (47.77-63.83)
D	584	232	39.7 (35.73-43.67)

Tabla 10. Distribución de blastocistos implantados de acuerdo con las categorías morfocinéticas.

➤ **Resultados de la clasificación morfológica y morfocinética de blastocistos transferidos.**

Una vez identificados los eventos morfocinéticos que configuraban nuestro algoritmo de implantación (tBE y ts3) en embriones transferidos en el estadio de blastocisto y con el objetivo de fortalecer nuestros resultados, realizamos un posterior estudio en el que se añadió la calidad morfológica del blastocisto según los criterios de valoración ASEBIR, para lo cual el total de los embriones transferidos en D5 (n=832) fueron re-clasificados según estos criterios en las cuatro categorías en donde A corresponde a la categoría con mejor calidad y la D la de peor y se obtuvo el porcentaje de implantación en cada una de ellas (Tabla 11).

Categoría	n Blastocistos transferidos	n Blastocistos implantados	% (IC 95%)
A	168	93	55.4 (46.6-64.0)
B	386	180	46.6 (41.0-51.2)
C	245	98	39.9 (32.8-46.6)
D	33	12	35.6 (16.0-54.2)

Tabla 11. Distribución de blastocistos transferidos e implantados de acuerdo con la categoría morfológica ASEBIR.

RESULTADOS

Teniendo esta nueva clasificación, comparamos los resultados obtenidos en relación a las tasas de implantación (TI) de los blastocistos transferidos tanto por clasificación exclusivamente morfológica (ASEBIR) como por clasificación morfocinética (Figura 32). Así, pudimos observar en primera instancia, que los embriones seleccionados con base en su aspecto morfológico se distribuyen de forma homogénea entre las cuatro categorías, con porcentajes muy estrechos entre sí, aunque como es de esperar la mejor tasa de implantación correspondía a la categoría A mientras que, cuando incorporamos las características morfocinéticas, los embriones se distribuyeron de una manera heterogénea, con márgenes más amplios entre categorías, evidenciándose claramente un descenso en el porcentaje de implantación de la categoría A a la categoría D o de peor pronóstico.

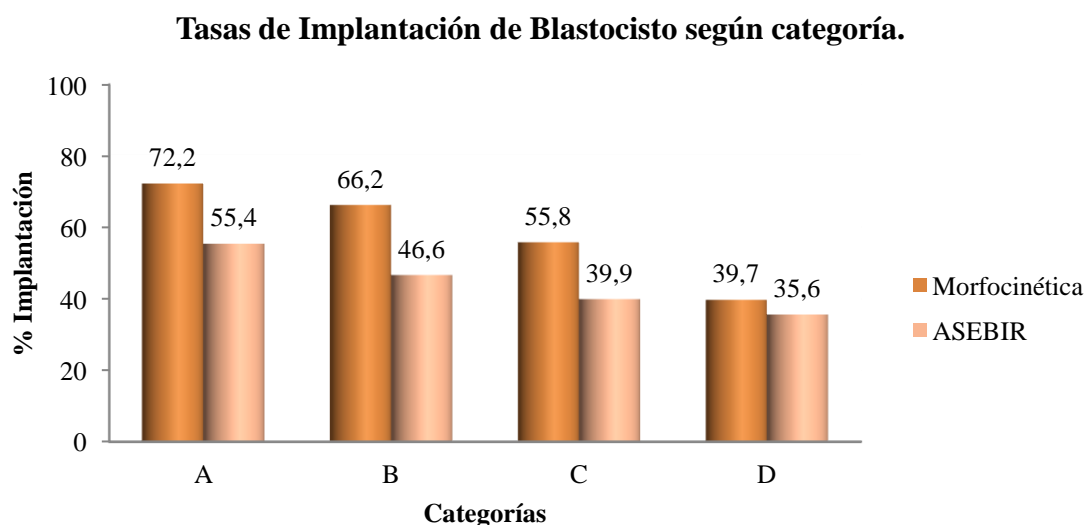


Figura 32. Distribución por categoría morfocinética y morfológica de blastocistos implantados.

En segunda instancia y al realizar una evaluación detallada de cada una de las categorías según el número de embriones incluidos en ellas, nuestros resultados mostraron que cuando se utiliza un sistema de evaluación, clasificación y posterior selección embrionaria basada en la morfocinética por un lado, se requiere un menor

número de embriones calidad A y B para transferir (36 y 65 respectivamente), comparado con un sistema meramente morfológico donde fueron necesarios un total de 554 blastocistos de igual calidad (figura 33). Con respecto a las categorías de menor pronóstico, la C y D, son éstas las que concentran la mayor cantidad de blastocistos seleccionados a transferir en la clasificación morfocinética y además su número total es superior comparado con las mismas categorías del método morfológico (731 vs 278), pese a ello sus tasas de éxito son superiores. Razón por la cual nos planteamos como posible explicación el margen tan estrecho entre los rangos de tiempo óptimo y no, para las variables incluidas en el modelo de clasificación.

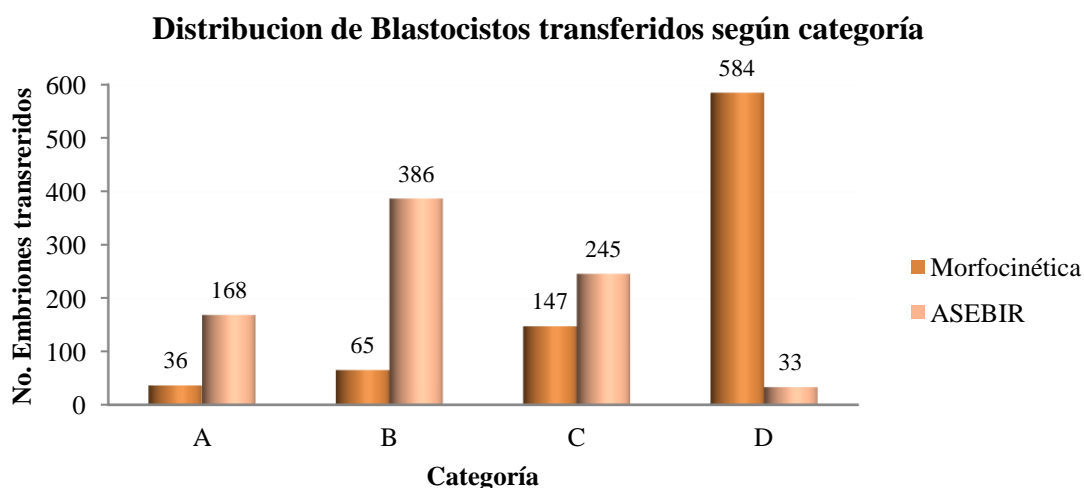


Figura 33. Distribución de blastocistos transferidos por categorías según metodología de clasificación.

Finalmente y con el propósito de determinar el efecto que puede ejercer la combinación de la clasificación morfológica y nuestro modelo de implantación y, teniendo en cuenta la edad ovocitaria (propios o de donante) como posibles factores de sesgo, realizamos una análisis de regresión logística en el que se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 12.

RESULTADOS

Distribución de blastocistos implantados de acuerdo con las categorías morfocinéticas (fase de validación)		
Modelo de efectos	OR	Valor de P
Morfología de Blastocistos según ASEBIR		
A vs D	1.69 (0.69-4.15)	0.249
B vs D	1.30 (0.56-1.86)	0.542
C vs D	1.06 (0.45-2.50)	0.899
Modelo Morfocinético		
A vs D	2.33 (1.38-3.92)	0.002
B vs D	1.88 (1.19-2.96)	0.007
C vs D	1.44 (0.98-2.11)	0.062
Origen de ovocitos		
Donación vs autólogos	1.316 (0.952-1.821)	0.097
Edad	0.94 (0.91-0.98)	0.002

Tabla 12. El análisis de regresión logística de la implantación en curso (saco gestacional) en referencia a los blastocistos con implantación conocida (embriones KID) como afectados por la combinación de categorías morfológicas de blastocisto (ASEBIR) y las categorías del modelo de clasificación jerárquica de blastocistos aplicadas en el sistema de *time-lapse*; fuente de ovocitos y la edad del paciente o la donante de ovocitos son factores de confusión. OR es la razón de probabilidad, con intervalos de confianza del 95% entre paréntesis.

Posteriormente el análisis de curva ROC determinó el valor predictivo y obtuvimos que el modelo combinado (morfología + morfocinética) genera una AUC de 0,602 (IC 95%, 0,559-0,645; P <0,001) como se observa en la Figura 34 mientras que, el modelo de implantación con la morfología de blastocisto sólo, alcanza una AUC de 0,561 (IC95%, 0,517 a 0,605; <0,007) lo que evidencia poca diferencia entre ellos.

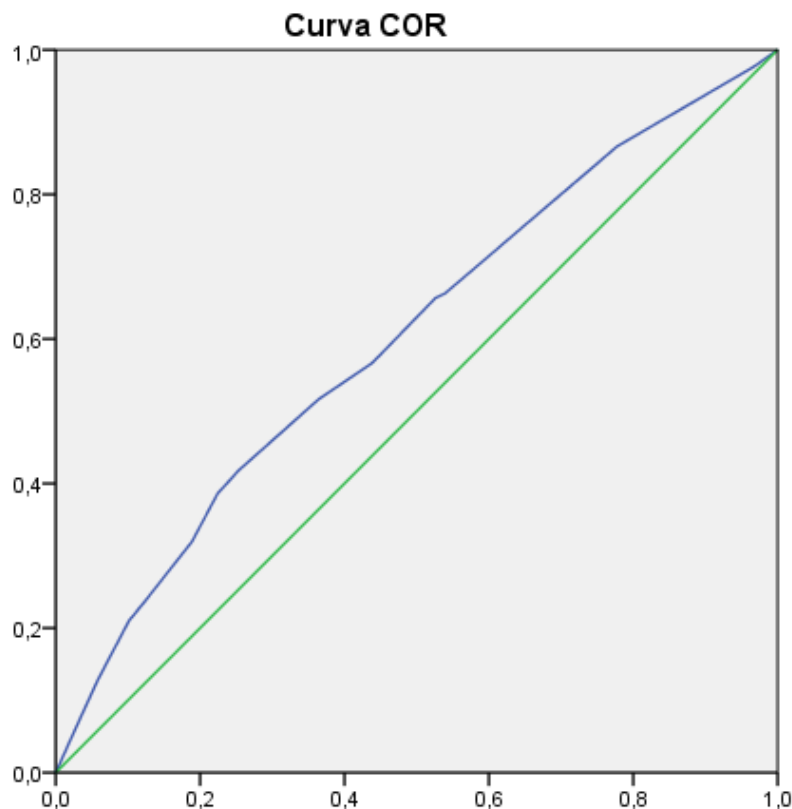


Figura 34. Valor predictivo mediante análisis de curva ROC para modelo de implantación en transferencia en estadio de blastocisto teniendo en cuenta su morfología y edad de la donante y/o paciente.

Fase 3. Resultados obtenidos de la validación del modelo de implantación en estadio de blastocisto.

Finalizada la fase 2 de este estudio, se llevó a cabo el proceso de validación del modelo de implantación con transferencia de embriones en el estadio de blastocisto creado a partir de los rangos óptimos de las variables BE y s3. Para ello, realizamos un análisis de regresión logística en un conjunto de datos independientes obtenidos durante el periodo de mayo del 2013 y mayo del 2014. Este conjunto está formado por 257 blastocistos transferidos, obtenidos a partir de 328 ciclos de los cuales 123 logran

RESULTADOS

implantar. La totalidad de los embriones fueron clasificados en sus cuatro categorías como se evidencia en la Tabla 13.

Categoría	n Blastocistos Transferidos	n Blastocistos implantados	% (IC 95%)
A	11	10	90.9 (88.39-93.41)
B	18	12	66.7 (62.59-70.81)
C	44	24	54.4 (50.05-58.75)
D	184	77	41.8 (37.49-46.11)

Tabla 13. Clasificación de blatocistos transferidos según categoría en modelo de implantación de acuerdo con tiempo de s3 y BE.

Mediante análisis de curva ROC, el modelo aplicado en este nueva población de blastocistos generó una AUC de 0,596 con un IC de 95% desde 0,526 hasta 0,666; $P=0,008$ (Figura 35).

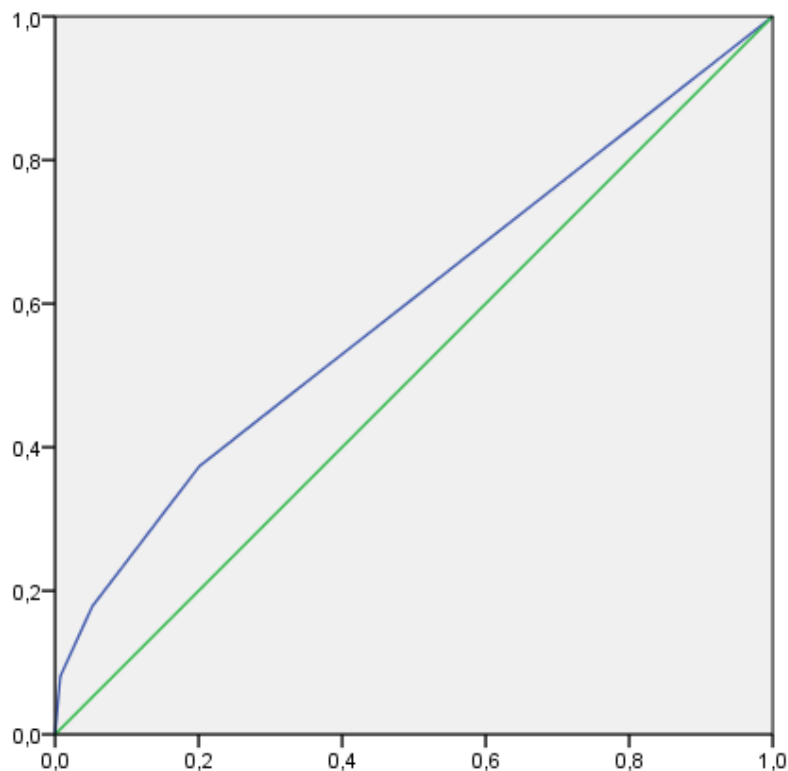


Figura 35. Valor predictivo mediante análisis de curva ROC para validación del modelo de implantación en transferencia en blastocisto según s3 y EB.

Fase 4. Resultados de la exploración de nuevas variables del segundo y tercer ciclo celular.

En esta fase del estudio, incluimos los embriones cultivados en el EmbryoScope™ como sistema de *time-lapse* y pudimos determinar que la tasa de formación de blastocito fue de 44.6% que corresponde a 3107 embriones mientras que 3863 no alcanzaron este estadio (55.4%; Figura 36).

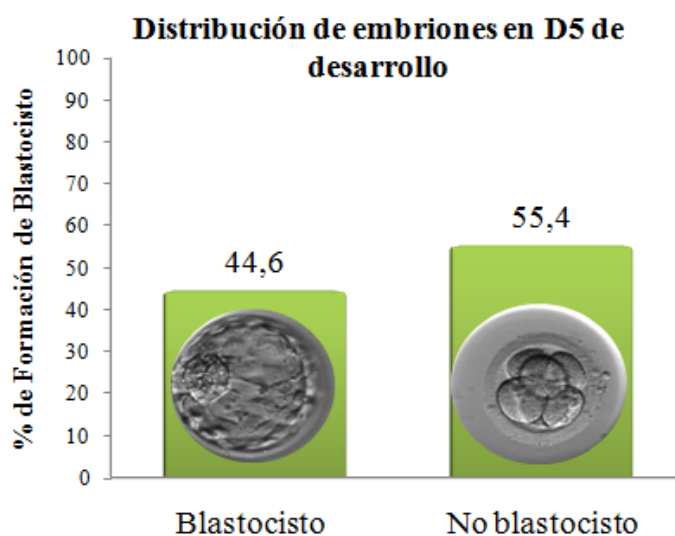


Figura 36. Distribución de los embriones analizados mediante *time-lapse* con base en el estadio de blastocisto en día 5 de desarrollo.

Además, monitorizamos los eventos morfocinéticos tanto del segundo como del tercer ciclo celular (Ver Figura 37) del total de embriones analizados.

RESULTADOS

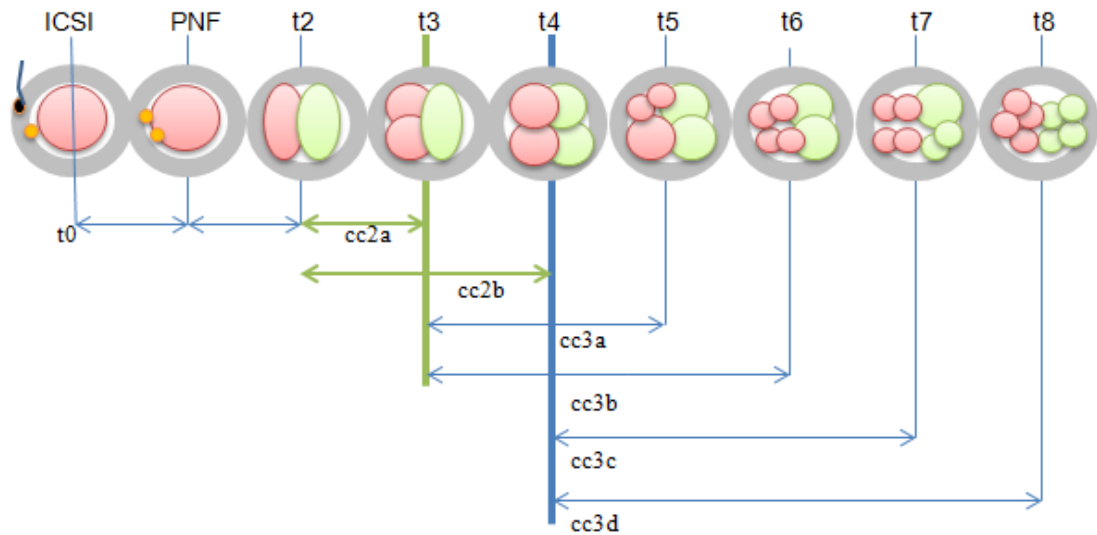


Figura 37. Esquema de variables del segundo y tercer ciclo celular.

Una vez realizado el estudio de las imágenes obtenidas pudimos establecer que, de acuerdo con la célula que inicia el tercer ciclo celular, es posible determinar un patrón de división para $cc3a$, $cc3b$, $cc3c$ y $cc3d$ como se describe a continuación.

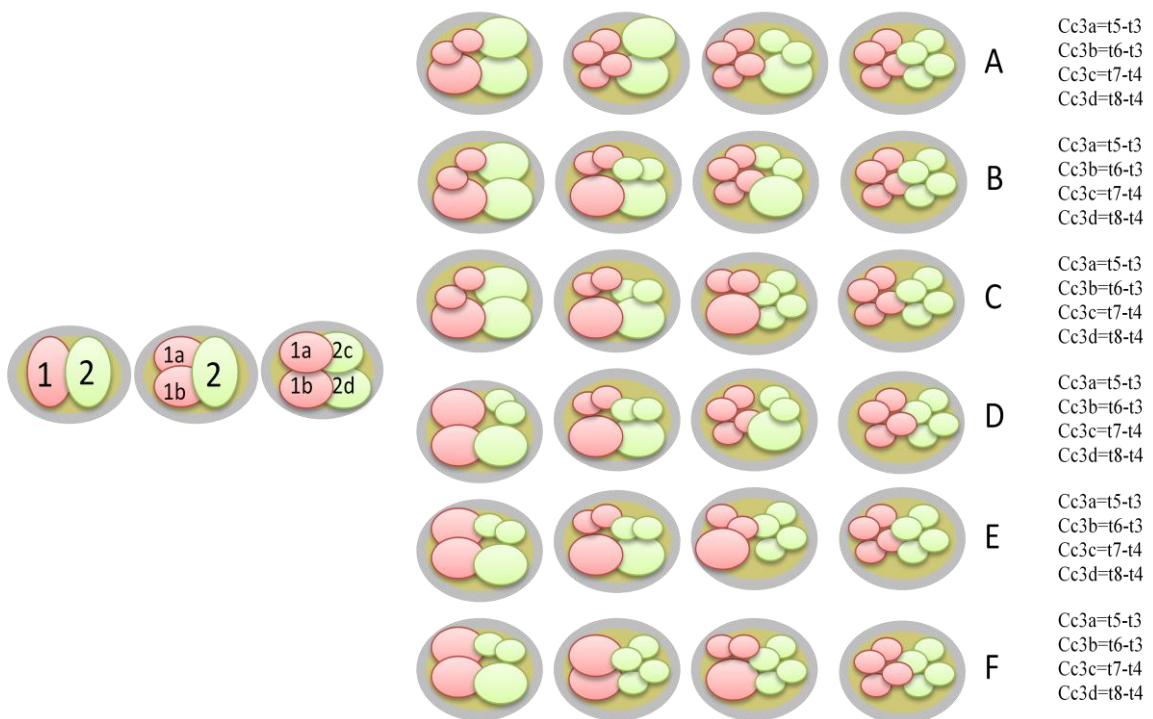


Figura 38. Representación gráfica de los seis modelos posibles de embriones durante su tercer ciclo celular, de acuerdo con los patrones de escisión de sus células.

➤ ***Asociación del segundo ciclo celular con la formación de blastocisto e implantación.***

Al comparar los tiempos del segundo ciclo celular, cc2a, cc2b y su sincronía ($SR2=cc2/cc2b$) entre los dos grupos de embriones obtenidos (aquéllos que alcanzan el estadio de blastocistos durante las primeras 120 horas de cultivo y los que no lo alcanzan), pudimos observar que en el grupo de embriones que forman blastocisto, las variables $cc2a=t3-t2$ y $SR2$ ocurren más tardíamente en comparación con el grupo de embriones que no alcanzan el estadio de blastocisto mientras que, la variable $cc2b=t4-t2$ se produce en menos tiempo ($12,0 \pm 3,3$ vs $13,1 \pm 6,6$ hrs) (Tabla 14).

Variables del 2 ^{do} ciclo celular (cc)	Promedio \pm SD de acuerdo con el estadio de blastocisto (IC95%)		Valor de P
	Estadio de Blastocisto	No estadio de Blastocisto	
cc2a	10,5 \pm 3,9 hrs (10,4-10,7 hrs)	9,8 \pm 0,1hrs (9,6-10,0 hrs)	< 0.05
cc2b	12,3 \pm 3,9hrs (12,2-12,4 hrs)	13,1 \pm 6,6 hrs (12,9-13,3 hrs)	< 0.05
SR2	0,9 \pm 0,2 hrs (0,8-0,9 hrs)	0,7 \pm 0,3 hrs (0,7-0,8 hrs)	< 0.05

Tabla 14. Promedio de los eventos del segundo ciclo celular en embriones que alcanzan y no, el estadio de blastocisto.

Debido a que la diferencia entre los dos grupos resultante fue estadísticamente significativa, cada uno de los tiempos de las nuevas variables identificadas fueron agrupados y estudiados por cuartiles (Q) con el objetivo de seleccionar los dos rangos que presentaron el porcentaje más alto de formación de blastocistos. De esta forma se definió que el rango de tiempo óptimo para cc2a fue de 9,76-12,7 horas y para cc2b entre 11,3 y 14,3 horas. Finalmente, para la sincronía en el segundo ciclo celular ($SR2 > 0,8$ horas),

RESULTADOS

se estableció la proporción de los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto y los embriones que no lo hacen en base a estos tiempos (Figura 39).

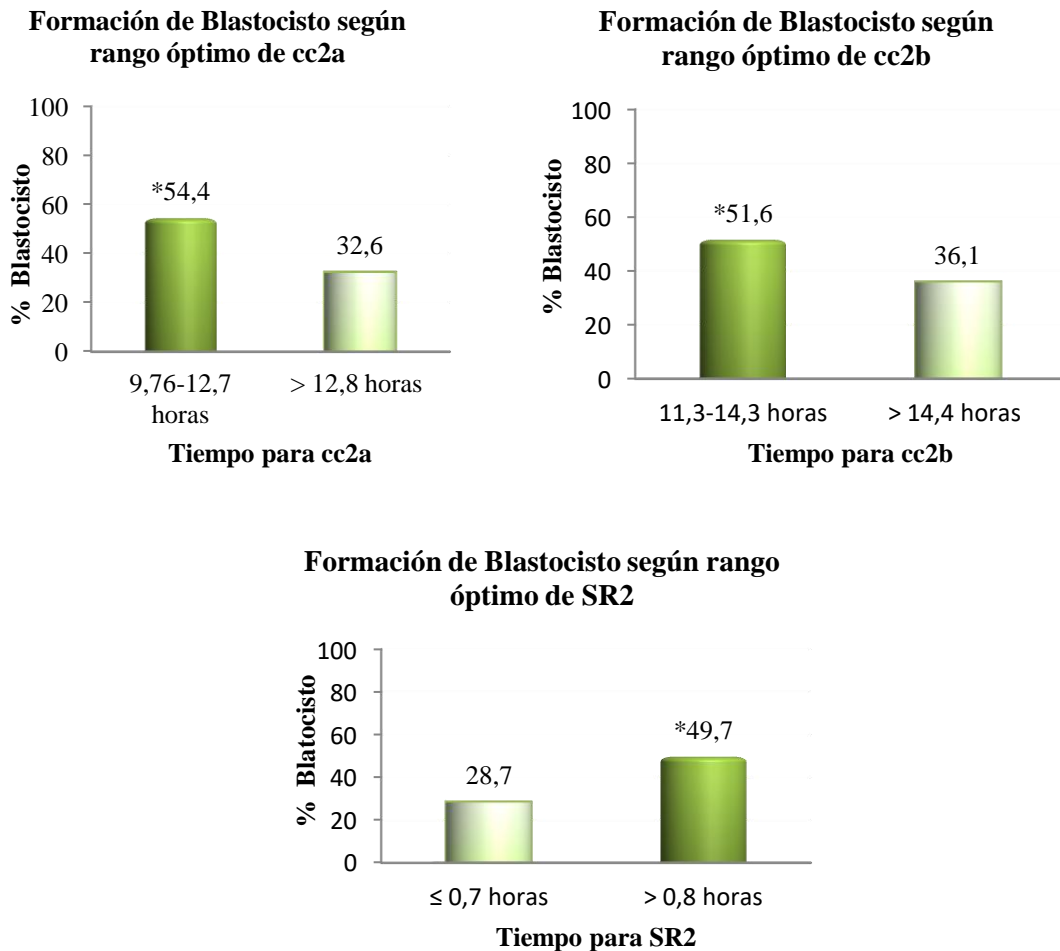


Figura 39. Distribución de formación de blastocisto de acuerdo con los rangos óptimos de las variables del segundo ciclo celular, cc2a, cc2b y SR2.

Por otra parte, de los 3107 embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, 2779 que representan el 89% fueron vitrificados mientras que 328 fueron transferidos.

Al comparar los promedios de los tiempos de las variables del segundo ciclo celular entre las dos poblaciones, es decir, los blastocistos que implantan y no (Tabla 15), no se evidenció diferencia estadísticamente significativa, razón por la cual no fueron estudiados por cuartiles.

Variable del 2 ^{do} Ciclo celular (cc)	Promedio ± SD de acuerdo con implantación (IC95%)		Valor de P
	Implantación	No implantación	
cc2a	10,5±3,5 hrs (10,2-10,9)	10,9±3,6 hrs (10,5-11,2)	0.312
cc2b	12,0±3,3 hrs (11,7-12,3)	12,4±3,6 hrs (12,1-12,7)	0.216
SR2	0,9±0,2 hrs (0,8-0,9)	0,9±0,2 hrs (0,8-0,9)	0.132

Tabla 15. Promedio de los eventos del segundo ciclo celular en blastocistos que implantan y no implantan

➤ ***Asociación del tercer ciclo celular con la habilidad de desarrollo a blastocisto e implantación.***

De igual manera, las variables del 3er ciclo celular (cc3a, cc3b, cc3c, cc3d, SR3) fueron registradas y estudiadas retrospectivamente en el total de los embriones con el fin de comparar los tiempos entre los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto y los embriones que no lo alcanzaron (Tabla 16).

Variables del 3 ^{er} ciclo celular (cc)	Promedio ± SD de acuerdo con el estadio de Blastocisto (95CI)		Valor de P
	Estadio de Blastocisto	No estadio de Blastocisto	
cc3a	13.6±5.6 hrs (13.4-13.8)	13.4±8.2 hrs (13.1-13.7)	< 0.05
cc3b	16.5±5.8 hrs (16.3-16.7)	17.7±8.4 hrs (17.4-18.0)	< 0.05
cc3c	17.8±6.7 hrs (17.6-18.0)	19.3±9.2 hrs (18.9-19.6)	< 0.05
cc3d	21.8±8.9 hrs (21.5-22.2)	23.5±10.6 hrs (23.0-23.9)	< 0.05
acc3	17.1±5.2 hrs (16.9-17.3)	17.6±6.5 hrs (17.3-17.8)	< 0.05
SR3	0.7±0.1 hrs (0.7-0.8)	0.7±0.2 hrs (0.7-0.7)	< 0.05

Tabla 16. Tiempos de los eventos del tercer ciclo celular en embriones que alcanzan y no, el estadio de blastocisto.

RESULTADOS

Con los datos obtenidos y mediante análisis de regresión logística, pudimos determinar que sólo los tiempos de cc3a y SR3 están asociados significativamente con la llegada a blastocisto, por lo que se decidió estudiar estos dos parámetros de forma agrupada y establecer así sus rangos de tiempo óptimos. De esta manera, se hizo posible además, establecer el porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto en base al rango de tiempo óptimo para estas variables (Figura 40).

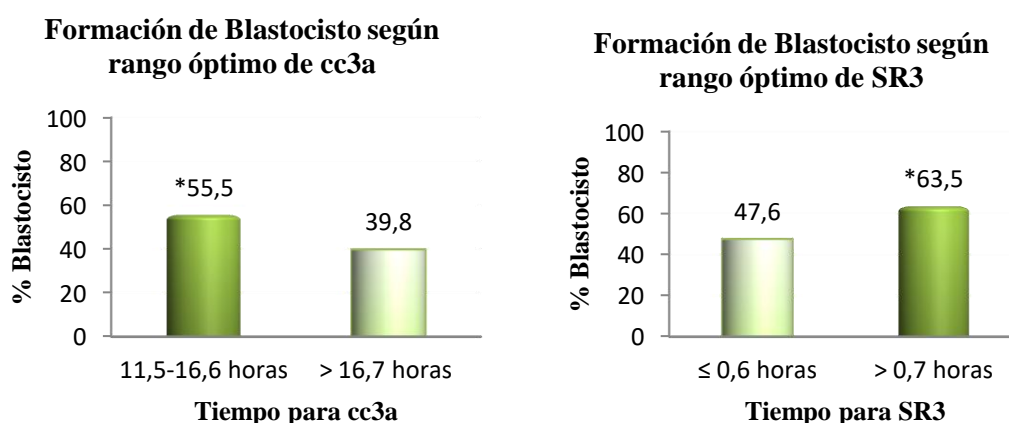


Figura 40. Distribución de formación de blastocisto de acuerdo con los rangos óptimos de las variables cc3a y SR3 del tercer ciclo celular.

Por otro lado, los tiempos de las variables del tercer ciclo celular fueron estudiadas y comparadas entre los blastocistos que implantan y no, como se observa en la tabla 17.

Variable del 3 ^{er} ciclo celular (cc)	Promedio± SD de acuerdo con Implantación (IC95%)		Valor de P
	Implantación	No implantación	
Cc3a	13.6±4.3 hrs (13.1-14.0)	13.9±4.8 hrs (13.4-14.3)	< 0.05
Cc3b	15.6±4.6 hrs (15.2-16.1)	16.3±4.8 hrs (15.8-16.7)	< 0.05
Cc3c	16.5±4.9 hrs (16.0-17.0)	17.9±6.0 hrs (17.3-18.4)	< 0.05
Cc3d	19.9±7.3 hrs (19.1-20.7)	21.6±7.9 hrs (20.8-22.4)	< 0.05
acc3	16.1±4.4 hrs (15.6-16.6)	17.2±4.8 hrs (16.7-17.7)	< 0.05
RS3	0.8±0.1hrs (0.7-0.8)	0.7±0.1 hrs (0.7-0.9)	< 0.05

Tabla 17. Tiempos de los eventos del tercer ciclo celular en embriones que implantan y no implantan.

Con el propósito de establecer una posible asociación con su potencial para implantar, adicionalmente analizamos mediante regresión logística e identificamos a cc3c (t7-t4), cc3d (t8-t4) y acc3 (cc3a+cc3b+cc3c+cc3d/4) como las variables con un poder estadísticamente significativo, por lo cual estudiamos sus cuartiles con la finalidad de identificar los dos que permiten establecer rangos óptimos. Finalmente y en base a estos datos, se determinó el porcentaje de implantación de los blastocistos transferidos con rangos óptimos de tiempo para cada una de estos parámetros (Figura 41).

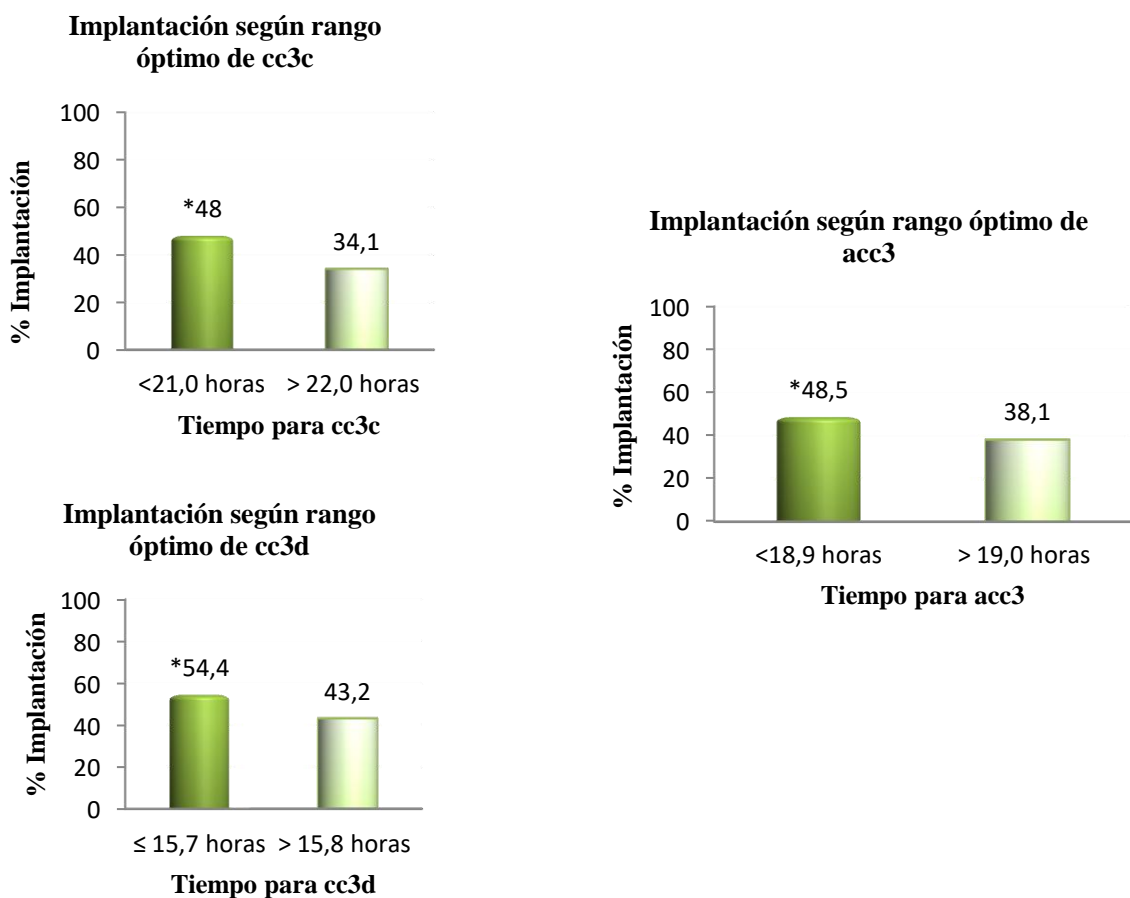


Figura 41. Distribución de blastocistos que implantan y no implantan de acuerdo con los rangos óptimos de las variables del tercer ciclo celular.

RESULTADOS

5.

DISCUSIÓN.

DISCUSIÓN

Con más de cuatro millones de nacidos vivos, las TRA se han convertido en una alternativa ampliamente utilizada por parejas que no pueden concebir. De hecho, para algunas de ellas es su única opción y aunque, han transcurrido más de tres décadas desde el primer nacido vivo (127) y a pesar de la mejora realizada hasta la fecha en las técnicas de reproducción asistida, el porcentaje de éxito desafortunadamente continúa siendo relativamente bajo (aproximadamente 30% por transferencia) (128) ya que sólo dos de cada diez embriones logran implantar (129). Resultados que son más evidentes en los programas con transferencia temprana de embriones en el día 3 de desarrollo o incluso antes, razón por la cual, la mayoría de los centros de reproducción asistida deciden transferir más de un embrión al útero materno. Esta estrategia, por una parte, ha ayudado a mantener las tasas de gestación en niveles aceptables pero por otra, ha contribuido a un aumento significativo en la proporción de embarazos múltiples en comparación con la población general, con las subsecuentes complicaciones clínicas que esto conlleva tanto para la madre como para el recién nacido, efecto que puede ser contrarrestado al realizar transferencia única o SET, pero que a su vez restringe las posibilidades de obtener una gestación en un ciclo.

Por tanto, es esencial que el embrión elegido a transferir sea el de mayor potencial evolutivo y aunque existen diversas metodologías orientadas a identificarlo, en la mayoría de los centros de TRA la selección se realiza teniendo en cuenta sólo los criterios morfológicos evaluados a través del microscopio (130) poniendo de manifiesto que es la calidad del embrión el mayor factor de predicción de éxito en estos tratamientos (131). No obstante, este método introduce un elemento importante de subjetividad y genera fluctuaciones y alteraciones en las condiciones del cultivo embrionario como resultado de su inevitable manipulación fuera de los incubadores. Además, ofrece la posibilidad de que los eventos que ocurren de manera breve y/o transitoria pasen inadvertidos por el

DISCUSIÓN

observador (68). Por otra parte, la mayoría de los esquemas que se emplean para la evaluación de la calidad embrionaria se basan en representaciones morfológicas y aunque se han publicado una gran cantidad de estudios, no ha sido posible llegar a ningún consenso en relación con cuál o cuales son los criterios más fiables para la evaluación de la calidad de los embriones.

Así pues, y aunque la selección de los embriones a transferir es decisiva, las características y los métodos para identificar los “embriones óptimos” continúan siendo pocos exhaustivos e imprecisos. Como resultado de estas limitaciones, algunos grupos de investigadores han centrado gran parte de sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren las posibilidades de obtener una gestación al seleccionar el mejor embrión dentro de una cohorte tanto desde el punto de vista de su calidad como de su competencia evolutiva. Es así como la posibilidad de registrar todo el desarrollo embrionario y analizarlo como un proceso dinámico y continuo, da cabida a los sistemas de *time-lapse*.

El análisis por *time-lapse* es utilizado por primera vez en el estudio de embriones de mamíferos (conejo) en el año 1924, cuando Lewis WH y Gregory PW (132) analizaron el comportamiento de estos embriones hasta el estadio de blastocisto, en el que observaron contracciones y expansiones periódicas mientras que, en embriones humanos fueron realizadas en el año de 1997 (68). Posteriormente, su incorporación en las TRA ha suscitado gran interés, en especial después del desarrollo de equipos adecuados para su aplicación en la rutina diaria de la embriología clínica lo que ha permitido el estudio de los acontecimientos que generalmente ocurren a una velocidad imperceptible para el ojo humano (133). Así mismo, minimiza las perturbaciones del medio de cultivo al integrar la incubación y la valoración embrionaria en un único dispositivo, brinda la oportunidad a los embriólogos de monitorizar los patrones dinámicos del desarrollo aportando

información adicional a los criterios habituales de selección y contribuye al establecimiento de asociaciones entre la incidencia de un fenómeno en un determinado momento y el posterior potencial evolutivo del embrión (134) superando así la subjetividad de las metodologías utilizadas actualmente.

A la fecha, son numerosos los estudios publicados que han utilizado esta técnica la mayoría de ellos se centran principalmente en las mediciones de los eventos asociados al desarrollo temprano del embrión (76,88,135,136) mientras que otros con base en un pequeño número de muestras (92), se han orientado a estudiar la formación de blastocisto (137).

Por esta razón en esta tesis doctoral, en la que se utiliza la base de datos más grande de la que se tiene conocimiento sobre el desarrollo de blastocistos humanos, se ha tratado de identificar los eventos del desarrollo embrionario asociados con la capacidad que tiene un embrión para llegar al estadio de blastocisto, continuar su desarrollo e implantar (Anexo I), principalmente porque la transferencia de embriones en etapas tardías permite una mejor selección y se asocia con mayores tasas de implantación en comparación con la transferencia de embriones en etapas tempranas (138,139),

Además, como lo demuestra una revisión realizada por Blake *et al.*, (140) existe diferencias significativas en cuanto a la tasa de nacidos vivos a favor de la transferencia en el estadio de blastocisto. Entre los argumentos que podrían explicar la diferencia en los resultados de las transferencias en D5 en comparación con las realizadas en D3 se encuentran: (1) esta estrategia permite una aproximación más fisiológica ya que representa la etapa del desarrollo en la que el embrión llega al útero materno en un ciclo no estimulado (141); (2) la selección embrionaria en días tardíos de cultivo presenta mayor fiabilidad en cuanto a la predicción de las tasas de éxito que la realizada en los

DISCUSIÓN

primeros 2-3 días del cultivo; (3) la prolongación del tiempo de cultivo hasta el día 5-6 post-ICSI, que corresponde al período después de la activación del genoma embrionario, ayuda a seleccionar aquéllos con una mayor probabilidad de supervivencia en el útero materno y ha demostrado ser eficaz con respecto a la prevención de embarazos múltiples. Finalmente, se conoce que más embriones cromosómicamente normales continúan su desarrollo a D5 o D6 en comparación con aquéllos que presentan alteraciones a este nivel (142).

Morfocinética, formación de blastocisto y potencial implantatorio.

Con una tasa de formación de blastocisto del 42.96 % que corresponden a 3215 embriones, hemos obtenido información sólida que nos permite afirmar que el potencial para alcanzar dicho estadio puede ser predicho durante las primeras 96 horas de cultivo gracias al tiempo de formación de la mórula (tM) que acompañada del tiempo de transición de un embrión de 5 a 8 células ($s_3 = t_8 - t_5$) hace posible clasificar esta probabilidad en cuatro categorías que van de la A a la D. De igual manera, nuestros resultados indican en general, que los tiempos de las divisiones de dos células al estadio de mórula ocurren progresivamente y primero (excepto t5) en embriones con capacidad de llegar a blastocisto en comparación con aquéllos que no lo hacen y son particularmente más rápidos durante la progresión de tres a cuatro células ($s_2 = t_4 - t_3$).

Igualmente evidenciamos, que la duración del segundo y tercer ciclo celular así como la variable $t_5 - t_2$ que comprende los dos ciclos celulares, son más largos en estos embriones que en aquéllos que presentan detención de su desarrollo antes de llegar a la fase final de blastocisto (70), de alguna forma estos datos demuestran lo que ha sido ya publicado por otros autores; Wong *et al.*, vieron como embriones que presentaban una

citocinesis normal se desarrollaban al estadio de blastocisto sin problemas, mientras que aquellos que presentaban una citocinesis alterada, con una duración ligeramente superior o de forma más prolongada, presentaron problemas para desarrollarse hasta el estadio de blastocisto, con un porcentaje elevado de embriones anormales, lo que permite resaltar una vez más, la importancia de un tiempo adecuado para llevar a cabo de una forma ordenada y eficiente la síntesis de ADN como parte fundamental del desarrollo. En consecuencia, los patrones temporales de los embriones que se desarrollan hasta la etapa más tardía de cultivo *in vitro*, muestran diferencias significativas indicando que los parámetros cinéticos representan una de las herramientas no invasivas más potentes y útiles para mejorar la selección de los embriones con mayor potencial en su desarrollo.

Así y teniendo en cuenta la importancia que existe en identificar de manera precisa aquellos embriones con capacidad para llegar hasta este estadio, nuestros resultados evidencian que los parámetros más predictivos son el tiempo de formación de mórula (tM: 81,28-96,6 horas post-ICSI) y s3 que corresponde a t8-t5 con un tiempo $\leq 8,78$ horas, generando así un nuevo modelo de clasificación lo suficientemente sólido y robusto (AUC de 0,849), basado en eventos tardíos del desarrollo embrionario.

También es importante resaltar, que durante este análisis no se ha considerado el grado de fragmentación embrionaria ni eventos del desarrollo que puedan comprometer el potencial evolutivo como son las divisiones celulares irregulares o la compactación reversa que podrían ser la razón por la cual, no todos los embriones que presentan tiempos óptimos para estas dos variables incluidas en el modelo alcanzan el estadio de blastocisto. En contraste, un pequeño porcentaje de embriones clasificados como D y por tanto, con bajo potencial de desarrollo, logran aún así llegar a este estadio, quizá debido

DISCUSIÓN

al margen tan estrecho entre los tiempos óptimos que clasifica a esos embriones con mejor o menor potencial de implantación.

Adicionalmente, en un intento de complementar la información existente acerca de los tiempos de las divisiones y la duración de los ciclos celulares obtenida por *time-lapse*, y teniendo en cuenta el estudio previo de Meseguer *et al.*,⁽⁷⁷⁾ contrastamos los tiempos para la formación de blastocisto con las tasas de implantación de 832 blastocistos transferidos de acuerdo con tM y t8-t5. De manera llamativa, nuestro modelo de selección desarrollado para la predicción de la formación de blastocisto no se correlaciona con las tasas de implantación (AUC 0,546).

Sin embargo, al añadir los tiempos de eventos tardíos del desarrollo como el tBE con la duración de la transición de un embrión de 5 células a ocho ($s3=t8-t5$) en la misma población de blastocistos transferidos, obtuvimos un nuevo modelo que logra establecer una relación con el potencial de implantación y clasifica los embriones en cuatro categorías claramente identificadas que van desde la A hasta la D, con un porcentaje descendiente de implantación. Aunque la mayor parte de los embriones son clasificados como C y D (n=731), son los clasificados como A y B los que presentan mejores resultados (72.2% y 66.2%) lo que permite resaltar que esta tecnología identifica con mayor eficiencia los embriones con mayor potencial implantatorio. No obstante, es necesario aclarar que este modelo debe considerarse una prueba con poco valor predictivo (AUC=0,591) en cuanto a herramienta diagnóstica para el resultado clínico embrionario se refiere.

Como resultado, proponemos dos modelos; el primer modelo fue desarrollado para identificar los embriones con mayor capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto, mientras que el segundo modelo, constituido por los blastocistos transferidos con un resultado clínico como punto final, fue desarrollado para predecir el potencial de implantación. Adicionalmente, nosotros utilizamos un grupo independiente de datos para validar el modelo de predicción de implantación y obtuvimos resultados muy similares, aunque el AUC fue ligeramente superior (AUC=0,596).

En definitiva y aunque las poblaciones de estudio (embriones y blastocistos) así como los puntos finales de los dos modelos (blastocisto e implantación) difieren, razones por las cuales es esperado que los eventos que los conforman sean diferentes, podemos decir que el modelo que predice el desarrollo a blastocisto puede positivamente ayudar a seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación y embarazo clínico.

Si bien es cierto que la implantación en un 100% de los casos es una utopía, resulta más difícil de explicar el por qué en las diferentes poblaciones de estudio una proporción de embriones que fueron clasificados como A o B dan lugar a fallos de implantación. Aunque una explicación podría ser los estrechos intervalos óptimos de tiempo para las divisiones celulares o como se menciona previamente, más allá del aspecto morfológico se encuentra el componente genético que no permite un embarazo evolutivo y que no puede ser evaluado en esta clasificación. Además de ambos aspectos citados no nos podemos olvidar del endometrio, que debe estar siempre receptivo para la implantación embrionaria (143-145).

DISCUSIÓN

Evaluación cuantitativa y morfológica de la calidad embrionaria en el estadio de blastocisto.

Teniendo en cuenta el poco valor predictivo del modelo utilizado para predecir la implantación en el estadio de blastocisto, nosotros incluimos la clasificación morfológica convencional; en consecuencia, tomamos en consideración las características morfológicas del blastocisto transferido en nuestro modelo morfocinético mediante análisis multivariable, para con ello evaluar cualquier valor adicional que pudiera aportar y como reflejan nuestros resultados de regresión logística, la morfología no agregó ni cambió la relación de nuestro modelo con el potencial de implantación.

Así pues y considerando que tanto la morfología como la morfocinética están relacionadas con el estadio de blastocisto, nuestros resultados revelan un comportamiento autónomo de ambos parámetros y la posibilidad de utilizarlos de forma independiente con un éxito similar, aunque la observación detallada revela un poco más fuerte nuestro modelo morfocinético.

Adicionalmente, cuando tuvimos en cuenta el sesgo potencial producido mediante la inclusión de las donantes, las cuales representan una población mucho más estable y homogénea y a su vez diferente diferente, éste fue considerado y controlado y no afectó la predicción de implantación de nuestro modelo.

Por otra parte, el incluir la clasificación morfológica de los blastocistos transferidos con resultados clínicos conocidos, nos permitió obtener información acerca de la distribución de los blastocistos implantados de acuerdo con su categoría

morfológica (A, B, C, D) en la que pudimos observar en primer lugar, unos porcentajes descendientes y homogéneos de implantación entre las diferentes categorías y en segundo lugar, que el número de embriones que son clasificados como categorías A y B representan más del 50% de la población mientras que mediante clasificación morfocinética ésta es tan solo del 12% y aún así las tasas de éxito son superiores.

Nuevas variables del segundo y tercer ciclo celular relacionadas con el estadio de blastocisto e implantación.

Con respecto a los patrones de división, hemos podido en primer lugar, realizar un seguimiento minucioso y preciso de cada célula para con ello determinar la duración del ciclo celular y con base en cuál inicia su tercer ciclo celular, hemos podido clasificarlos en seis posibles modelos de embriones que van desde la A a la F.

Adicionalmente, nuestros resultados han permitido identificar diferencias en los patrones temporales del segundo y tercer ciclo celular entre los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto y los que no lo lograron, pudiéndose determinar que los tiempos de cc2a, cc2b y SR2 se encuentran fuertemente asociados con la capacidad que presenta un embrión de desarrollarse hasta esta etapa, mientras que los tiempos del tercer ciclo celular (cc3c, cc3d y acc3) se correlacionan con la capacidad que estos embriones presentan para implantar.

Finalmente, consideramos importante señalar que nuestro estudio presenta algunos puntos a tener en cuenta; en primer lugar, aunque el porcentaje y el tipo de fragmentación han sido criterios tradicionales en la selección para la transferencia de embriones debido a sus implicaciones en el desarrollo del embrión (146) habría que considerar que los nuevos sistemas de *time-lapse* pueden detectar que la fragmentación de un embrión podría desaparecer a medida que avanza su desarrollo (69), es decir, es un

DISCUSIÓN

fenómeno reversible que, dada su variabilidad, no hemos considerado necesario su influencia en relación con la cinética del desarrollo. En segundo lugar, en este estudio no fue posible discriminar los resultados entre gestaciones monocigóticas y dicigóticas en la transferencia de dos blastocistos. En tercer y último lugar, el resultado clínico considerado en nuestro estudio como punto final no es el más representativo, y por el contrario, debería considerarse los nacidos vivos pero la limitación del tiempo no permitió hacer este seguimiento.

En resumen, los datos presentados en esta tesis doctoral aportan información adicional a tener en cuenta al conocimiento actual de los principales acontecimientos del desarrollo del embrión, por lo que es posible establecer, con precisión y objetividad, la base del desarrollo embrionario *in vitro* y fomenta la inclusión de los parámetros cinéticos al plantear un nuevo modelo de clasificación alternativa de los embriones a transferir y siendo que uno de los principales objetivos de un ciclo de FIV es la transferencia de un único embrión que culmine en el nacimiento de un bebé sano, se hace cada vez más necesaria la incorporación en las TRA de sistemas seguros y fiables de monitorización embrionaria como son los sistemas de *time-lapse* que permiten tener en cuenta que el desarrollo embrionario preimplantacional es un proceso eficiente y dinámico que involucra una serie de cambios morfológicos en intervalos de tiempo muy cortos, permitiéndonos detectar los mismos durante las primeras etapas del desarrollo.

Por tanto, su incorporación a la práctica habitual de los laboratorios de embriología supone una magnífica oportunidad de observar la actividad celular y el desarrollo embrionario de una manera coherente e ininterrumpida, ayuda a diferenciar entre embriones de similares características con distintas posibilidades de implantación,

constituye un punto de partida para la comprensión de diversos procesos y además, una fuente importante de información para identificar el embrión más competente.

DISCUSIÓN

6.

CONCLUSIONES.

CONCLUSIONES

1. El fenómeno de la compactación del embrión así como la sincronía del tercer ciclo celular son los eventos que con mayor poder condicionan y predicen la formación del blastocisto.
2. La predicción de la formación de blastocisto en base a su morfocinética no es una herramienta útil para seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación.
3. La morfocinética y la morfología son estrategias útiles para la selección del blastocisto a transferir, pero es la morfocinética la que demuestra tener un valor superior e independiente en relación al potencial de implantación.
4. La morfocinética permite establecer que los eventos del segundo ciclo celular se asocian con la capacidad del embrión de alcanzar el estadio de blastocisto.
5. Los eventos relacionados con del tercer ciclo celular se correlacionan con la capacidad embrionaria de implantar.

CONCLUSIONES

7.

ANEXOS

Anexo I

Trabajos publicados

Titulo	Revista	Año publicación
Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system.	Fertility and Sterility	Febrero 2017
How much have we learned from time-lapse in clinical IVF?	Molecular Human Reproduction	Octubre 2016

8.

BIBLIOGRAFÍA.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010 Mar 6;8:21-7827-8-21.
- (2) Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Hum Reprod* 2009 Nov;24(11):2683-2687.
- (3) Lunenfeld B, Van Steirteghem A, Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update* 2004 Jul-Aug;10(4):317-326.
- (4) Leridon H. Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology. *C R Biol* 2007 Apr;330(4):339-346.
- (5) Infections, pregnancies, and infertility: perspectives on prevention. World Health Organization. *Fertil Steril* 1987 Jun;47(6):964-968.
- (6) Rutstein, S.O., Macro, O.R.C. Infecundity, Infertility, and Childlessness in developing countries. *DHS Comparative Reports No.9*. 2004;9.
- (7) Schlegel PN. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecologica* 2009;61(4):261-283.
- (8) Alam N. Male factor infertility--basics revisited. *J Coll Physicians Surg Pak* 2009 Apr;19(4):205-206.

BIBLIOGRAFÍA

- (9) May-Panloup P, Malinge MC, Larget-Piet L, Chretien MF. Genetic male infertility and medically assisted reproduction. *Gynecol Obstet Fertil* 2001 Sep;29(9):583-593.
- (10) Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod* 2004 Jul;19(7):1548-1553.
- (11) Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science* 1986;233(4771):1389-1394.
- (12) Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, et al. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update* 2005 May-Jun;11(3):261-276.
- (13) Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinol Metab* 2007 Mar;18(2):58-65.
- (14) Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995 Aug;64(2):382-391.
- (15) Olsen J. Subfecundity according to the age of the mother and the father. *Danish Medical Bulletin* 1990;37(3):281-292.
- (16) Antman AM, Politch JA, Ginsburg ES. Conversion of high-response gonadotropin intrauterine insemination cycles to in vitro fertilization results in excellent ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* 2002 Apr;77(4):715-720.
- (17) Ajduk A, Zernicka-Goetz M. Advances in embryo selection methods. *F1000 Biol Rep* 2012;4:11-11. Epub 2012 Jun 1.

- (18) Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, Van Royen E, Van de Meerssche M, Valkenburg M. Prevention of twin pregnancy after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. *Hum Reprod* 1999 Oct;14(10):2581-2587.
- (19) *Acta Geneticae Medicae Gemellologicae*. A comparative study of twinning and triplet rates in 17 countries, 1972-1996; 1998.
- (20) Pison G, D'Addato AV. Frequency of twin births in developed countries. *Twin Res Hum Genet* 2006 Apr;9(2):250-259.
- (21) Schmidt L, Sobotka T, Bentzen JG, Nyboe Andersen A, ESHRE Reproduction and Society Task Force. Demographic and medical consequences of the postponement of parenthood. *Hum Reprod Update* 2012 Jan-Feb;18(1):29-43.
- (22) NCHS. National Centre for Health Statistics. 2010; Available at: <http://www.cdc.gov/nchs/VitalStats.htm>. Accessed 02/13/2015, 2015.
- (23) Ashley D, Samms-Vaughan M, Greenwood R, Golding J. The contribution of twins to perinatal mortality in Jamaica. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1994 Apr;8 Suppl 1:158-165.
- (24) Luke B. The changing pattern of multiple births in the United States: maternal and infant characteristics, 1973 and 1990. *Obstet Gynecol* 1994 Jul;84(1):101-106.
- (25) Beemsterboer SN, Homburg R, Gorter NA, Schats R, Hompes PG, Lambalk CB. The paradox of declining fertility but increasing twinning rates with advancing maternal age. *Hum Reprod* 2006 Jun;21(6):1531-1532.

BIBLIOGRAFÍA

- (26) Kupka MS, Ferraretti AP, de Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHREdagger. *Hum Reprod* 2014 Oct 10;29(10):2099-2113.
- (27) Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012 Sep;27(9):2649-2657.
- (28) Schatten G, Simerly C, Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 Jun;82(12):4152-4156.
- (29) Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, et al. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002 Aug;129(15):3533-3544.
- (30) Shitara H, Hayashi JI, Takahama S, Kaneda H, Yonekawa H. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics* 1998 Feb;148(2):851-857.
- (31) Sutovsky P, Schatten G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int Rev Cytol* 2000;195:1-65.
- (32) Dobson, AT., Raja, R., Abeyta, MJ., Taylor, T., Shen, S., Haqq, C., Pera RA. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Human Molecular Genetic*. 2004;13(14):1461-1470.

- (33) Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001 Nov;16(11):2357-2361.
- (34) Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999 May;14(5):1318-1323.
- (35) Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998 Apr;13(4):1003-1013.
- (36) Montag M, van der Ven H, German Pronuclear Morphology Study Group. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod* 2001 Nov;16(11):2384-2389.
- (37) Senn A, Urner F, Chanson A, Primi MP, Wirthner D, Germond M. Morphological scoring of human pronuclear zygotes for prediction of pregnancy outcome. *Hum Reprod* 2006 Jan;21(1):234-239.
- (38) Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999 Sep;14(9):2345-2349.
- (39) Ziebe, S., Petersen, K., Lindenberg, S., Andersen, AG., Gabrielsen, A., Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human reproduction (Oxford, England)* 1997;12(7):1545-1549.

BIBLIOGRAFÍA

- (40) Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997 Jul;12(7):1531-1536.
- (41) Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999 May;71(5):836-842.
- (42) Gardner, DK., Surrey, E., Minjarez, D., Leitz, A., Stevens ,J., Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertility and sterility* 2004;81(3):551-555.
- (43) Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003 Jun;18(6):1307-1312.
- (44) Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil Steril* 2000 Aug;74(2):282-287.
- (45) Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003 May-Jun;9(3):251-262.
- (46) Griffin DK, Handyside AH, Harper JC, Wilton LJ, Atkinson G, Soussis I, et al. Clinical experience with preimplantation diagnosis of sex by dual fluorescent in situ hybridization. *J Assist Reprod Genet* 1994 Mar;11(3):132-143.

(47) Harper JC, Coonen E, Ramaekers FC, Delhanty JD, Handyside AH, Winston RM, et al. Identification of the sex of human preimplantation embryos in two hours using an improved spreading method and fluorescent in-situ hybridization (FISH) using directly labelled probes. *Hum Reprod* 1994 Apr;9(4):721-724.

(48) Munne S, Cohen J. Unsuitability of multinucleated human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1993 Jul;8(7):1120-1125.

(49) Ebner T, Balaban B, Moser M, Shebl O, Urman B, Ata B, et al. Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development. *Fertil Steril* 2010 Aug;94(3):913-920.

(50) de Almeida Ferreira Braga DP, de Cassia Savio Figueira R, Queiroz P, Madaschi C, Iaconelli A,Jr, Borges E,Jr. Zona pellucida birefringence in in vivo and in vitro matured oocytes. *Fertil Steril* 2010 Nov;94(6):2050-2053.

(51) Madaschi C, Aoki T, de Almeida Ferreira Braga DP, de Cassia Savio Figueira R, Semiao Francisco L, Iaconelli A,Jr, et al. Zona pellucida birefringence score and meiotic spindle visualization in relation to embryo development and ICSI outcomes. *Reprod Biomed Online* 2009 May;18(5):681-686.

(52) Montag M, van der Ven H. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. *Reprod Biomed Online* 2008 Oct;17(4):454-460.

(53) Ciray HN, Coban O, Bayram A, Kizilkanat A, Bahceci M. Preliminary study of embryo development following assessment of male and female gametes. *Reprod Biomed Online* 2008 Jun;16(6):875-880.

BIBLIOGRAFÍA

- (54) Tejera A, Herrero J, Vilorio T, Romero JL, Gamiz P, Meseguer M. Time-dependent O₂ consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertil Steril* 2012 Oct;98(4):849-57.e1-3.
- (55) Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N, Meseguer M. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril* 2011 Sep;96(3):618-623.e2.
- (56) McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, et al. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod* 2004 Dec;19(12):2869-2874.
- (57) Uyar A, Torrealday S, Seli E. Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertil Steril* 2013 Mar 15;99(4):979-997.
- (58) Fragouli E, Wells D. Transcriptomic analysis of follicular cells provides information on the chromosomal status and competence of unfertilized oocytes. *Expert Rev Mol Diagn* 2012 Jan;12(1):1-4.
- (59) Katz-Jaffe MG, Gardner DK. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception? *Reprod Biomed Online* 2008 Oct;17(4):497-501.
- (60) Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A, Simon C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008 Sep;23(9):1993-2000.
- (61) Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simon C. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in

human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 2010 Feb;93(3):774-782.e1.

(62) Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, et al. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002 Apr;17(4):999-1005.

(63) Sturmey RG, Brison DR, Leese HJ. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reprod Biomed Online* 2008 Oct;17(4):486-496.

(64) Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L, Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, et al. HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of pregnancy. *Eur J Immunol* 2002 Feb;32(2):311-315.

(65) Heidari MH, Novin MG, Ahmadi F, Khorshid M, Najafi T, Molouki A, et al. Increase in concentration of soluble HLA-G in high-quality embryos after intracytoplasmic sperm injection. *Anat Cell Biol* 2011 Dec;44(4):331-336.

(66) Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967 Jun;17(3):481-490.

(67) Massip A, Mulnard J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fertil* 1980 Mar;58(2):475-478.

(68) Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997 Mar;12(3):532-541.

BIBLIOGRAFÍA

- (69) Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008 Dec;199(6):660.e1-660.e5.
- (70) Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010 Oct;28(10):1115-1121.
- (71) Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, Losonczy E, Zadori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010 Oct;21(4):533-536.
- (72) Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998 Jan;13(1):182-187.
- (73) Liu Y, Chapple V, Roberts P, Ali J, Matson P. Time-lapse videography of human oocytes following intracytoplasmic sperm injection: events up to the first cleavage division. *Reprod Biol* 2014 Dec;14(4):249-256.
- (74) Aguilar J, Motato Y, Escriba MJ, Ojeda M, Munoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online* 2014 Apr;28(4):475-484.
- (75) Ebner, T. Montag, M. Pribensky, C. Tan, L. Aparicio-Ruiz, B. Freour, T. Tejera, A. Morbeck, D. Zaninovic, N. Coticcio, G. Time-Lapse Microscopy in In-Vitro Fertilization. 1st ed.: Cambridge University; 2016.

- (76) Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008 Sep;17(3):385-391.
- (77) Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011 Oct;26(10):2658-2671.
- (78) Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet* 1998 Mar;15(3):129-139.
- (79) Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012 Dec;98(6):1458-1463.
- (80) Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril* 2014 Jun;101(6):1637-48.e1-5.
- (81) Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P. Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertil Steril* 2014 Nov;102(5):1295-1300.e2.
- (82) Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun* 2012;3:1251.

BIBLIOGRAFÍA

- (83) Stensen MH, Tanbo TG, Storeng R, Abyholm T, Fedorcsak P. Fragmentation of human cleavage-stage embryos is related to the progression through meiotic and mitotic cell cycles. *Fertil Steril* 2015 Feb;103(2):374-81.e4.
- (84) Pereda J, Cheviakoff S, Croxatto HB. Ultrastructure of a 4-cell human embryo developed in vivo. *Hum Reprod* 1989 Aug;4(6):680-688.
- (85) Fujimoto VY, Browne RW, Bloom MS, Sakkas D, Alikani M. Pathogenesis, developmental consequences, and clinical correlations of human embryo fragmentation. *Fertil Steril* 2011 Mar 15;95(4):1197-1204.
- (86) Hardarson T, Lofman C, Coull G, Sjogren A, Hamberger L, Edwards RG. Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod Biomed Online* 2002 Jul-Aug;5(1):36-38.
- (87) Ivec M, Kovacic B, Vlaisavljevic V. Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil Steril* 2011 Dec;96(6):1473-1478.e2.
- (88) Iwata K, Yumoto K, Sugishima M, Mizoguchi C, Kai Y, Iba Y, et al. Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J Assist Reprod Genet* 2014 Apr;31(4):421-426.
- (89) Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013 May;26(5):477-485.

- (90) Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, 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 Nov;25(5):474-480.
- (91) Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol* 2014 Jun 20;12:54-7827-12-54.
- (92) 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 Oct;28(10):2643-2651.
- (93) Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012 Oct;25(4):382-389.
- (94) Basile N, Morbeck D, Garcia-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013 Mar;28(3):634-641.
- (95) Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod* 2014 Dec;29(12):2650-2660.
- (96) Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012 May;27(5):1277-1285.

BIBLIOGRAFÍA

- (97) Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, de los Santos MJ, Meseguer M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril* 2013 Dec;100(6):1602-9.e1-4.
- (98) Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012 Oct;25(4):371-381.
- (99) Hlinka D, Kalatova B, Uhrinova I, Dolinska S, Rutarova J, Rezacova J, et al. Time-lapse cleavage rating predicts human embryo viability. *Physiol Res* 2012 Dec 14;61(5):513-525.
- (100) Milewski R, Kuc P, Kuczynska A, Stankiewicz B, Lukaszuk K, Kuczynski W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2015 Apr;32(4):571-579.
- (101) Basile N, Nogales Mdel C, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril* 2014 Mar;101(3):699-704.
- (102) Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, Garcia Velasco JA, Remohi J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod* 2015 Feb;30(2):276-283.

- (103) Freour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barriere P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril* 2013 Jun;99(7):1944-1950.
- (104) Bernardi ML, Delouis C. Sex-related differences in the developmental rate of in-vitro matured/in-vitro fertilized ovine embryos. *Hum Reprod* 1996 Mar;11(3):621-626.
- (105) Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C, Callesen H. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology* 1998 Dec;50(8):1285-1299.
- (106) Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011 Feb;95(2):520-524.
- (107) Weston G, Osianlis T, Catt J, Vollenhoven B. Blastocyst transfer does not cause a sex-ratio imbalance. *Fertil Steril* 2009 Oct;92(4):1302-1305.
- (108) Bronet F, Nogales MC, Martinez E, Ariza M, Rubio C, Garcia-Velasco JA, et al. Is there a relationship between time-lapse parameters and embryo sex? *Fertil Steril* 2015 Feb;103(2):396-401.e2.
- (109) Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011 Jul;28(7):569-573.
- (110) Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared

BIBLIOGRAFÍA

with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012 Dec;98(6):1481-9.e10.

(111) Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010 Feb;27(2-3):93-96.

(112) Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Hum Reprod* 2002 Dec;17(12):3142-3148.

(113) Vilorio T, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Sperm selection by swim-up in terms of deoxyribonucleic acid fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test is altered in heavy smokers. *Fertil Steril* 2007 Aug;88(2):523-525.

(114) Budak E, Garrido N, Soares SR, Melo MA, Meseguer M, Pellicer A, et al. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertil Steril* 2007 Aug;88(2):342-349.

(115) Bellver J, Ayllon Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, et al. Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril* 2010 Feb;93(2):447-454.

(116) Abdalla HI, Brooks AA, Johnson MR, Kirkland A, Thomas A, Studd JW. Endometrial thickness: a predictor of implantation in ovum recipients? *Hum Reprod* 1994 Feb;9(2):363-365.

(117) Remohí, J., Gartner, B., Gallardo, E., Yalil, S., Simón, C., Pellicer A. Pregnancy and birth rates after oocyte donation. *Fertility and sterility* 1997;67(4):717-723.

(118) Escribá, MJ., Bellver, J., Bosch, E., Sánchez, M., Pellicer, A., Remohí J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertility and sterility* 2006;86(1):92-97.

(119) Domingo, J., Castellón, G., Bosch, E., Reis, S., Remohí, J. Preparación Endometrial en receptoras de ovocitos. In: Remohí, J., Bellver, J., Domingo, J., Bosch, E., Pellicer, A., editor. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*. 3a ed. España: MacGraw-Hill; 2007. p. 319-327.

(120) World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010 (Fifth edition).

(121) Gorus FK, Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981 Jun;35(6):662-665.

(122) Harris SJ, Milligan MP, Masson GM, Dennis KJ. Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). *Fertil Steril* 1981 Aug;36(2):219-221.

(123) Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000 Dec;15(12):2634-2643.

BIBLIOGRAFÍA

- (124) Gardner DK, Schoolcraft WB. Human embryo viability: what determines developmental potential, and can it be assessed? *J Assist Reprod Genet* 1998 Sep;15(8):455-458.
- (125) ASEBIR Interest Group in Embryology. Cuadernos de Embriología Clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. 2nd ed.; 2008.
- (126) Zegers-Hochschild F, Nygren KG, Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Mansour R, et al. The ICMART glossary on ART terminology. *Hum Reprod* 2006 Aug;21(8):1968-1970.
- (127) Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978 Aug 12;2(8085):366.
- (128) Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, Bhattacharya S, Castilla JA, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012 Sep;27(9):2571-2584.
- (129) Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010 Jul;94(2):535-542.
- (130) Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* 2011 Sep;32 Suppl 3:S252-6.
- (131) Walker MC, Murphy KE, Pan S, Yang Q, Wen SW. Adverse maternal outcomes in multifetal pregnancies. *BJOG* 2004 Nov;111(11):1294-1296.

- (132) Lewis WH, Gregory PW. Cinematographs of Living Developing Rabbit-Eggs. *Science* 1929 Feb 22;69(1782):226-229.
- (133) Ezin M, Fraser S. Time-lapse imaging of the early avian embryo. *Methods Cell Biol* 2008;87:211-236.
- (134) Yamagata K, Suetsugu R, Wakayama T. Long-term, six-dimensional live-cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term development. *J Reprod Dev* 2009 Jun;55(3):343-350.
- (135) Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002 Feb;17(2):407-412.
- (136) Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1994 Sep;9(9):1743-1748.
- (137) Wong C, Chen AA, Behr B, Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod Biomed Online* 2013 Feb;26(2):120-129.
- (138) Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R, Tucker MJ. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril* 2000 Sep;74(3):495-497.
- (139) Scholtes MC, Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996 Jun;65(6):1245-1248.

BIBLIOGRAFÍA

(140) Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 Oct 17;(4)(4):CD002118.

(141) Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998 Jan;69(1):84-88.

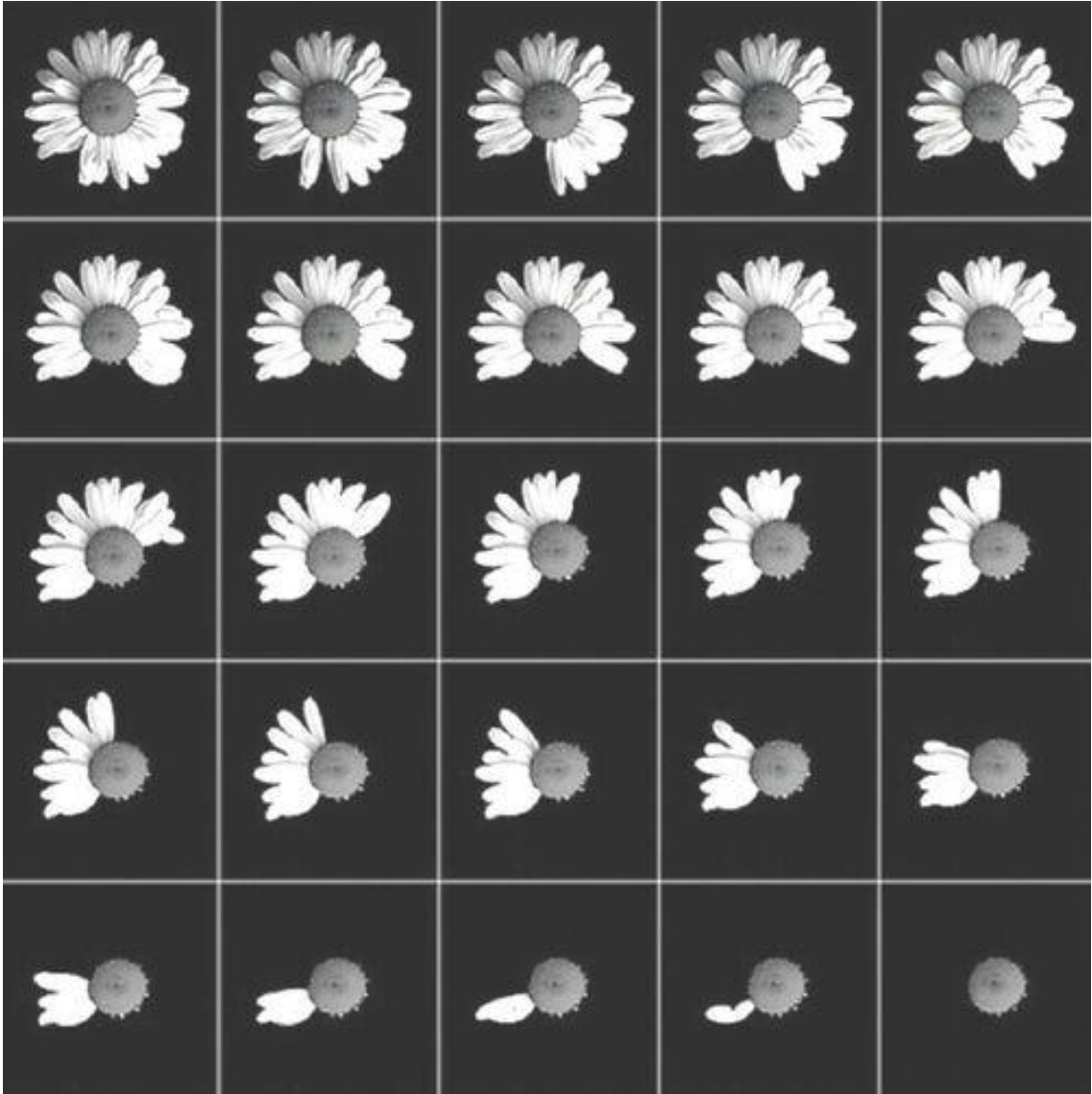
(142) Mercader A, Garcia-Velasco JA, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril* 2003 Nov;80(5):1162-1168.

(143) Devyatova EA, Tsaturova KA, Vartanyan EV. Predicting of successful implantation at IVF cycles. *Gynecol Endocrinol* 2016 Oct;32(sup2):27-29.

(144) Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, et al. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 2004 Jun;25(3):341-373.

(145) Wilcox AJ, Baird DD, Weinberg CR. Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. *N Engl J Med* 1999 Jun 10;340(23):1796-1799.

(146) Alikani M., the originals and consequences of fragmentation in mammalian eggs and embryos, in *Preimplantation Embryo Evaluation and selection*. In: Elder and Cohen, editor. ; 2007. p. 89-100.





VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA