



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Línea de Investigación: Infertilidad femenina, masculina y técnicas de reproducción asistida

Validación clínica de la cinematografía como nuevo método de selección embrionaria

Presentada por:

M^a Irene Rubio Palacios, para optar al título de Doctor por la Universidad de Valencia

Dirigida por:

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

Dr. José Remohí Giménez

Dra. Aránzazu Galán Rivas

Valencia, Mayo 2017

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

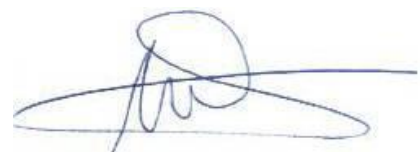
Doctor Europeo en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y profesor del Master en Biotecnología de la Reproducción Humana del Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado “Validación clínica de la cinematografía como nuevo método de selección embrionaria”, ha sido realizado íntegramente por Doña María Irene Rubio Palacios, bajo mi dirección compartida con la Dra. Aránzazu Galán Rivas y el Dr. José Remohí Giménez. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de Doctor en Biotecnología

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, a 29 de Mayo de 2017

Fdo. Dr. Marcos Meseguer Escrivá

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large, stylized initial 'M' followed by a horizontal line that extends to the right and then loops back under the 'M'.

Dr. D. José Remohí Giménez

Doctor en Medicina por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia, Catedrático de la Universidad de Valencia del área de Ginecología y Obstetricia y Director del Máster en Cirugía Endoscópica Ginecológica Avanzada de la Universidad de Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado “Validación clínica de la cinematografía como nuevo método de selección embrionaria”, ha sido realizado íntegramente por Doña María Irene Rubio Palacios, bajo mi dirección compartida con el Dr. Marcos Meseguer Escrivá y la Dra. Aránzazu Galán Rivas. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, a 29 de Mayo de 2017

Fdo. Dr. José Remohí Giménez



Dra. D^a. Aránzazu Galán Rivas

Doctora en Ciencias Químicas por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y profesora del Master en Biotecnología de la Reproducción Humana del Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

CERTIFICO QUE:

El trabajo de tesis doctoral titulado “Validación clínica de la cinematografía como nuevo método de selección embrionaria”, ha sido realizado íntegramente por Doña María Irene Rubio Palacios, bajo mi dirección compartida con el Dr. Marcos Meseguer Escrivá y el Dr. José Remohí Giménez. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de Doctor en Biotecnología.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, a 29 de Mayo de 2017

Fdo. Dra. Aránzazu Galán Rivas

A handwritten signature in black ink, enclosed in a large, loopy oval shape. The signature appears to read 'Aránzazu Galán Rivas'.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a mis directores de tesis su paciencia, buen hacer y motivación, ya que no han dudado en ningún momento acerca de mi capacidad y así me lo han sabido transmitir. Gracias en particular a Marcos Meseguer, por haberme brindado la oportunidad de investigar, por haber compartido generosamente las oportunidades que se han ido presentando para incrementar mi conocimiento y curiosidad, y por haber depositado su confianza en mi cuando era poco más que una joven estudiante con ganas de aprender.

Gracias también a los profesionales de la embriología que he ido encontrando en mi camino, en particular al laboratorio de FIV de IVI Valencia, ya que de ellos he aprendido prácticamente todo lo que sé en cuanto a la práctica clínica. Me siento afortunada de pertenecer a una institución en la que clínica, investigación y últimas tecnologías van de la mano, y que nos brinda la oportunidad de crecer con ella afrontando nuevos retos.

En un plano más personal, quiero agradecer a mis padres el haberme enseñado a pelear por mis objetivos, a “salir” del problema para ser capaz de buscar soluciones con perspectiva. Gracias por enseñarme a caminar con paso corto y vista larga. Es sencillo seguir esas pautas cuando el ejemplo está presente. A mi hermana, otro ejemplo de tesón, por confiar en mi y tener siempre una palabra de aliento cuando flojeo. A mi marido, con quien partí del km 0 en la Embriología y con quien he crecido en lo personal y lo profesional, porque somos un equipo y juntos nunca nada será demasiado difícil de afrontar. Y por último a mis hijos, porque en su corta experiencia vital ya me han enseñado que este mundo es de los valientes.

Índice

1. Introducción General

1.1. La infertilidad.

1.2. Técnicas de Reproducción Asistida

1.3. La problemática de la “selección embrionaria”

1.4. Marcadores de calidad embrionaria

1.4.1.- Marcadores clásicos no invasivos

1.4.2.- Nuevos marcadores no invasivos

1.4.2.1.- Respiración ovocitaria.

1.4.2.2.- Recambio de aminoácidos.

1.4.2.3.- Las “-ómicas” como herramientas de investigación.

1.4.2.4.- Marcadores morfocinéticos y tecnología Time-lapse

2. Revisión de los ensayos recientes sobre selección de embriones viables para transferencia -

Análisis integral de tecnología de imagen time-lapse

2.1. Imagen time-lapse

2.1.1.- Ventajas e inconvenientes de los sistemas time-lapse

2.1.1.- Sistemas time-lapse disponibles

2.2. El time-lapse como herramienta de selección. Aplicación en embriología

2.2.1.- Estudios sobre cinética embrionaria

2.2.2.- Time-lapse y evaluación clínica embrionaria

2.2.3.- El “lenguaje” time-lapse

2.3. Conclusiones

3. Análisis del impacto de los criterios de exclusión de un método de selección sobre los resultados clínicos. Un estudio basado en el fenómeno de división directa de una a tres células.

3.1. Material y métodos

3.1.1.- Punción ovárica, decumulación e ICSI

3.1.2.- Cultivo y evaluación embrionaria

3.1.3.- Transferencia e implantación

3.1.4.- Parámetros morfocinéticos analizados

3.1.5.- Análisis estadístico

3.2. Resultados

3.2.1.- Resultados clínicos

3.2.2.- Incidencia de la división directa e implantación

3.2.3.- Tiempos de división

3.3. Discusión

4. Comparación entre el cultivo y selección de embriones en sistema convencional y en sistema time-lapse.

4.1. Material y métodos

4.1.1.- Estimulación y punción ovárica

4.1.2.- Decumulación e ICSI

4.1.3.- Cultivo embrionario

4.1.4.- Clasificación embrionaria y selección

4.1.5.- Transferencia embrionaria

4.1.6.- Análisis estadístico

4.2. Resultados

4.2.1.- Análisis de las tasas de embarazo

4.2.2.- Análisis de los factores de confusión

4.2.3.- Tasa de cancelación

4.2.4.- Análisis de regresión logística

4.3. Conclusión

5. Validación clínica del cultivo y selección de embriones en el sistema time-lapse EmbryoScope®

5.1. Material y métodos

5.1.1.- Estimulación y punción ovárica

5.1.2.- ICSI y cultivo embrionario

5.1.3.- Evaluación y selección embrionaria

5.1.4.- Resultados clínicos

5.1.5.- Tamaño muestral y análisis estadístico

5.2. Resultados

5.2.1.- Características descriptivas de pacientes, donantes y receptoras en el grupo TMS y el SI

5.2.2.- Características des desarrollo embrionario en el grupo TMS y el SI

5.2.3.- Correlación entre categorías morfológicas y categorías time-lapse

5.2.4.- Resultados clínicos

5.3. Discusión

6. Resumen global de los resultados obtenidos

7. Conclusiones generales

8. Bibliografía

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1. La infertilidad.

La historia de la infertilidad va de la mano de la historia de la humanidad misma. Ya en el libro del Génesis se encuentra referencia escrita a ella, relatando el caso de Abraham y Sara, y desde el Paleolítico se conocen referencias a la fertilidad de la mujer y su capacidad de engendrar hijos. Tuvieron que pasar más de 19 siglos para que el avance de la ciencia médica durante la segunda mitad del siglo XIX pudiera comenzar a ofrecer soluciones a las parejas afectadas. El hecho de que P. Steptoe y R. Edwards lograsen en 1978 el primer embarazo con técnicas de fecundación *in vitro* y posterior transferencia de embriones al útero (Steptoe 1978) supuso para la comunidad científica la posibilidad de intervenir eficazmente en el proceso reproductivo humano hecha realidad. Desde entonces, miles de parejas infértiles que hasta ese momento se veían imposibilitadas para tener hijos han recurrido a estos procedimientos como un camino real hacia la paternidad.

Desde el punto de vista médico, la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la infertilidad como una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de doce meses o más de relaciones sexuales no protegidas. Se define como infertilidad primaria cuando no es posible lograr un embarazo en 1-2 años sin gestación previa, e infertilidad secundaria cuando se cumplen los criterios de infertilidad primaria pero habiéndose logrado gestación en algún momento previo (Rowe, 1993). Se estima que en la actualidad la infertilidad en general afecta a más de 186 millones de personas en el mundo (Inhorn 2015) de manera que se trata de un problema que continúa estando presente, un reto para la biomedicina y un camino arduo para las parejas que lo atraviesan. Los motivos que propician un aumento de la necesidad de técnicas de reproducción asistida (TRA) para resolver los problemas relacionados con la infertilidad son diversos y afectan de diferente manera a la población. Mientras que en los países del primer mundo el desarrollo educacional y profesional de la mujer ha postergado la edad a la que desea ser madre, y por tanto la incidencia de

infertilidad primaria es mayor, en los países subdesarrollados este problema no es frecuente, pero sí una altísima incidencia de enfermedades de transmisión sexual que derivan en infertilidad secundaria, así como la dificultad para acceder a unas prestaciones sanitarias higiénicas.

Si bien es cierto que el avance en las TRA ha implicado poner una nueva tecnología en constante evolución al servicio de la población, su existencia sumada al uso de contraceptivos ha supuesto una percepción de control de la fertilidad. Ello lleva implícita la idea de poder recuperarla a voluntad, no siendo necesariamente así y mucho menos cuando va directamente ligada a la edad. Por todo ello, parece que la tendencia es a no disminuir, sino todo lo contrario. Esto implica un enorme esfuerzo a nivel médico, por las dificultades que entraña su diagnóstico y el tratamiento de los desórdenes reproductivos de cada miembro de la pareja; a nivel estatal, porque se trata de un problema de carácter público que repercute sobre los servicios sociales y sanitarios de un país, y a nivel tecnológico, en la búsqueda de progresos que aporten soluciones a la mayor parte de parejas infértiles. También ha supuesto la aparición de ciertas cuestiones médicas, éticas y sociales que precisan de la atención no sólo de los profesionales sanitarios sino de la sociedad como conjunto, y ahora tiene la responsabilidad de asegurar que los avances conseguidos a través de las TRA se implanten de una manera responsable (Brezina 2011).

1.2. Técnicas de Reproducción Asistida

En el mismo año del nacimiento de Louis Brown, en 1978, Alex Lopata describió en Melbourne, Australia, el primer ciclo ovárico estimulado mediante citrato de clomifeno (CC) (Lopata 1980), en 1980 la OMS publicó el “Manual de laboratorio para el examen del semen humano y la interacción de semen y mucus cervical” (Al-Nuaim L, 2007) y Alan Handyside introdujo el análisis genético preimplantacional (PGD) para identificar embriones genéticamente anormales mediante biopsia embrionaria. En 1982 ocurrió el primer nacimiento tras inseminación uterina artificial (IA), y ese mismo año se empezaron a usar medios de cultivo para el desarrollo de los gametos y embriones. En 1983 se registraron los primeros nacimientos mediante donación de

óvulos y embriones (Trounson, 1983), se desarrolló la técnica de maduración in vitro de ovocitos (Veeck 1983) y ese mismo año el grupo australiano de Monash IVF reportó el primer embarazo tras la transferencia de un embrión congelado (Trounson 1983). No fue hasta 1992 cuando se alcanzó uno de los mayores hitos en la historia de la reproducción asistida: Palermo y Van-Steirteghem consiguieron en Bruselas el primer embarazo exitoso tras inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Palermo 1992). En ese mismo año se documentó el nacimiento de dos bebés provenientes de espermatozoides aspirados del epidídimo y un año después se publicó el primer caso de descendencia mediante el uso de extracción espermática testicular (TESE) más ICSI en un hombre con azoospermia no-obstructiva.

En 1994 el grupo de Alan Trounson en Australia consiguió la maduración in vitro (IVM) y fecundación en ovocitos de mujeres no ovuladoras con síndrome de ovario poliquístico (PCOS) (Trounson 1994). El año siguiente, en 1995, se documentó el primer nacimiento humano tras maduración in vitro, ICSI y hatching asistido (Barnes et al, 1995). También en 1995 Jacques Cohen publicó los resultados del primer test de aneuploidías.

En 1997 se publicó uno de los casos más mediáticos en la historia de la reproducción asistida: Ian Wilmut y Keith Campbell consiguieron clonar una oveja (Dolly) en Escocia usando células de las glándulas mamarias de una oveja adulta y un ovocito enucleado (Wilmut, 1997).

Los avances en los años siguientes fueron innumerables: los primeros embarazos tras el uso de FSH recombinante y antagonistas de la GnRH, se lanza el programa para la secuenciación del ADN del cromosoma humano (Human Genome Project), nace el primer bebé a partir de ovocitos vitrificados y de alguna manera se cierra un ciclo cuando en mayo de 1999 nace Casey.

La hermana de Louise Brown, Natalie, fue concebida también a través de Técnicas de Reproducción Asistida en 1982 y su bebé fue el primero concebido de manera natural de una madre proveniente de TRA. En 2006 Louise Brown seguiría sus pasos concibiendo también de forma natural a su primer hijo, Cameron, en el Reino Unido. (Kamel 2013)

Como se puede concluir tras este breve resumen de los hitos en la historia de la Reproducción Asistida, los buenos resultados con los que contamos hoy en día son debidos a un conjunto de avances a distintos niveles: mejoras en los métodos de cultivo, optimización de las condiciones del laboratorio e introducción de nuevas tecnologías. Entre ellas destacan por un lado el diagnóstico genético preimplantacional (DGP), desarrollado para detectar anomalías genéticas en los embriones. Y por otro lado, los avances en las técnicas de criopreservación, tanto en ovocitos como en embriones. Un buen sistema de cultivo embrionario añadido a un programa de congelación con resultados estables es fundamental para maximizar las tasas acumuladas de gestación por ciclo estimulado. Si a ello se le añade la optimización en la selección embrionaria, se obtiene un mayor rendimiento de embriones de buena calidad, lo que permite al embriólogo reducir el número de embriones transferidos.

Otro de los avances tecnológicos de los últimos tiempos ha sido la introducción de los sistemas time-lapse en los laboratorios de fecundación *in vitro*. Los criterios de selección morfológica clásica se basan en observaciones puntuales de parámetros tales como el número de células y la simetría. Estos parámetros están correlacionados con las tasas de gestación pero no implican una selección del todo fiable ya que, por un lado, el valor predictivo de estos criterios clásicos de selección no es perfecto, y por otro lado, se ha estimado que entre el 50-70% de los embriones no alcanzan el estadio de blastocisto (French 2010)(Gardner 2000). Esto apoya la teoría de que incluso tratándose de embriones con buen aspecto morfológico, sólo una pequeña fracción de estos embriones está destinada a convertirse en un recién nacido vivo (Patrizio 2009).

Esta limitación a la hora de distinguir con fiabilidad entre embriones competentes y embriones con limitaciones de desarrollo o de implantación, ha llevado a la necesidad de desarrollar nuevas líneas de investigación, siendo una de las más novedosas el uso de la tecnología time-lapse. En 2011 se produjo un hito en esta disciplina: Unisense Fertilitech introdujo un novedoso sistema de monitorización para observar de forma continuada el desarrollo embrionario a lo largo de las

horas de cultivo, el EmbryoScope®. En Diciembre de ese año, en el Cleveland Reproductive Center de Ohio, Estados Unidos, nacieron los primeros gemelos en los cuales se utilizó esta tecnología. Dos años después, en 2013, Alison Campbell, embrióloga senior británica, introdujo la tecnología time-lapse en las etapas tempranas del desarrollo embrionario como método para seleccionar y transferir embriones con aspecto óptimo sin necesidad de biopsiarlos y hacerles el diagnóstico genético preimplantacional (DGP) en casos de fallos de FIV recurrente (Campbell et al, 2013).

Una vez enumerados los cambios experimentados en los laboratorios de FIV, quizá lo más importante sea la evolución conceptual que han experimentado, pasando de métodos muy básicos al rigor basado en la evidencia científica. Hasta hace relativamente poco todos los esfuerzos se encaminaban a tener un control preciso sobre variables como la temperatura, la iluminación, la composición de los medios de cultivo o la concentración de gases en el interior de los incubadores. Hoy, el control de estas variables se considera aspecto de obligado cumplimiento pero se ha trascendido a un nivel superior en el que se busca la excelencia basada en la eficiencia. Ya no se trata tan solo de conseguir un embarazo sino de finalizar el tratamiento con un niño sano sin perjuicio para su salud o el de su madre durante el tratamiento y posterior embarazo.

1.3. La problemática de la “selección embrionaria”

Tras esta breve descripción de algunos de los principales avances ocurridos en los casi 40 años de andadura de la Reproducción Asistida en humanos, resulta evidente la mejora de los resultados clínicos obtenidos. Aún así todavía hay limitaciones en las TRA. Hay ciertos aspectos de estos tratamientos que continúan sin resolverse, siendo una limitación importante el hecho de que sólo entre el 10-20% de los embriones transferidos al útero sean capaces de dar lugar a un embarazo a término (Mackoln 2002) (Evers 2002) Por este motivo es crucial el

perfeccionamiento de los métodos de selección embrionaria ya que es necesario, por un lado reducir el número de embriones transferidos, y por otro, identificar aquellos con el mayor potencial de implantación. Esto constituye un gran reto considerando que la reducción en el número de embriones transferidos podría poner en peligro las tasas globales de éxito de los programas de FIV, y muchas veces son los propios pacientes los que rechazan la transferencia de un único embrión en aras de aumentar sus probabilidades de embarazo sin tener en cuenta los riesgos asociados.

A continuación se describen brevemente los marcadores clásicos que han sido utilizados para valorar calidad embrionaria en los últimos 30 años así como aquellos que han sido introducidos más recientemente.

1.4. Marcadores de calidad embrionaria

1.4.1.- Marcadores clásicos no invasivos

La evolución de los métodos de observación embrionaria no ha experimentado grandes cambios en los últimos 30 años. De hecho, la evaluación morfológica, aunque imperfecta, es actualmente el método más popular de selección embrionaria previo a la transferencia. Históricamente, el embriólogo se ha basado en las observaciones realizadas al microscopio óptico en momento puntuales del desarrollo embrionario para describir las características morfológicas de un embrión como potencial indicador de viabilidad. Este método de evaluación comprende el análisis de los gametos y embriones en etapas puntuales del desarrollo comenzando con los ovocitos y los espermatozoides, seguido de los cigotos en pronúcleos y de las sucesivas divisiones embrionarias hasta ser transferidos (bien sea en día 2 o 3 de desarrollo, o más avanzado, en estadio de blastocisto). Los parámetros incluidos clásicamente serían: el aspecto citoplasmático del ovocito, el estudio morfológico del espermatozoide y su motilidad, el número y aspecto de los pronúcleos en el cigoto, y ya en los

embriones el número, tamaño y simetría de las células, grado de fragmentación y número y aspecto de núcleos celulares. Adicionalmente se han estudiado otros marcadores como división temprana (Rienzi et al. 2005). Una vez obtenidos estos parámetros se comenzó intentado confeccionar escalas numéricas de clasificación por puntos (Giorgetti C, 1995), pero toda clasificación de este tipo es subjetiva y debe ser contrastada con los resultados propios de cada laboratorio. La Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) publicó en 2007 unos criterios para la valoración de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos. Esta clasificación distingue embriones de cuatro tipos según sus características morfológicas y trata de tener en cuenta la evolución dinámica de los embriones, de forma que muchas características del tercer día de desarrollo (D3) se interpretan en función del aspecto del mismo embrión en el segundo día de desarrollo (D2), y lo mismo ocurre en las etapas de blastocisto. Por lo tanto, en esta clasificación uno de los aspectos más importantes es el momento en el que se hace la evaluación.

Mientras que el examen morfológico tiene la ventaja de ser un método sencillo, no invasivo y rápido, presenta el inconveniente de ser poco fiable, es altamente subjetivo, precisa de formación especializada y presenta pocas esperanzas de lograr una estandarización. Además, la definición de calidad embrionaria es un concepto vago e impreciso pero es precisamente esta calidad asignada al embrión la que va a determinar el destino de cada uno de ellos, impactando directamente en los resultados clínicos.

1.4.2.- Nuevos marcadores no invasivos

Las limitaciones de los criterios morfológicos de selección embrionaria han conducido al desarrollo de nuevas tecnologías con el propósito de conocer el potencial reproductivo de un embrión en concreto a través del estudio del estado fisiológico del embrión y de sus funciones. Se han publicado estudios también centrados en analizar el ovocito y su entorno,

como por ejemplo las células del cúmulus o el medio de cultivo, pero estos métodos tienen varias limitaciones que hacen imposible su aplicación en la clínica de manera rutinaria.

En este apartado vamos a repasar varios métodos no invasivos basados en el análisis del método de cultivo del embrión, fundamentalmente en las áreas de la proteómica y la metabolómica, así como en la medida de la respiración ovocitaria y el análisis de la morfocinética embrionaria.

1.4.2.1.- Respiración ovocitaria.

La medida del consumo de oxígeno o respiración ovocitaria está considerada como uno de los métodos no invasivos más representativos del metabolismo embrionario. Se trata de un buen indicador de actividad metabólica, ya que está directamente relacionado con la capacidad del ovocito y el embrión de producir adenosina trifosfato (ATP). La producción de ATP ocurre en las mitocondrias, y se realiza a través de la fosforilación oxidativa. Este proceso representa el 30% del consumo de oxígeno en los embriones en división y en torno a un 60-70% en los blastocistos (Trimarchi et al, 2000). Medir un aspecto de la función mitocondrial como es la respiración (fosforilación oxidativa), podría ser indicativo del número y el estado de activación de estos orgánulos (fundamentales para completar el proceso de fecundación y posteriormente sostener el desarrollo embrionario), y podría traducirse en una manera de seleccionar ovocitos con mayor potencial (Tejera et al. 2011).

1.4.2.2.- Recambio de aminoácidos.

En la búsqueda de biomarcadores de viabilidad embrionaria en el medio de cultivo, se han estudiado en profundidad el consumo de componentes como el piruvato, la glucosa, el lactato, la glutamina, etc. Sin embargo cada vez ha sido mayor la evidencia de que el perfil aminoacídico refleja la capacidad de desarrollo de los embriones

tempranos (Devreker et al. 2001). El experimento clave que vincula el perfil aminoácido con el potencial de desarrollo embrionario fue diseñado por Houghton (Houghton et al. 2002), quien demostró que el modo en el que embriones de día 2 modifican el contenido en aminoácidos del medio de cultivo puede ayudar a predecir su posterior desarrollo a blastocisto; este trabajo es el primero en revelar la conexión entre viabilidad embrionaria y consumo/síntesis de aminoácidos, independientemente de otros factores como la evaluación morfológica. La medición de un grupo de 18 compuestos nos da una idea del fenotipo embrionario gracias a la enorme variedad de roles que dichos aminoácidos juegan durante el desarrollo embrionario. Esta es la principal diferencia entre el estudio de los aminoácidos y los estudios clásicos de metabolómica, donde sólo se analizaban uno o dos compuestos.

1.4.2.3.- Las “-ómicas” como herramientas de investigación.

Las “-ómicas” son disciplinas que engloban el estudio de los acontecimientos e interacciones de las estructuras celulares y sus procesos, desde el ácido desoxirribonucleico (ADN) hasta la función biológica, es decir, desde los genes hasta los metabolitos, de una forma compleja y global. Todos los procesos que contribuyen en el fenotipo pasan a través de este complejo sistema y la genómica, transcriptómica, la proteómica y la metabolómica intentan explicar como un embrión crece y cuáles son sus indicadores de éxito (Remohí, Manual, 2012)

- **La genómica.** La secuencia del DNA condiciona la síntesis de proteínas y el fenotipo, por lo que no se puede descartar la presencia de determinantes genéticos relacionados con la viabilidad embrionaria, aunque las variaciones específicas del DNA relacionadas con una mejora en las perspectivas de desarrollo no han sido identificadas. El estudio de la integridad y de la dotación

cromosómica es importante debido a que las aneuploidías no son compatibles con el desarrollo de individuos sanos, son la causa más común de aborto espontáneo y son muy frecuentes a nivel embrionario (Munne *et al.* 1995).

- **La transcriptómica.** Se basa en la identificación de genes que se expresan diferencialmente entre dos o más situaciones de estudio y que resultan adecuados en la caracterización de marcadores diagnóstico; las ventajas derivadas de estos estudios se deben a que los cambios fisiológicos no se traducen en variaciones importantes de la expresión génica y a que la mayoría de genes que actúan conjuntamente en un contexto concreto son buenos indicadores de una respuesta fisiológica real (Hamel *et al.* 2008).
- **La proteómica.** La caracterización de las proteínas expresadas y secretadas por el embrión durante todas las etapas de desarrollo preimplantatorio aportan una nueva visión de los procesos biológicos y celulares afectados. Los resultados indican que embriones morfológicamente similares presentan perfiles proteicos distintos y que una activación adecuada del genoma embrionario, y del proteoma, actúa como un factor crítico del potencial de desarrollo embrionario (Katz-Jaffe and Gardner 2008).

Las “-ómicas” descritas hasta ahora tienen en común un carácter invasivo y que ninguna de ellas es lo suficientemente sencilla como para incorporarla a la práctica diaria del laboratorio de Embriología. Sin embargo, hay una nueva metodología de fácil aplicación basada en el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario:

- **La metabolómica.** El examen de los metabolitos presentes en el medio de cultivo se erige como un método potencial de selección embrionaria que optimiza las oportunidades de gestación mejorando la eficacia de los tratamientos de fecundación *in vitro*. Los estudios publicados hasta el

momento describen una correlación directa entre el perfil metabólico y la viabilidad embrionaria. Los perfiles metabólicos que caracterizan a los embriones en distintas etapas del desarrollo están estrechamente relacionados con la competencia del embrión, y por tanto, son capaces de predecir el resultado de un ciclo (Domínguez et al. 2008).

Cualquiera de las alternativas mencionadas hasta ahora puede emerger en un futuro como una herramienta adicional a los criterios morfológicos convencionales de selección embrionaria. Las características que deben definir a estas innovaciones tecnológicas son: un carácter no invasivo, de uso fácil, económicas, rápidas, fiables y reproducibles, que se ajusten al trabajo diario del laboratorio sin forzar cambios en la rutina y que aporten información útil a los criterios morfológicos clásicos. Sin embargo, muchas de estas técnicas todavía se encuentran en fase de investigación básica por lo que los resultados clínicos son escasos. Además, precisan de personal altamente cualificado y los centros/laboratorios de reproducción no suelen contar con el equipamiento necesario requiriendo el traslado de las muestras a centros especializados. Finalmente no olvidemos mencionar que se trata de ensayos de difícil aplicación clínica por su complejidad y que suelen ser invasivos ya que la mayoría precisan de cierto grado de manipulación embrionaria.

1.4.2.4.- Marcadores morfocinéticos y tecnología Time-lapse

Dentro de los nuevos marcadores de viabilidad embrionaria tal vez estos sean los únicos que hayan demostrado superar la mayoría de los obstáculos mencionados anteriormente. El estudio de la cinética de las divisiones embrionarias se remonta atrás en el tiempo con los trabajos de Edwards sobre el impacto de la división temprana en la tasa de gestación en humanos (Edwards 1984), aunque la introducción de la

tecnología “time-lapse” en la clínica diaria es relativamente reciente. Sin embargo, ya ha dado signos de ser una herramienta de gran utilidad en la mejora de la selección embrionaria y en consecuencia, de conseguir un aumento en las tasas de éxito en los tratamientos de reproducción asistida (Meseguer 2012, Rubio 2014). El siguiente capítulo de esta tesis doctoral se centrará en hacer una descripción detallada de esta nueva tecnología así como del uso de la cinética como marcador de viabilidad embrionaria.

CAPÍTULO 2

Tecnología Time-Lapse

Revisión de los ensayos recientes sobre selección de embriones viables para
transferencia - Análisis integral de tecnología de imagen time-lapse

Irene Rubio, Javier Herrero y Marcos Meseguer

European Obstetrics & Gynaecology,

Vol.7, No.2, pp. 66–70, 2012

En los últimos 20 años los progresos en el campo de la reproducción asistida han resultado en alrededor de un millón de bebés nacidos en todo el mundo. Estos progresos han supuesto una oportunidad para aquellas parejas diagnosticadas como infértiles, ayudándolas a cumplir su deseo gestacional. Estos avances han estado enfocados en todo momento a aumentar las tasas de embarazo a la par que a reducir el número de embriones transferidos, y disminuir por tanto los riesgos asociados a un embarazo múltiple. Por un lado, se ha trabajado mejorando los protocolos de estimulación y la metodología del laboratorio, y por otro, aumentando el conocimiento de la patofisiología ovárica y el desarrollo embrionario.

Hay varias razones de peso para tratar de mejorar la selección embrionaria y por tanto los resultados clínicos. En primer lugar, se trata de minimizar los riesgos que los embarazos múltiples suponen para la madre (diabetes gestacional, hipertensión y anemia) y para el bebé (muerte fetal, prematuridad, bajo peso al nacer, y problemas neurológicos entre otros (Pinborg 2005)). En segundo lugar, el número de embriones que pueden ser transferidos en el útero está sujeto a la ley en muchos países. En algunos casos se establece un límite superior, en otros se deja a elección del facultativo médico, y en algunos con leyes muy restrictivas se obliga a la transferencia de un único embrión (Pennings 2009). Por ambos motivos, la reducción de riesgos y de embriones a transferir, se hace necesario definir métodos no invasivos fiables para elegir el mejor embrión con el mayor potencial de implantación.

Las mejoras en los medios y las condiciones de cultivo (aire purificado, superficies calefactadas, incubadores de triple gas, etc.) junto con la información obtenida a lo largo de los años mediante la observación de los embriones se ha reflejado en una mejora de la calidad de los embriones cultivados en el laboratorio (Gardner 1998, Summers 2003, Leese 2003, Leese 2008, Rienzi 2011). Hasta la fecha, estos embriones se han estado seleccionando en base a criterios morfológicos y de desarrollo, incluyendo la presencia de pronúcleos en el ovocito y su morfología, número y simetría celular,

porcentaje de fragmentos y multinucleación en día dos y tres de desarrollo, compactación y formación de blastocistos y estudio de su morfología. Sin embargo, la observación estática de la morfología embrionaria para seleccionar el o los más competentes tiene un tiempo limitado por el bien del embrión, ya que al extraerlo del incubador para situarlo bajo el microscopio se están interrumpiendo las condiciones de cultivo en las que crece. Por este motivo, la evaluación de los cambios dinámicos que ocurren durante el desarrollo embrionario ha sido siempre una dificultad difícil de resolver. El grupo de Nagy describió en 1994 los eventos temporales de la fecundación ovocitaria en humanos tras microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (Nagy 1994). En aquel momento se sospechaba también que los embriones viables seguían un patrón temporal predeterminado de divisiones celulares, y que las observaciones secuenciales de la morfología podían utilizarse para identificar aquellos embriones que seguían un patrón normal y por lo tanto es menos probable que tengan anomalías cromosómicas (aneuploidías) (Sakkas 1998, Mio 2008). En este sentido, y gracias a los grandes avances en la bioinformática, los sistemas time-lapse han evolucionado hasta proporcionar una manera objetiva, dinámica y no invasiva de evaluación de los embriones, permitiendo estudiar los tiempos y sincronía en los que ocurren los diferentes eventos durante su desarrollo. Representa una poderosa herramienta para ver el desarrollo embrionario de una manera coherente e ininterrumpida, a diferencia de los métodos tradicionales (Payne 1997, Scott 2003, Scott 2003).

Este capítulo pretende introducir al lector en esta nueva tecnología, estudiar sus aplicaciones en el campo de la embriología y describir su uso como herramienta de selección embrionaria.

2.1 Imagen time-lapse

La fotografía time-lapse o cámara rápida se define como una técnica donde la frecuencia en la cual se captan imágenes es mucho más lenta que la utilizada para visualizar posteriormente la secuencia. Una vez proyectada a velocidad normal, el tiempo parece transcurrir más rápido, por eso se utiliza para

mostrar diferentes sucesos que por lo general suceden a velocidades muy lentas e imperceptibles al ojo humano.

2.1.1 Ventajas e inconvenientes de los sistemas time-lapse:

Los incubadores estándar en continuo funcionamiento son capaces de mantener unas excelentes y estables condiciones de cultivo. Sin embargo, cada vez que se abre el incubador, la concentración de los gases y probablemente también la temperatura, varían, y el tiempo necesario para recuperar las condiciones óptimas de cultivo puede ser muy diferente de un modelo de incubador a otro (Higdon 2008). Los sistemas de incubación time-lapse permiten ver en tiempo real el embrión en desarrollo dentro del incubador sin necesidad de alterar las condiciones de cultivo (Meseguer 2011), y permiten al embriólogo revisar y analizar las imágenes del desarrollo completo del embrión a su conveniencia. El uso de esta tecnología además permite ahorrar tiempo en el laboratorio y ofrece la posibilidad de observar las 24 horas el desarrollo embrionario de manera que mejora la eficiencia de los ciclos de FIV aumentando la capacidad de identificar los embriones más viables.

A parte de determinar con precisión los tiempos de las divisiones celulares y de cada uno de los eventos que ocurren durante el desarrollo embrionario, los sistemas time-lapse permiten detectar y seguir fenómenos difícilmente detectables de las divisiones celulares y del desarrollo, como por ejemplo la aparición y reabsorción de fragmentos (Hardarson 2002, Van Blerkom 2001), o la iniciación de la compactación y la posterior aparición de la cavidad del blastocelo (Alikani 2000). Además proporciona información adicional sobre las interpretaciones incorrectas de ciertos fenómenos como la no identificación de células multinucleadas, la categorización de un cigoto en 2 pronúcleos cuando en realidad ha habido un tercer pronúcleo en algún momento del desarrollo o la definición de un cigoto como no fecundado cuando lo que ha ocurrido es una desaparición temprana de los dos pronúcleos. Todo esto da una idea de la relevancia y el impacto

de esta tecnología, más aun teniendo en cuenta que la mayor parte de los fenómenos que ocurren durante el desarrollo embrionario no son estáticos.

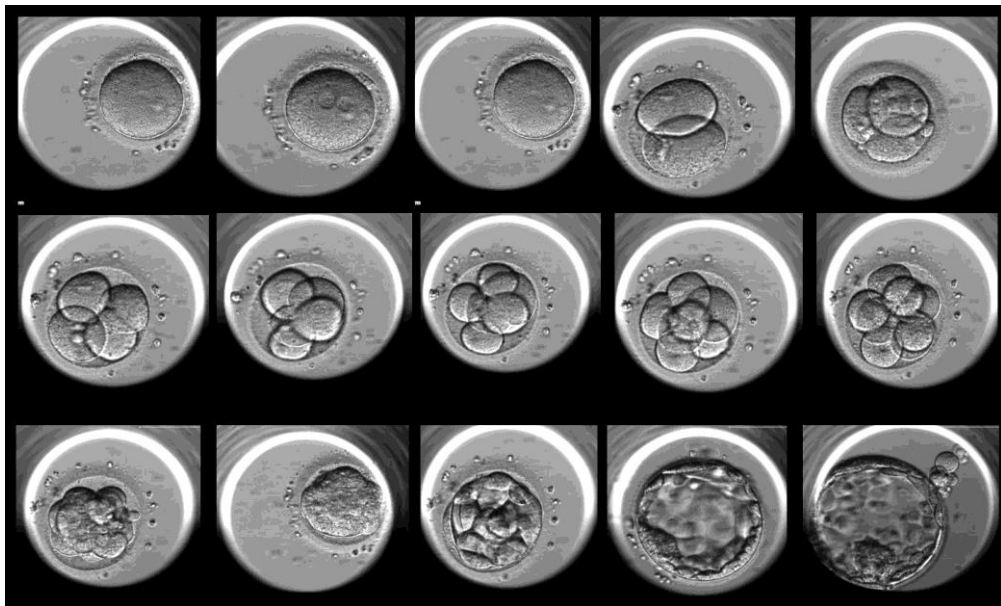


Figura 1. Desarrollo embrionario desde el estadio de cigoto hasta blastocisto mediante adquisición de imágenes time-lapse

Sin embargo, también cabe señalar que existen algunos inconvenientes. Debemos recordar que los embriones son estructuras tridimensionales y algunas áreas claramente visibles en un plano pueden dejar de serlo cambiando el enfoque. Desde el punto de vista del embriólogo una de las principales desventajas por lo tanto es la incapacidad de poder mover/rotar los embriones durante su observación. Por otro lado, el tiempo exacto en el que ocurren los diferentes fenómenos durante el desarrollo embrionario son a veces difíciles de determinar tanto manualmente como mediante análisis de imagen. En primer lugar, es más fácil contar dos células en una imagen por ejemplo que ocho, porque es necesario distinguir aquellas que ya han sido contadas. En segundo lugar, cuantas más células en el embrión, más tienden a solaparse, con lo cual es aún más complicado evitar contar dos veces la misma célula. Y por último, a veces es realmente difícil distinguir los grandes fragmentos de las células, sobre todo a medida que aumenta el número de estas. En otras palabras, cuantos más “objetos” (células y fragmentos) haya en la imagen, más

difícil resulta contar las células y determinar si ha ocurrido una división (Meseguer 2011). La aparición de burbujas en el medio de cultivo también es un problema ya que impide que se puedan evaluar correctamente los embriones, pudiéndose perder algún evento importante del desarrollo del mismo (Wong et al, 2012). Finalmente y con respecto al cálculo de los tiempos de división debemos reconocer que el tiempo definido como tiempo cero (t_0) es una media de todos los ovocitos de la cohorte, por lo que hay un pequeño desfase ya que obviamente no todos los ovocitos se microinyectan exactamente al mismo tiempo. Sin embargo este desfase es muy pequeño y no afectaría a los resultados obtenidos. Igualmente, en el caso de ovocitos inseminados mediante FIV convencional, se tomaría como tiempo de partida el momento en el que son inseminados, y se introducirían en el sistema time-lapse sólo aquellos correctamente fecundados, pero no hay manera de saber en qué momento exacto fecundó cada uno de ellos, con lo cual en estos casos también se asume cierto error.

2.1.2 Sistemas time-lapse disponibles:

Hoy en día se encuentran disponibles tres tipos de sistema; todos ellos ofrecen la posibilidad de describir características morfológicas sin necesidad de extraer los embriones de sus condiciones óptimas de cultivo pero la conveniencia de usar uno u otro dependerá del uso al que se le vaya a destinar. En el caso de adquirir el equipo con fines investigadores, el TMS deberá proporcionar la mayor cantidad de información posible y disponer de un software sofisticado para la interpretación y análisis de los datos. Si el fin es de uso clínico, el TMS deberá generar sólo algunos datos claves, fácilmente interpretables y de manejo muy sencillo.

Estas son las tres opciones disponibles en la actualidad:

- Incubador construido en torno a un sistema de microscopía comercialmente disponible Sería el caso del “Stage-top incubator “de Tokai Hit, Japón. Su elevada calidad de imagen y la complejidad de las opciones ofrecidas lo convierten en una herramienta de gran utilidad

en investigación. Sin embargo, la estabilidad y condiciones del cultivo embrionario no son lo suficientemente óptimas como para ser utilizado clínicamente.

- Insertar un microscopio dentro de un incubador convencional comercialmente disponible Sería el caso de “PrimoVision” de Cryo Innovations, Hungría, este sistema es menos flexible pero proporciona unas condiciones de cultivo óptimas y estables. Otros ejemplos serían “EmbryoGuard” de IMT Ltd, Israel o el Eeva (“Embryo early viability assessment” Merck-Serono); este último ha sido diseñado para ser insertado dentro de la mayoría de los incubadores convencionales y proporciona una captura de imágenes automática en campo oscuro cuyo fin es analizar información cuantitativa del desarrollo embrionario.

- Todo en uno incluido: se trataría de un incubador con sistema de microscopía y cámara integrado, como por ejemplo el “EmbryoScope®” de Vitrolife, Suecia, “InCu-View Live” de Sanyo, Japón, o “Bio-Station IM” de Nikon, Japón. Comenzando por el EmbryoScope®, su principal ventaja es que está diseñado para el uso clínico, con lo cual tiene una gran capacidad, pudiendo adquirir automáticamente imágenes de hasta 72 embriones cultivados de forma individual, y utiliza un software de análisis de imagen en el cual los eventos y tiempos de divisiones celulares pueden ser interpretados de manera sencilla. El segundo de ellos es el InCu-View Live de Sanyo; este incubador está pensado con fines clínicos y tiene la gran ventaja de no necesitar una placa de cultivo específica, sino que se puede adaptar a cualquier recipiente de cultivo. En cambio tiene una menor capacidad (12 muestras por incubador) y el aumento en el cual se observan las muestras es menor. El último sistema mencionado es el Biostation-Nikon, con gran cantidad de opciones de imagen y canales para imágenes fluorescentes. Viene equipado con un software sofisticado para interpretar toda la información adquirida ya que se diseñó específicamente para la investigación en células madre.

El primero de ellos, el EmbryoScope®, es el sistema en el cual los autores tienen experiencia y en el que se han basado los estudios que forman parte de este trabajo de tesis.

2.2 El time-lapse como herramienta de selección. Aplicaciones en Embriología

Como se ha mencionado anteriormente, la selección de los embriones el día de la transferencia se basa en criterios morfológicos fuertemente arraigados en la rutina de un laboratorio de FIV. Las observaciones están ligadas inevitablemente a momentos concretos de la jornada y considerando que el desarrollo embrionario es un proceso dinámico, es posible que muchos procesos críticos que ocurren entre las observaciones pasen desapercibidos. Con los sistemas time-lapse es posible evitar las limitaciones de una observación intermitente y obtener suficientes imágenes seriadas como para resultar en una película del desarrollo embrionario.

2.2.1 Estudios sobre cinética embrionaria:

El momento en el que ocurre la primera división celular se propuso tiempo atrás como un parámetro relevante de selección embrionaria. Este fenómeno de la cinética embrionaria y su impacto en las tasas de embarazo fue estudiado por primera vez por Robert Edwards (Edwards 1984) y desde entonces se han publicado numerosos estudios en los cuales se defiende la idea de que transferir embriones cuya primera división es temprana mejora las tasas de embarazo e implantación comparando con embriones con división más lenta (Sakkas 1998, Shoukir 1997, Bos-Mikich 2001, Neuber 2003, Sakkas 2001, Wharf 204, Van Monfoort 2004, Lundin 2001, Salumets 2003, Tsai 2002, Fenwick 2002). Sin embargo, muchas transferencias de las recogidas en estos estudios incluyen más de un embrión, y en varias de ellas además se transfieren conjuntamente un embrión de división temprana con uno de división más lenta, con lo cual es difícil conseguir evidencias que atribuyan la mejor implantación a los embriones de división temprana. Más aún, la mayoría de estos estudios se basan en observaciones únicas y de hecho muchos de los autores remarcan la necesidad de aumentar su número para obtener datos fiables.

El inconveniente es que para poder incrementar la frecuencia de las observaciones, en el momento en el que se publicaron los citados estudios esto implicaba un impacto negativo en el desarrollo de los embriones, al tener que extraerlos del incubador con más asiduidad.

2.2.2 Time-lapse y evaluación clínica embrionaria:

Los primeros experimentos en los que se introdujo el uso de la tecnología time-lapse iban encaminados a describir los tiempos concretos de algunos parámetros cinéticos como la primera división embrionaria (paso de una a dos células), segunda división temprana (paso de dos a tres células), sincronía del segundo ciclo celular (intervalo entre la segunda y la tercera división celular) y duración del tercer ciclo de división (intervalo temporal entre las etapas de cuatro y ocho células), como se resumió en una de las publicaciones del grupo Kirkegaard (Kirkegaard, 2012).

Más tarde, en 1997 Payne utilizó cinematografía time-lapse para estudiar 50 ovocitos humanos a los que se les había realizado ICSI y detectar la extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación de los pronúcleos. Ninguno de los embriones originados se llegó a transferir, pero encontró que la calidad embrionaria estaba relacionada con los eventos de la fecundación y la periodicidad de las oleadas citoplasmáticas. También descubrió que los embriones de buena calidad venían de ovocitos en los cuales el tiempo desde la microinyección hasta la aparición de pronúcleos era más homogénea y tenían oleadas citoplasmáticas más largas (Payne 1997). El grupo de Lemmen estudió los tiempos y la coordinación de sucesos durante el desarrollo temprano embrionario, desde el cigoto hasta el embrión en células, y encontró que la desaparición temprana de los pronúcleos y el comienzo de la primera división tras la fecundación se correlacionaban con un número más elevado de blastómeras en día dos. También vieron una correlación entre la sincronía en la aparición de los núcleos tras la primera división con la tasa de embarazo. El desarrollo de los embriones en el sistema time-lapse fue similar al de sus hermanos

cultivados en los incubadores convencionales, sugiriendo así que los datos obtenidos del sistema time-lapse podían ser extrapolados al resto del laboratorio y validando así el sistema (Lemmen 2008).

En un estudio más reciente, el grupo de Wong correlacionó análisis de imagen por time-lapse y perfil de expresión génica. Estudiaron 242 embriones supernumerarios proveniente de FIV que habían sido criopreservados en la etapa de cigoto. Primero mostraron que los embriones humanos que se desarrollan hasta el estadio de blastocisto siguen un patrón de desarrollo temporal estricto y predecible, que a su vez está correlacionado con patrones de expresión génica predecibles. En segundo lugar encontraron que la expresión génica en embriones humanos en etapas previas a la implantación es autónoma y sigue diferentes patrones. Y en tercer y último lugar vieron que el desarrollo de los embriones humanos hasta la etapa de blastocisto (potencial de desarrollo) podía ser predicho con más de un 93% de sensibilidad y especificidad con tres parámetros dinámicos en día dos tras la fecundación, antes de la activación de los genes embrionarios: 1) la duración de la primera división citoplasmática de una a dos células, 2) el tiempo transcurrido entre la división a dos células y la división a tres células, 3) el tiempo transcurrido entre la división a tres células y la división a cuatro células. Sin embargo, ninguno de los embriones en ese estudio se llegó a transferir con lo cual no se pudo comprobar si los embriones que si seguían el patrón sugerido hubiesen implantado (Wong 2010).

Los estudios preliminares de Cruz trataron de validar la tecnología time-lapse para su uso clínico. El grupo comparó en un estudio prospectivo randomizado la calidad embrionaria y el desarrollo y tasa de embarazo entre el EmbryoScope® (como sistema time-lapse; TMS) y un incubador estándar (SI). Analizaron 478 embriones y compararon la tasa de llegada a blastocisto y el porcentaje de embriones utilizables (transferidos y congelados). La Odds Ratio de blastocistos (TMS vs SI) fue de 1,158, siendo el tamaño muestral suficiente. La proporción de

embriones viables fue de un 28,5% en los embriones cultivados en TMS y de un 35% en los cultivados en el incubador convencional, siendo una diferencia estadísticamente no significativa ($p=0,438$). La tasa de embarazo evolutiva no reflejó variaciones significativas entre los embriones cultivados en un sistema o el otro, siendo en el TMS de un 42,8% y en el SI de un 42,1%, y en las transferencias mixtas (dos embriones transferidos a la vez, de los cuales cada uno cultivado en un sistema diferente) de un 33,3%, $p=0.399$. No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas, validando así el cultivo embrionario en el EmbryoScope® y concluyendo que este sistema de cultivo time-lapse no comprometía la calidad embrionaria ni los resultados clínicos (Cruz 2011).

El grupo de Meseguer publicó en 2011 un estudio más extenso y complejo relacionando parámetros morfocinéticos e implantación (Meseguer 2011). La intención del estudio fue desarrollar un modelo alternativo de selección embrionaria basado en parámetros cinéticos. El estudio consistió en un extenso análisis retrospectivo de las imágenes obtenidas mediante el EmbryoScope® en un total de 522 embriones transferidos, de los cuales se incluyeron finalmente sólo 247 embriones de implantación conocida, es decir, que provenían de tratamientos en los cuales el número de sacos gestacionales observados coincidía con el número de embriones transferidos (implantación total o 100%), y de tratamientos en los que no hubo embarazo (no implantación o 0%). Así identificaron el momento preciso de la primera división celular: la división a dos células (llamada t_2), así como las sucesivas: segunda división celular (a tres células: t_3), tercera división celular (a cuatro células: t_4), y cuarta (a cinco células: t_5). Definieron como momento de la división como el tiempo en el que se observa por primera vez una separación completa de las membranas de las nuevas células formadas. Definieron también la duración del segundo ciclo celular (parámetro que bautizaron como cc_2) como el intervalo temporal en el que un embrión pasa de estar en dos células a tres ($cc_2=t_3-t_2$). Sería el tiempo en el que el embrión permanece en la etapa de dos células. Por último, definieron la segunda

sincronía (s_2) como la duración de la transición de un embrión de dos células a un embrión de cuatro células ($s_2=t_4-t_3$), lo que se corresponde con la duración del periodo embrionario en tres células.

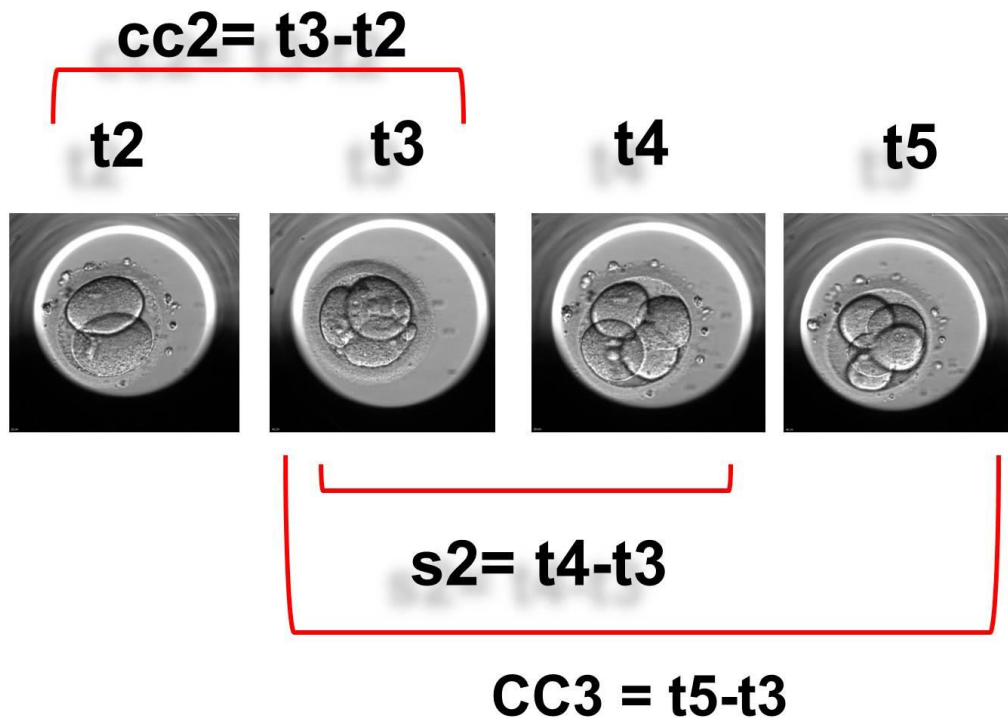


Figura 2. Representación gráfica de los eventos del desarrollo embrionario considerados: t_2 , t_3 , t_3 , t_5 , s_2 , cc_2 y cc_3 . Los tiempos precisos se identificaron y midieron en horas tras la microinyección

Para describir la distribución de las probabilidades de implantación, los tiempos se convirtieron a variables continuas categorizables dividiéndolas en grupos por cuartiles. Con este procedimiento se evitaron sesgos debidos al número total de embriones en cada categoría. A continuación se calculó el porcentaje de embriones que implantaron en cada cuartil para ver la distribución de la implantación en las diferentes categorías. Se encontraron diferencias significativas entre los embriones que implantaron y los que no en todas las variables estudiadas, y de hecho se observó

que en los embriones que implantaron la variabilidad dentro de cada parámetro era menor. Un descubrimiento interesante fue que el tiempo de las sucesivas divisiones era un valor predictivo ascendente de implantación embrionaria. Teniendo en cuenta estas diferencias se realizó un análisis de regresión logística para seleccionar y ordenar aquellas variables (expresadas como variables binarias dentro y fuera del rango óptimo) con mayor relevancia respecto a la tasa de implantación. De esta manera generaron el siguiente orden: 1º) tiempo de división a cinco células, t5 (48,8-56,6 horas tras ICSI), 2º) sincronía durante el segundo ciclo celular, s2 ($\leq 0,76$ h) y 3º) duración del segundo ciclo celular, cc2 ($\leq 11,9$ h). Un análisis de curva ROC para determinar las propiedades predictivas de este modelo con respecto a las probabilidades de implantación dio un valor de área debajo de la curva de 0.720 (95% CI, 0.645-0.795).

Interesantemente también observaron que algunos parámetros, como la multinucleación en el estadio de cuatro células, la asimetría de las blastómeras en el estadio de dos células o la división celular abrupta de una a tres o más células, afectaban seriamente al potencial de implantación, de manera que se definieron como criterios de exclusión.

Con estos resultados los autores propusieron un esquema de clasificación jerárquica basado en rangos óptimos para cada variable; esos rangos se definieron como los dos cuartiles con mayor implantación. La clasificación primaria la define la evaluación morfológica de los embriones, de manera que se eliminan aquellos claramente no viables (categoría F), como serían aquellos altamente anómalos, atrésicos o bloqueados. El segundo paso de la clasificación lo comprenden los criterios de exclusión: presencia de multinucleación en el estadio de cuatro células, asimetría de las blastómeras en el estadio de dos células y división abrupta de una a tres o más células (categoría E). Y en tercer lugar entran en juego los criterios de selección: tiempo de división a cinco células (t5), tiempo transcurrido entre la división de tres células a cuatro (s2) y duración del segundo ciclo celular o tiempo transcurrido entre el estadio de dos y tres células (cc2). Si los

valores de t5 están incluidos dentro del rango óptimo (48.8-56.6 horas), el embrión se clasifica como A ó B; si el valor de t5 se localiza fuera del rango óptimo, el embrión se define como C ó D. Para el caso de s2, si el tiempo de división está dentro del rango óptimo (≤ 0.76 horas), el embrión se clasifica como A ó C dependiendo del valor de t5; y si el valor de s2 está fuera del rango óptimo, el embrión se clasifica como B ó D según t5. Finalmente, se puede categorizar a los embriones 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-) (Figura 3).

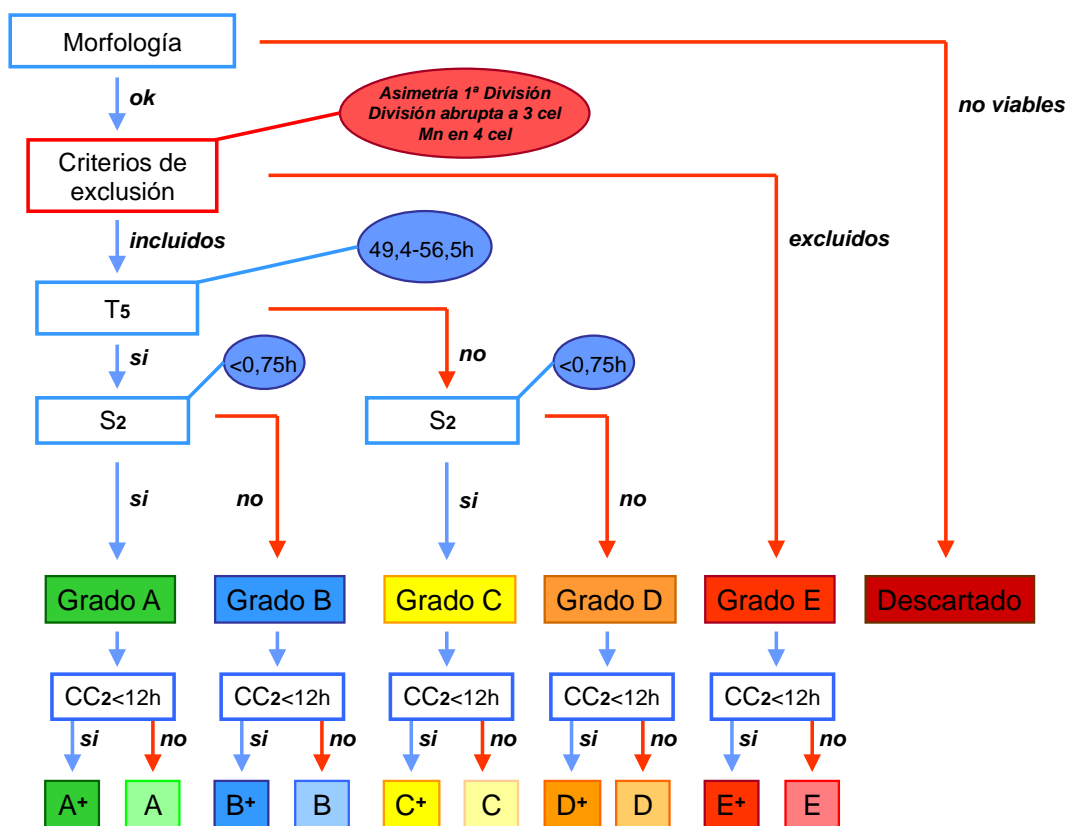


Figura 3. Representación gráfica del árbol de decisión jerárquico y las categorías de los embriones según potencial de implantación. La clasificación genera 10 categorías de embriones con un potencial de implantación creciente de derecha a izquierda.

2.2.3 El “lenguaje” time-lapse:

Un aspecto fundamental a tener en cuenta es que a medida que aumenta el número de estudios sobre time-lapse, se introducen nuevos parámetros para hablar de fenómenos dinámicos que ocurren durante el desarrollo embrionario y eso implica por tanto, nueva nomenclatura. Kirkegaard y su grupo propusieron un consenso acerca de cómo recoger y publicar los datos en su última revisión (Kirkegaard 2012). Sugirieron la siguiente terminología:

- Una división es el evento mitótico que lleva a la formación de dos células a partir de una, mientras que un ciclo de división se refiere a un grupo de divisiones consistentes en el cual el número de células iniciales se dobla.
- La primera citocinesis es el tiempo que transcurre desde que aparece la primera muesca en el estadio de una célula hasta la completa separación de las dos células hijas mediante una membrana citoplasmática; para este parámetro son interesantes tanto el momento concreto en el que ocurre como su duración.
- Sincronía es el tiempo en el que comienza un ciclo celular hasta que comienza el siguiente ciclo celular (el primer ciclo celular es la duración en la etapa de una célula, segundo ciclo celular es la duración de la etapa en tres células, tercer ciclo celular es la duración de la etapa en cinco-siete células, etc.).
- Patrón de división: se define como el tiempo de cada división celular hasta llegar a la etapa de compactación.
- Cinética embrionaria sería el conjunto de tiempos y duración de la compactación, mórula y etapas del blastocisto. Compactación se define a partir del momento en el cual se observa una fusión de al menos dos células y el diámetro se reduce. Blastocisto se define a partir del momento en el que el blastocele aparece en el embrión.

- Por último, se estipula como tiempo de aparición de los pronúcleos el momento inmediato en el que un núcleo es visible, y de desaparición de los pronúcleos en el instante en el que el un pronúcleo desaparece.

El uso global de esta terminología ayudaría enormemente a comprender y facilitar la comparación entre diferentes estudios llevados a cabo por distintos grupos de investigación.

2.3 Conclusiones

A través de los trabajos publicados hasta el momento en esta área, resultan evidentes ciertos aspectos. Por un lado la importancia de establecer la cronología del desarrollo, así como la búsqueda de nuevos marcadores que puedan ser utilizados en la clínica para la evaluación morfológica y cinética de los embriones. Por otro lado podemos decir también que el análisis no invasivo del desarrollo embrionario basado en la toma de imágenes time-lapse es útil no sólo para entender los eventos relacionados con la fecundación o el desarrollo a nivel morfológico, sino también para valorar su importancia fisiológica durante las etapas tempranas del desarrollo.

Si bien es cierto que la mayoría de los estudios publicados sobre tecnología time-lapse se han centrado en mediciones durante el desarrollo embrionario temprano (formación y fusión de pronúcleos, momento de la primera división embrionaria, etc.) (Rienzi 2011, Lundin 2001, Fenwick 2002, Lemmen 2008), los trabajos más recientes han tratado de trascender más allá de las limitaciones iniciales para correlacionar la información obtenida del estudio por análisis de imagen y los datos moleculares desde el estadio de cigoto hasta el de blastocisto. Además, han propuesto nuevos marcadores específicos para las etapas más tardías del desarrollo que serían capaces de predecir el potencial de implantación. Aún así, aunque este es el punto final preferido en cuanto a la selección de embriones, la correlación entre la cinética del desarrollo y la tasa de llegada a blastocisto es también una alternativa válida como método temprano de selección embrionaria.

En resumen, podemos decir que el seguimiento del desarrollo embrionario mediante análisis de imagen time-lapse aplicado a la clínica permite obtener información novedosa sobre parámetros del desarrollo que pueden ser utilizados entre otros para distinguir aquellos embriones con un potencial de implantación más elevado. De hecho, podría llegar a ayudar a distinguir embriones que implantan de aquellos que no lo hacen, así como a discriminar aquellos embriones con patrones de división aberrantes.

Por último, si queremos que el fin último sea aumentar la tasa de gestación, es necesaria la realización de estudios prospectivos randomizados que esclarezcan y cuantifiquen el poder de selección embrionaria mediante tecnología time-lapse.

A Review Of Recent Trials Selecting Viable Embryos For Transfer – Comprehensive Time-Lapse Imaging Analysis

Irene Rubio,¹Javier Herrero² and Marcos Meseguer²

1. Embryologist; 2. Scientific Advisor; IVF Laboratory of IVI Valencia, University of Valencia, Valencia, Spain

Abstract

Assisted reproduction techniques (ART) are in constant evolution in order to improve the *in vitro* fertilisation (IVF) cycle outcome. Current methods of embryo selection are based on the precise evaluation of the morphology at a few pre-defined time points during embryo development, with the consequent lack of information in between observations. Time-lapse systems enable dynamic phenomena to be captured creating a complete picture of embryo development kinetic. This technology offers an opportunity for classic embryo selection methods to be improved. As the information available of the embryo cohort is much larger, it allows a more comprehensive assessment of the quality of these embryos. Thus, continual monitoring might provide a strategy for obtaining better success rates. The aim of this article is to provide an overview of the time lapse characteristics, advantages, different existing systems and a review from the first studies to the most recent ones published in which is analysed their utility as a tool for embryo selection.

Keywords

Assisted reproduction technologies (ART), time-lapse, embryo development, morphokinetics parameters, non-invasive markers, exact timing

Disclosure: The authors have no conflict of interest to declare.

Received: 31 May 2012 Accepted: 21 June 2012 Citation: *European Obstetrics & Gynaecology*, 2012;7(2):66–70

Correspondence: Marcos Meseguer, Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local, 3, Valencia 46015, Spain. E: marcos.meseguer@ivi.es

In the past 20 years, progresses in assisted reproduction have resulted in over a million babies born worldwide. These progresses have provided a new opportunity for those couples diagnosed as infertile, helping in the attainment of their gestational desire. These advances have been aimed at increasing the pregnancy rates while reducing the number of transferred embryos and minimising the risks; on the one hand improving stimulation protocols and laboratory methodology and on the other hand, increasing the knowledge of the ovarian pathophysiology and embryo development.

There are several reasons for improving embryo selection and hence clinical outcomes. Firstly, it tries to minimise the risks that multiple pregnancies carry to the mother – gestational diabetes, hypertension and anaemia – and also for the babies – foetal death, extreme prematurity, low birth weight, children with neurological damage among others.¹ Secondly, the number of transferred embryos in many countries is controlled by law, some of them establishing an upper limit, leaving it up to the physician's discretion the number of embryos to transfer, in others with very restrictive law it is obliged to transfer a single embryo.² In both cases is needed to create accurate non-invasive methods to choose the best embryo for transfer with the highest potential to implant.

Improvements in media and culture conditions (clean air, heated surfaces, triple gas incubators, etc.)³⁻⁷ and the information obtained from conventional observations are reflected in the improvement of the embryo quality cultured in the IVF laboratory. To date, embryos have been selected primarily on morphological and developmental

criteria including pronuclear oocyte presence and morphology, cell number and symmetry, percentage of fragments and multinucleation on both day two and three of development, compaction and blastocyst formation and morphology. However, the static observation of embryo morphology in order to select the one or ones most competent for transfer concern for the well-being of the embryo, has limited the intensity of observation. For that reason, evaluations of the dynamic changes that occur during embryonic development have remained difficult to achieve. Nagy et al. described the time-course of fertilisation of human oocytes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 1994.⁸ It has been suggested too that viable embryos follow a pre-determined temporal pattern of cell divisions, and that sequential morphological observations may be used to identify embryos that follow a normal developmental pattern and are less likely to be chromosomally abnormal (aneuploidy)^{9,10} In this sense, time lapse technology has given new information about embryo kinetics (timing and co-ordination of events during development), providing a dynamic, non-invasive and objective manner of evaluating embryos. It represents a powerful tool for viewing embryo development in a coherent, uninterrupted manner, otherwise not available through the standard methods of embryo evaluation^{11,12,13} (see *Figure 1*).

Time-lapse Imaging

Time-lapse photography is defined as a technique whereby the frequency at which film frames are captured is much lower than that used to view the sequence. When played at normal speed, time appears to be moving faster and thus lapsing.

Advantages of Time-lapse Monitoring Systems

Excellent stability of growth conditions is found in normal standard incubators under constant operation. However, every time the incubator door is opened, the gas concentrations, and possibly also the temperature, change and the time to recover optimal growth conditions after these events may differ markedly from incubator to incubator.¹⁴ Time-lapse monitoring systems give a vision at real time of the developing embryo inside the IVF incubator without changing the culture conditions in a highly controlled environment¹⁵ and allow the embryologist to review and analyse the full course of embryo development at their convenience. The use of image analysis technology saves time to the embryologist and offers the availability of a 24 hours continuous observation and improves the effectiveness of IVF cycles increasing the ability to identify embryos with higher viability.

Apart from giving the precise determinations of cell divisions and the time of each event related to embryo development, time-lapse system allows to detect in an accurate manner cellular and development events rarely followed such as the formation and reabsorption of fragments^{16,17} or initiation of compaction and the appearance of the blastocoele cavity.¹⁸ It gives extra information about incorrect interpretations of certain phenomena such as missing multinucleation, categorising a zygote as a two pronucleate (2PN) when a third pronucleus had been present at some point in time or a zygote as no fertilised when the 2PN disappears earlier.

This highlights the importance of time-lapse technology, specially taking in consideration that most of the phenomena that take part during the embryo development are not stationary.

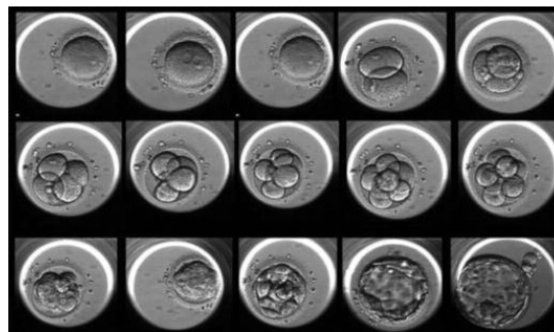
However, we must remember that the embryo is three-dimensional and some structures that are clearly visible on one plane can disappear in the next one. Furthermore, exact timing of divisional events becomes increasingly difficult to ascertain both manually and through image analysis. Firstly, it is easier to count, for example, two cells in an image than to count eight cells, because it is necessary to keep track on the cells that have already been counted. Secondly, the more cells in the embryo, the more they tend to cover each other and it is therefore necessary to keep track of the cells in several focal planes. Thirdly, distinguishing fragmentation from cells becomes harder the smaller the cells are. In other words, the more objects (cells and fragmentation) there are in the image, the harder it is to count the cells and to determine if a division occurred.¹⁵

Time-lapse Systems Available

Three possible set ups are offered nowadays, all of them offer the possibility to describe morphological characteristics without removing the embryos from their optimal incubation conditions of gas and temperature:

1. To build an incubator around a commercially available microscope^{16,19} (Stage-top Incubator, Tokai-hit, Japan)
2. To insert a microscope inside a commercially available incubator^{20,21} (Primo Vision, Cryo Innovations, Hungary; EmbryoGuard, IMT Ltd, Israel)
3. To have all the items integrated in a single equipment,^{22,15} (Embryoscope™, Unisense Fertilitech, Denmark; InCu-View Live, Sanyo, Japan; Bio-Station IM, Nikon, Japan)

Figure 1: Complete Embryo Development by Time-lapse Observation



The authors experience is based on the Embryoscope™ system, that combines microscope and incubator in one technology.¹⁵

Time-lapse as a Selection Tool – Applications in Embryology

As mentioned previously, the selection of embryos on the day of transfer is based on morphological criteria strongly established in the daily work of an IVF laboratory. The observations are inevitably linked to specific times and considering that the development of the embryo is a dynamic process, several critical stages in between observations can go unnoticed. With the time lapse monitoring system it is possible to overcome the limitations of the intermittent observation and obtaining a movie of the developing embryo.

Studies about Embryo Kinetics

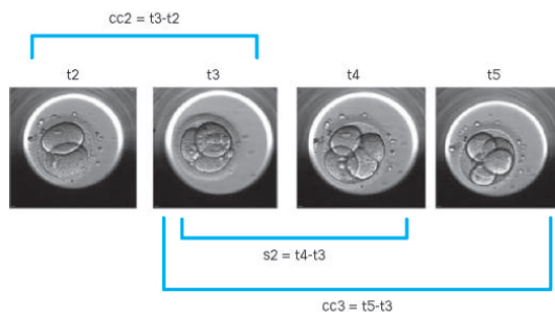
The timing of the first cleavage has been proposed as a parameter for embryo selection. This phenomenon and its impact on pregnancy rates were first studied by Edwards;²³ from this point and onwards numerous studies have been published in which the common idea is that the transfer of embryos with early cleavage improves pregnancy and implantation rates compared with embryo transfers with delayed division.^{9,24-33} However, many transfers in these studies involved more than one embryo and many included a mix of early and late cleaving embryos; thus, it is difficult to obtain conclusive evidence that the implantation can be attributed to the early cleavage. Furthermore, the majority of these studies rely on single observations and several authors have addressed the need for more frequent ones. However, more frequent observations can impair embryo development due to the stress caused to the embryos while removing them from the incubators to the inverted microscopes.

Time-lapse – Clinical Embryo Assessment

The first experiments in which time lapse technology was introduced were aimed at determining specific time for kinetics parameters like first cleavage (time point to two-cell stage), early second division (time point of three-cell stage), synchrony in second cell cycle (interval between second and third division), and duration of the third cleavage cycle (time interval between four and eight cell stage), as is summarised in a recent publication of Kirkegaard et al.³⁴

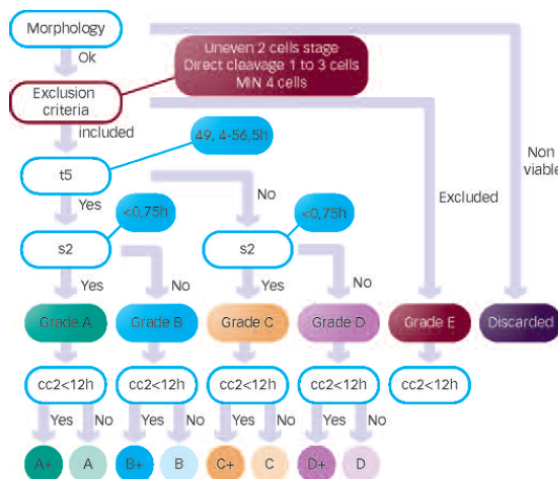
In 1997, Payne used time-lapse video cinematography in 50 human oocytes undergoing ICSI to study polar body extrusion and pronuclear formation. None of the embryos were transferred, but they found that embryo quality was related to fertilisation events and periodicity of the

Figure 2: Graphic Representation of the Considered Embryo Developmental Events t2, t3, t4, t5, cc2 = t3-t2 and s2 = t4-t3. The Precise Timings are Identified and Measured in Hours Post-ICSI Microinjection



cc2 = t3-t2: second cell cycle, duration of period as two cells; s2 = t4-t3: synchrony in division from three to four blastomere embryo.

Figure 3: Hierarchical Classification of Embryos



h = hours, classification is based on: 1. morphological screening; 2. absence of exclusion criteria; 3. timing of cell division to 5 cells (t5); 4. synchrony of divisions from two cell to four cell stage, s2, i.e. duration of three cell stage; 5. duration of second cell cycle, cc2. The classification generates 10 categories of embryos with increasing expected implantation potential (right to left) and almost equal number of embryos in each. This hierarchical model represents a classification tree, which subdivided embryos into six categories from A to F. Four of these categories (A-D) were further subdivided into two sub-categories (+) or (-) giving a total of 10 categories.

cytoplasmic wave. It was also discovered that good quality embryos arose from oocytes that had more uniform timing from injection to pronuclear abutment and tended to have a longer cytoplasmic wave.¹¹ The group of Lemmen studied the timing and coordination of events during early development from zygote to cleavage-stage embryo and found that early disappearance of pronuclei and onset of first cleavage after fertilisation was correlated with a higher number of blastomeres on day two. They also found a correlation between the synchrony in appearance of nuclei after the first cleavage with pregnancy success. Development in the time-lapse system was similar to their siblings cultured in normal incubators, suggesting that the data from the time-lapse system can be extrapolated to the clinic's laboratory setting, validating therefore the system.³⁵

In a more recent study, the group of Wong correlated time-lapse image analysis and gene expression profiling. They studied 242

supernumerary IVF embryos that had been cryopreserved at the zygote stage. First, they showed that human embryos that develop to the blastocyst stage follow a strict and predictable developmental timeline that is correlated with predictable gene expression patterns. Second, they founded that gene expression in preimplantation human embryos is autonomous and follows distinct patterns. Third and finally, they founded that development of human embryos to the blastocyst stage (developmental potential) could be predicted with >93 % sensitivity and specificity with three dynamic parameters on day two after fertilisation, before embryonic gene activation: 1. the duration of the first cytoplasmic cleavage from one cell to two cells; 2. time between division to two cells and subsequent division to three cells; 3. the time between division to three cells and subsequent division to four cells. However, none of the embryos in that study were transferred it is thus unclear if embryos with the suggested morphokinetic cleavage pattern would have implanted.³⁶

Initial studies by Cruz et al. were aimed to validate time-lapse technology for clinical use. The group compared in a prospective randomised study embryo quality and development and ongoing pregnancy between Embryoscope™ as time-lapse monitoring system (TMS) and a standard incubator (SI). They analysed 478 embryos and compared the blastocyst formation rate and the percentage of useful embryos (transferred + frozen). Blastocysts OR (TMS vs. SI) were 1.158 (CI 95 % 0.739-1.689). The proportion of viable embryos, resulting from grouping those transferred and frozen were (n=68) 28.5 % (95 % CI 22.8-34.2) for embryos developed in the TMS and (n=84) 35 % (95 % CI 29-41) for those developed in the SI, p=0.438. The ongoing pregnancy rate showed no significant variation between embryos incubated in the TMS and in the SI. The ongoing pregnancy rate for embryos incubated in the Embryoscope™ (6/14) 42.8 % (95 % CI 16.9-68.7) and in the standard incubator (8/19) 42.1 % (95 % CI 19.9-64.3) and mixed transfers (8/24) 33.3 % (95 % CI 14.5-52.1), p=0.399.

No significant differences were observed for any of the variables studied, validating embryo culture in the Embryoscope and concluding that this time-lapse monitoring system did not impair embryo quality and reproductive outcome.²²

A larger study of morphokinetic parameters related to embryo implantation was published by Meseguer et al. The aim of this study was to develop an alternative model of selecting embryos based on kinetic parameters. The study performed an extended retrospective analysis of time-lapse images of a total of 522 transferred embryos, of which only 247 embryos from treatments where the number of gestational sacs matched the number of transferred embryos (full implantation) and embryos from treatments where no biochemical pregnancy was achieved (no implantation) were included in the analysis. They identified the precise timing of the first cell division: the division to two cells (t2) and the following: the second (i.e. to three cells, t3), third (four cells, t4) and fourth (five cells, t5) cell division. They defined also the time of cleavage as the first observed time point when the newly formed blastomeres are completely separated by confluent cell membranes. They also defined the duration of the second cell cycle (cc2), as the time from division to a two blastomere embryo until division to a three blastomere embryo (cc2 = t3-t2), i.e. the second cell cycle is the duration of the period as two blastomere embryo. Finally, they defined the second synchrony s2, as the duration of the transition from a two blastomere embryo to a four blastomere embryo (s2 = t4-t3), which corresponds to the duration of the period as three blastomere embryo (Figure 2).

To describe the distribution of the probabilities of implantation, timings were converted from continuous variables into categorical variables by dividing them into groups based on their quartiles. By this procedure, it was avoided bias due to differences in the total number of embryos in each category. Then it was calculated the percentage of embryos that implanted for each timing quartile to assess the distribution of implantation in the different categories. Significant differences were found between implanting and non-implanting embryos for all analysed variables, where the implanting embryos showed significantly lower variability for each parameter. An interesting finding was that the timing of subsequent cell divisions was increasingly predictive of embryo implantation. They also defined the most predictive parameters correlated with subsequent implantation in order of importance: 1. time of division to five cells, t5 (48.8–56.6 hours (h) after ICSI); 2. synchrony during second cellular cycle, s2, i.e. time between division to three cells and subsequent division to four cells (≤ 0.76 h) and 3. duration of second cell cycle, cc2, that represents time between division to two cells and division to three cells, (≤ 11.9 h).

Interestingly, they observed that some parameters, such as multinucleation at the four cell stage, uneven blastomere size at the two-cell stage and abrupt cell division to three or more cells, appeared to largely preclude implantation, so were anticipated as exclusion criteria. From these results it was proposed a hierarchical classification scheme based on optimal ranges for each variable defined by the two quartiles with highest implantation. The primary classification was defined by the morphological evaluation to eliminate those embryos that are clearly not viable (category F) (i.e. highly abnormal, atretic or clearly arrested embryos). The second step of the classification was the exclusion criteria: multinucleation at the four-cell stage, uneven cell size, and abrupt cell division from one to three cells. And tertiary, the selection criteria: time of division to five cells (t5) time between division to three cells and subsequent to four cells (s2) and the duration of the second cell cycle, (cc2) (Figure 3).

The Time-lapse 'Language'

One important point is that as the number of studies about time-lapse increases, several dynamic morphological parameters for embryo evaluation are being introduced with the associated nomenclature. Kirkegaard et al. proposed a consensus about how to collect and report data in their last review.³⁴ They suggested the following designations: a division, or cleavage, is the mitotic event leading to the formation of two cells from one cell, whereas a cleavage cycle refers to the cluster of developmentally consistent cleavages, where the cell number is doubled. The first cytokinesis is the time from appearance of cleavage furrow at the 1-cell stage to complete separation of the two daughter cells by a cytoplasmic membrane, and from this parameter is interesting the time point as

well the duration. Synchronicity is defined as the time from beginning of one cleavage cycle till the beginning of the next (first cleavage cycle: duration of the 1-cell stage, second cleavage cycle: duration of the 3-cell stage, third cleavage cycle: duration of the 5–7 cell stage). The cleavage pattern is defined as the time point for each cell division until compaction stage, and embryo kinetics are the time points and duration of compaction, morula and blastocyst stages (compaction is the first time point when fusion of at least two cells is observed and the diameter decreases; morula is the time point when all the cells have fused; blastocyst is the time point when a blastocoel fills out the embryo). Finally, they defined the time points for appearance and disappearance of nuclei when the first time point a nuclei is visible or non-visible, respectively.³⁴ The global use of these parameters would lead to a major comprehension and facilitates the comparison between different studies.

Concluding Remarks

The importance of establishing the chronology in development has been demonstrated in the search for new markers for clinical use combining both, morphological and developmental assessment of embryos.

Non-invasive analysis of embryo development based on time-lapse imaging is useful not only to understand the morphological events associated with fertilisation, but also to evaluate the physiological importance of these events during the early stages of embryonic development. The majority of the studies that involve imaging have been limited to measurements of early development, such as pronuclear formation and fusion, and time of the first cleavage.^{8,33,30,35} More recent studies aimed to overcome these limitations have correlated imaging profiles and molecular data throughout development from the zygote to the blastocyst stage³⁶ and have proposed new specific markers for later stages of embryo development that can predict implantation. Although implantation potential would be the preferred end-point with regard to clinical selection of embryos, the relationship between the kinetics of cleavage and the subsequent blastocyst formation rate becomes a valid alternative as an early approximation method for the selection.

In summary, routine time-lapse monitoring of embryo development in a clinical setting provides novel information about developmental parameters that would be used between others to find morphokinetic characteristics of embryos with higher implantation potential. Moreover, it would assist to distinguish between implanting and non-implanting embryos, or even excluding these ones that displays aberrant cleavage patterns. In order to improve pregnancy rates, we need randomized prospective studies that elucidate the power of embryo selection by time-lapse systems. ■

1. Pinborg A, IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention, *Hum Reprod Update*, 2005;11:575–93.
2. Pennings G, International evolution of legislation and guidelines in medically assisted reproduction, *Reprod Biomed Online*, 2009;18 Suppl 2:15–8.
3. Gardner DK, Changes in requirements and utilisation of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture, *Theriogenology*, 1998;49:83–102.
4. Summers MC, Biggers JD, Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues, *Hum Reprod Update*, 2003;9:557–82.
5. Leese HJ, What does an embryo need?, *Hum Fertil (Camb)*, 2003;6:180–5.
6. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, et al., Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited, *Mol Hum Reprod*, 2008;14:667–72.
7. Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F, New culture devices in ART, *Placenta*, 2011;32 Suppl 3:S248–51.
8. Nagy ZP, Liu J, Joris H, et al., Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection, *Hum Reprod*, 1994;9:1743–8.
9. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, et al., Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability, *Hum Reprod*, 1998;13:182–7.
10. Mio Y, Maeda K, Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos, *Am J Obstet Gynecol*, 2008;199:660.e1,660.e5.
11. 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;12:532–41.
12. Scott L, Pronuclear scoring as a predictor of embryo development, *Reprod Biomed Online*, 2003;6:201–14.
13. Scott L, The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos, *Hum Reprod Update*, 2003;9:237–49.
14. Higdon HL 3rd, Blackhurst DW, Boone WR, Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory, *Fertil Steril*, 2008;89:703–10.
15. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation, *Hum Reprod*, 2011;26:2658–71.
16. Hardarson T, Lofman C, Coull G, et al., Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse

- recordings, *Reprod Biomed Online*, 2002;5:36–8.
17. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S, A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos, *Hum Reprod*, 2001;16:719–29.
 18. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, et al., Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro, *Hum Reprod*, 2000;15:2634–43.
 19. Holm P, Booth PJ, Callesen H, Kinetics of early in vitro development of bovine in-vivo- and in-vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media, *Reproduction*, 2002;123:553–65.
 20. Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, et al., Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring, *Reprod Biomed Online*, 2010;21:533–6.
 21. Arav A, Aroyo A, Yavin S, Roth Z, Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis, *Reprod Biomed Online*, 2008;17:669–75.
 22. Cruz M, Gadea B, Garrido N, 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;28:569–73.
 23. Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, et al., Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility, *J In Vitro Fert Embryo Transf*, 1984;1:3–23.
 24. 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;12:1531–6.
 25. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN, Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome, *Hum Reprod*, 2001;16:2658–61.
 26. 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;18:1307–12.
 27. Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, et al., Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection, *Fertil Steril*, 2001;76:1150–6.
 28. Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S, Early embryo development is an indicator of implantation potential, *Reprod Biomed Online*, 2004;8:212–8.
 29. Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL, Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers, *Hum Reprod*, 2004;19:2103–8.
 30. Lundin K, Bergh C, Hardarson T, Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF, *Hum Reprod*, 2001;16:2652–7.
 31. Salumets A, Hyden-Granskog C, Mäkinen S, et al., Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures, *Hum Reprod*, 2003;18:821–5.
 32. Tsai YC, Chung MT, Sung YH, et al., Clinical value of early cleavage embryo, *Int J Gynaecol Obstet*, 2002;76:293–7.
 33. 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;17:407–12.
 34. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ, Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment, *Hum Reprod*, 2012;27:1277–85.
 35. 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;17:385–91.
 36. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, et al., Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage, *Nat Biotechnol*, 2010;28:1115–21.

CAPÍTULO 3

Análisis del impacto de los criterios de exclusión de un método de selección sobre los resultados clínicos. Un estudio basado en el evento de división directa de una a tres células.

Éxito limitado en la implantación de cigotos humanos con división directa: un estudio time-lapse

Irene Rubio, Reidun Kuhlmann, Inge Agerholm, John Kirk, Javier Herrero, María José Escibá, José Bellver y Marcos Meseguer

Fertility and Sterility

Vol.98, Issue 6, pp. 1458-1463, 2012

Como hemos comentado en el capítulo anterior, mediante el uso de la tecnología time-lapse se han podido definir múltiples eventos del desarrollo embrionario, entre ellos la duración de los primeros ciclos celulares. Se ha establecido que el tiempo entre dos divisiones consecutivas oscila entre 10 y 12 horas (Lemmen *et al*, 2008; Mio *et al*, 2008; Meseguer *et al*, 2011), que debería ser suficiente para replicar el total del genoma celular y dos citocinesis completas. Ello nos lleva a pensar que la aparición de ciclos celulares con una duración menor podría deberse a replications del ADN incompletas que desembocarían en una distribución desigual entre las nuevas blastómeras.

En el modelo logarítmico desarrollado por Meseguer que hemos descrito anteriormente (Meseguer *et al*, 2011) se incluyó como criterio de exclusión un evento observado con cierta frecuencia en el grupo de estudio: la división abrupta de dos a tres células en menos de 5 horas, llamado división directa (DC2-3). En este trabajo nos planteamos analizar los efectos de ese fenómeno sobre las tasas de embarazo clínico e implantación para evaluar la aplicabilidad clínica de la división directa como parámetro morfocinético de exclusión.

Para ello elaboramos un estudio en el que analizamos retrospectivamente un total de 5.225 embriones correspondientes a 979 tratamientos de infertilidad realizados en tres clínicas diferentes, de los cuales 1659 fueron transferidos.

3.1. Material y Métodos

Los datos recogidos de las tres clínicas incluyeron ciclos tanto de ICSI como de FIV convencional, diferentes protocolos de estimulación, un amplio rango de edad de las pacientes y tanto ciclos autólogos como de ovocitos donados. Debido a la relativamente baja incidencia de este fenómeno se incluyeron todos los casos mencionados para obtener un tamaño muestral suficiente para el análisis estadístico y una incidencia significativa en el conjunto de la población.

3.1.1 Punción ovárica, decumulación e ICSI: tras la aspiración de los folículos los complejos cumulus-corona ovocito se lavaron y cultivaron (medios SAGE, USA) a 5.2% CO₂ y 37°C en incubadora convencional durante cuatro horas antes de su decumulación. La decumulación de los ovocitos se realizó mecánicamente junto con enzima hialuronidasa (COOK Australia) y posteriormente se realizó el ICSI. Una vez inyectados, los ovocitos fueron colocados individualmente en la placa de cultivo EmbryoSlide® con medio de cultivo previamente equilibrado (SAGE, USA). En los casos de FIV convencional los ovocitos se inseminaron cuatro horas tras la punción con una concentración de 80.000 espermatozoides móviles progresivos por mililitro. Entre 16 y 19 horas después se evaluó la fecundación tras eliminar las células de la granulosa mecánicamente y aquellos correctamente fecundados se colocaron en una placa EmbryoSlide® con medio de cultivo previamente equilibrado (SAGE, USA). En el caso de los ovocitos microinyectados, la evaluación de la fecundación se realizó entre 16 y 19 horas post ICSI en base a las imágenes adquiridas por el sistema.

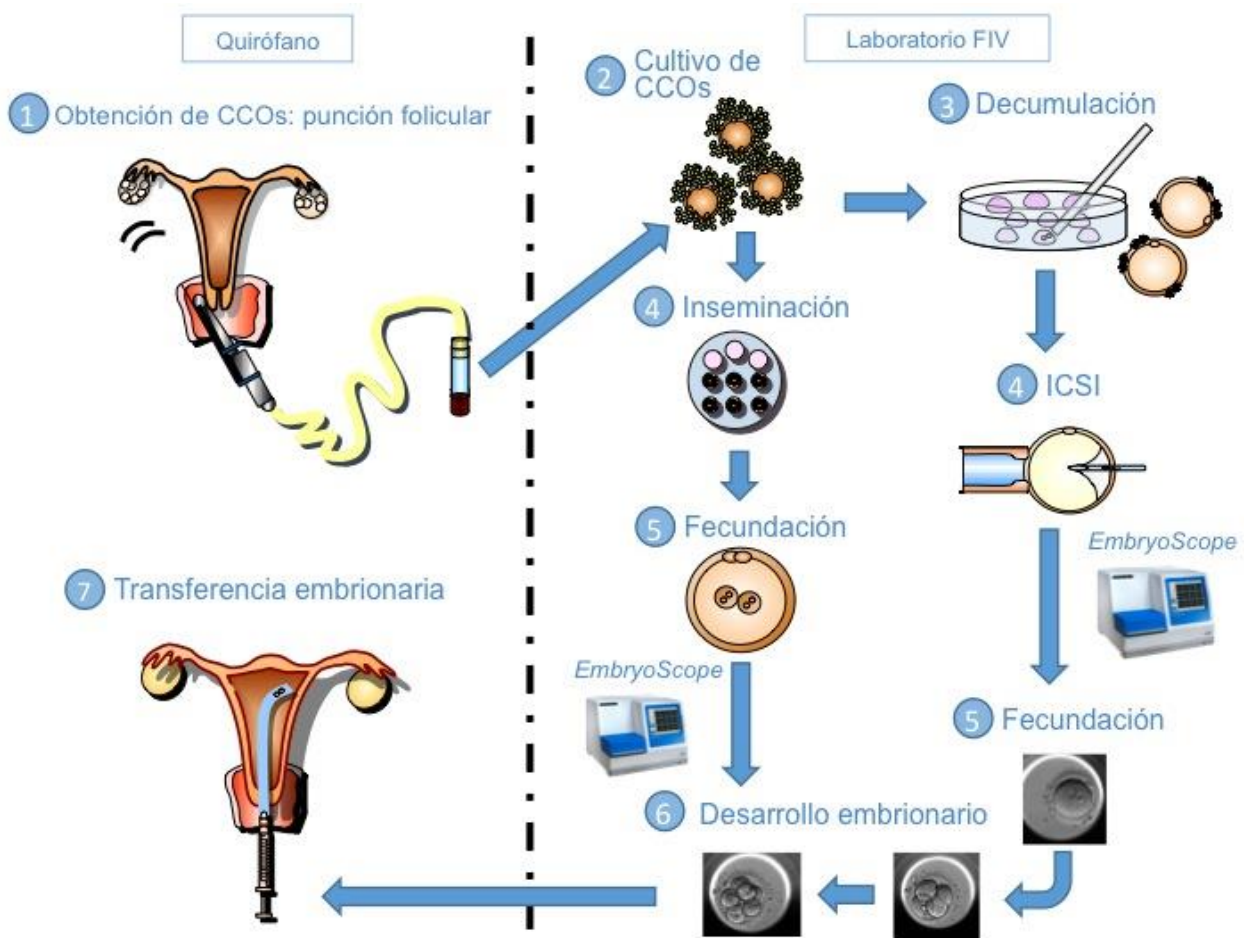


Figura 4. Representación gráfica del proceso seguido desde la obtención de los ovocitos mediante punción folicular hasta la transferencia uterina de los embriones seleccionados.

3.1.2 Cultivo y evaluación embrionaria: El EmbryoScope® es un incubador trigas con un microscopio interno como parte del sistema que permite la adquisición automática de imágenes seriadas de hasta 72 embriones individuales durante el desarrollo (Meseguer 2011, Cruz 2011). Estos grupos de imágenes se adquirieron en 5-7 planos focales equidistantes por pocillo y cada 15-20 minutos durante el desarrollo de los embriones.

En el EmbryoScope® el sistema de imagen utiliza luz infrarroja de baja intensidad (635nm) de un único diodo emisor con cortas ráfagas de iluminación de 30 mseg por imagen para minimizar la

exposición de los embriones a la luz y evitar así posibles daños debidos a la luz de baja longitud de onda (Somfai 2010, Sathananthan 1998).

La placa de cultivo utilizada, llamada EmbryoSlide®, consiste en una depresión central que contiene 12 pocillos cilíndricos, cada uno capaz de contener una gota de cultivo de entre 20 y 25 µl de medio. Esta depresión se cubre con una capa de aceite mineral (Sydney IVF Culture Oil, COOK Australia) para evitar la evaporación del medio de cultivo y se tapa con la cubierta del EmbryoSlide®. Las placas se prepararon con al menos cuatro horas de antelación a su uso y se depositaron en un incubador convencional para pre-equilibrar a 37°C y 5.0-6.0 % de CO₂ atmosférico. Una vez listas para su uso los ovocitos inyectados se colocaron individualmente en cada pocillo y se introdujeron en el EmbryoScope®, a 37°C y 5.0-6.0 % de CO₂ atmosférico. Los ovocitos fecundados tras inseminación por FIV convencional se introdujeron en su correspondiente EmbryoSlide® al día siguiente a su inseminación.

Los cigotos obtenidos mediante ambas técnicas fueron cultivados dentro del EmbryoScope® hasta día 3 de desarrollo embrionario, y su morfología se evaluó tanto en día 2 como en día 3.

Los parámetros morfológicos evaluados fueron:

- número, simetría y granulosidad citoplasmáticas de las blastómeras
- porcentaje y tipo de fragmentación
- presencia de blastómeras multinucleadas
- grado de compactación

3.1.3 Transferencia e implantación: en la mayoría de los casos se transfirieron dos embriones en el útero de la paciente salvo algunos en los que debido a la calidad embrionaria o deseo expreso de la paciente el número fue de uno o tres, de manera que de medía global el número de embriones

transferidos por paciente fue de 1,69. En aquellos casos en los que se dispuso de embriones supernumerarios, estos fueron criopreservados para su potencial uso futuro mediante la técnica de vitrificación (usando Cryotop y medios Kitazato BioPharma, Japón) o bien mediante congelación lenta (COOK Australia)

La implantación de los embriones transferidos se confirmó tras 7 semanas de embarazo mediante una ecografía para visualizar el número de sacos gestacionales con latido cardíaco. En 204 casos el número de sacos con latido positivo coincidió con el número de embriones transferidos, estos casos se denominaron como de implantación conocida (KID: “*known implantation data*”). Por otro lado, en los tratamientos con más de un embrión transferido pero sólo un saco visualizado (denominados implantación parcial), no fue posible determinar cuál de los embriones originó el embarazo, con lo cual no pudieron ser incluidos en el estudio. En la figura 5 se explica el desglose de los casos.

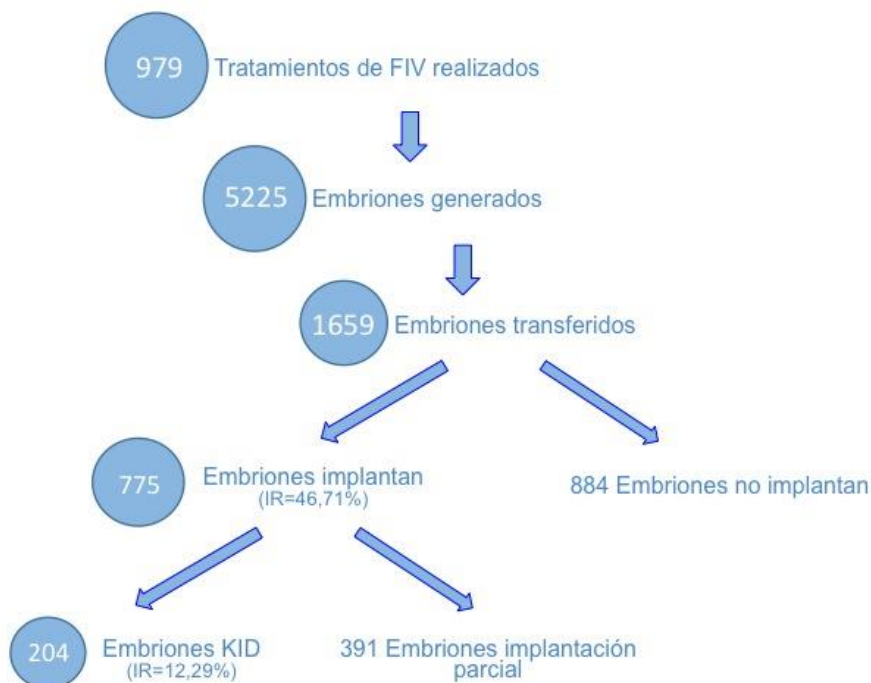


Figura 5. Representación esquemática de los casos de implantación en el estudio

De 979 tratamientos realizados se obtuvieron un total de 5225 embriones, de los cuales 1659 fueron transferidos. De ellos 884 embriones no implantaron y 775 si lo hicieron (IR=46,71%). De los 775 que implantaron tenemos: 204 embriones KID (100% implantación), 391 casos de implantación parcial (sólo uno de los dos embriones transferidos implantó) y 96 abortos bioquímicos + 84 abortos clínicos. Los 204 embriones KID nos dan una tasa de implantación del 12,29%.

3.1.4 Parámetros morfocinéticos analizados: las imágenes adquiridas durante el desarrollo de los embriones se registraron en tiempo real pero se analizaron retrospectivamente mediante una estación de trabajo externa llamada EmbryoViewer.® Consiste en un equipo que permite registrar no solo las características morfológicas del embrión sino también los tiempos exactos en los que transcurrieron las divisiones celulares desde el momento de la inseminación.

El tiempo de división se definió como aquel en el que por primera vez se ven completamente separadas las membranas de las dos células formadas (cuando la citocinesis es completa). Partiendo de ello se consideraron las siguientes variables:

- Variables Individuales:

- t0 (h): tiempo de microinyección/inseminación.
- t2 (hpi): tiempo de la división de un embrión de 1 a 2 células.
- t3 (hpi): tiempo de la división de un embrión de 2 a 3 células.
- t4 (hpi): tiempo de la división de un embrión de 3 a 4 células.

Además de estas variables individuales también se midieron los intervalos entre algunas divisiones consecutivas, que representan la duración de los ciclos celulares así como la sincronía en las divisiones. A continuación se describen las variables compuestas analizadas:

- Variables compuestas:

- $cc2 = (t3-t2)$: periodo de tiempo en el que observamos un embrión de 2 células hasta que pasa a tener 3. Esta variable nos da la duración en horas del segundo ciclo celular, permitiéndonos identificar embriones con división abrupta o directa de 2 a 3 células (DC2-3).
- $DC2-3 = cc2 (t3-t2) < 5$ h. La división directa se definió como aquella en la que el segundo ciclo celular dura menos de 5 horas.

3.1.5. Análisis Estadístico: el análisis estadístico se realizó sobre los datos de implantación conocida (KID, implantación 100% ó 0%) con respecto a la implantación absoluta; $KID\ ratio = \frac{\text{embriones implantados}}{\text{embriones implantados} + \text{embriones no implantados}}$ (saco gestacional ausente), contemplando tanto embriones DC2-3 como no-DC2-3.

La KID ratio se analizó estadísticamente utilizando un test de Fisher exacto, de dos ramas. Se utilizó una T-Student en el análisis y comparación de las variables individuales y compuestas entre los embriones DC2-3 y no DC2-3. Se consideró un valor estadísticamente significativo cuando el valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS.

3.2. Resultados:

3.2.1. Resultados clínicos: del total de 1659 embriones transferidos un total de 484 implantaron, resultando una tasa de implantación del 29.9% (IC 95%, 27.0-31.4).

La tasa de embarazo bioquímico por transferencia fue de 48.9% (IC95%, 45.8-52.1) y de embarazo clínico por transferencia fue de 43.2% (IC95%, 40.1-46.3).

3.2.2. Incidencia de la división directa e implantación: como se puede observar en la figura 6, de los 5225 embriones generados en los 979 tratamientos, 715 mostraron un patrón de división directa, lo cual supone una incidencia en la población analizada del 13.68% (IC 95%, 12,8-14,6). Dentro del grupo de 1659 embriones transferidos, este fenómeno se observó en 109 casos, lo que supone un incidencia del 6,6% (IC 95%, 5,37-7,76).

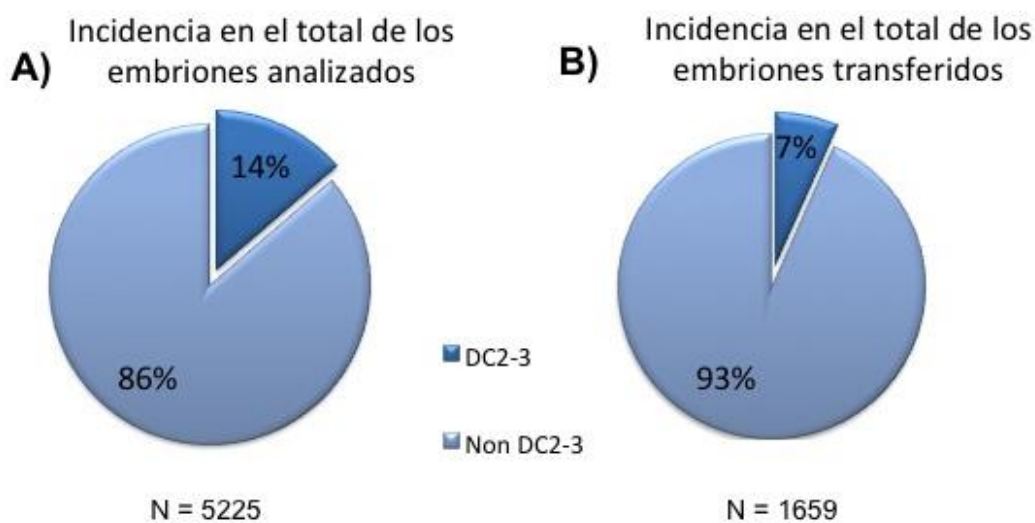


Figura 6: incidencia de la división directa sobre la población total analizada (A) y sobre el grupo de embriones transferidos (B).

Respecto a la implantación (saco gestacional con latido cardíaco positivo) encontramos grandes diferencias entre el grupo con embriones con división directa y sin ella, como se puede observar en la figura 7.

En el grupo de embriones que presentaron DC2-3, de los 109 transferidos, 24 fueron depositados en el útero de la paciente junto con embriones no DC2-3 (transferencias mixtas), con lo cual no podemos saber cual fue el embrión que implantó en cada caso. De los 85 embriones DC2-3 restantes que fueron transferidos y tenemos datos concretos de implantación (grupo KID), sólo uno implantó

correctamente (1,2% [IC 95%, 0,03-6,56]), mientras que 4 resultaron en aborto clínico o bioquímico (3,66% [IC 95%, 1,00-9,12]) y 81 resultaron en no implantación (77,06% [IC 95%, 69,09-85,69])

En cuanto a 1550 embriones no DC2-3 transferidos, el grupo KID fue de un total de 1007 embriones, de los cuales 203 implantaron (13,09% [IC 95%, 11,41-14,77]) y 804 no lo hicieron (51,87% [IC 95%, 49,38-54,35]). En el caso de 176 embriones el tratamiento finalizó en aborto bioquímico o clínico (11,41% [IC 95%, 11,41-14,77]), y respecto a implantación parcial, ocurrió en el caso de 367 embriones (23,67% [IC 95%, 21,56-25,79]).

En conclusión podemos decir que la KID ratio en los embriones DC2-3 (n = 85) fue de un 1,2% mientras que en los embriones no DC2-3 de un 20,2% (n = 1007), siendo esta diferencia significativa ($p < 0,0001$).

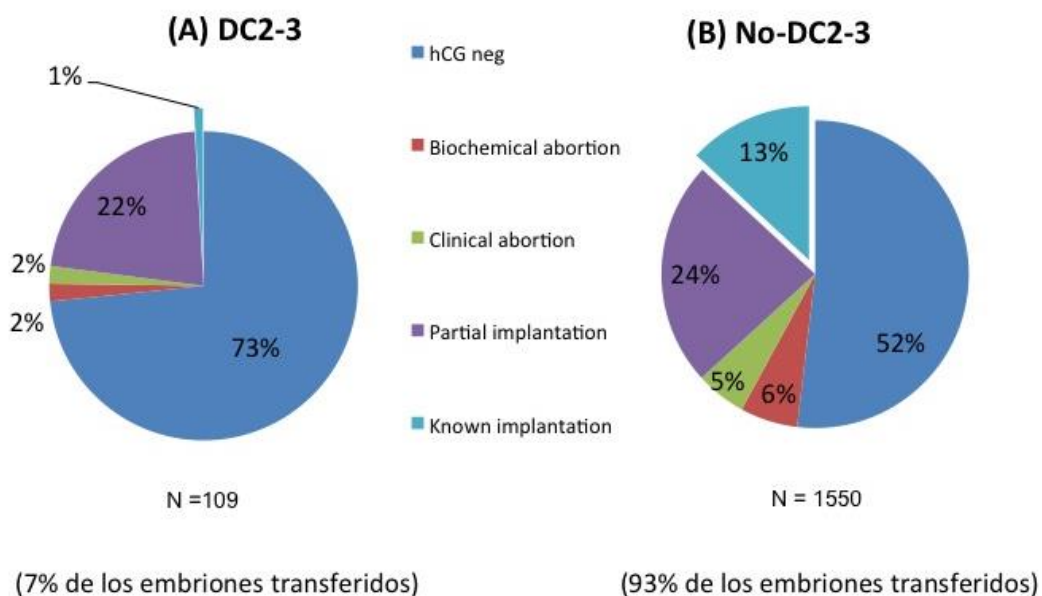


Figura 7: Implantación de los embriones transferidos que presentaron división directa, DC2-3 (A) y no DC2-3 (B). La clasificación se hizo de la siguiente manera: hCG negativa = ninguno de los embriones transferidos resultó en embarazo, aborto bioquímico = tras una hCG positiva no se visualizó saco gestacional, aborto clínico = hubo implantación embrionaria pero el tratamiento finalizó en aborto, implantación parcial = algunos de los

embriones transferidos implantaron pero no se sabe con certeza cuál de ellos específicamente, implantación conocida (KID) = todos los embriones transferidos en el tratamiento implantaron.

3.2.3. Tiempos de división: se realizó también un estudio de las variables t2, t3, t4 y cc2 en el total de embriones analizados, tanto DC2-3 como no DC2-3. La tabla 1 describe los tiempos exactos de división celular en función de la existencia o no de división directa. Se puede observar que hay diferencias significativas en todas las variables estudiadas y que la duración del segundo ciclo celular es mucho menor en los embriones que presentan división directa.

Variable	Embriones	N	Media	IC95%		p-valor
				L.inferior	L.Superior	
t2 (h)	DC2-3	715	29,1	28,5	29,8	<0.0001
	No DC2-3	4510	26,8	26,7	26,9	
t3 (h)	DC2-3	715	30,9	30,3	31,5	<0.0001
	No DC2-3	4510	38,9	38,8	39,0	
t4 (h)	DC2-3	715	38,8	37,9	39,6	<0.0001
	No DC2-3	4510	41,1	40,9	41,3	
cc2 (h)	DC2-3	715	1,75	1,63	1,88	<0.0001
	No DC2-3	4510	12,1	12,1	12,2	

t2 (tiempo a 2 células), t3 (tiempo a 3 células), t4 (tiempo a 4 células), cc2 (t3-t2)

Tabla 1: *Tiempos exactos para t2, t3, t4 y cc2 en embriones con división directa (DC2-3 < 5horas) y sin división directa (DC2-3 ≥ 5)*

3.3. Discusión:

Este estudio revela que los embriones cuya división embrionaria de dos a tres células ocurre en menos de 5 horas, incluso a veces sin pasar por el estadio de dos células, sino directamente de una a tres tienen un potencial de implantación significativamente menor que aquellos con una duración del segundo ciclo celular normal. La KID ratio de los embriones DC2-3 fue de 1,2%, frente al 20,2% de los no DC2-3. Sólo un embrión con DC2-3 implantó con seguridad y en todos los casos de implantación parcial estos embriones fueron transferidos junto con no DC2-3, de manera que podemos decir que este fenómeno tiene un alto valor predictivo de implantación; por lo tanto se trataría de un potente criterio de exclusión en cuanto a selección embrionaria.

Partiendo de datos publicados (Cummins, 1986), podemos decir que la duración del ciclo celular oscila entre 10-12 horas, y dicho intervalo es suficiente para que se den dos replicaciones consecutivas y completas del genoma y las posteriores citocinesis. Mediante la tecnología time-lapse hemos llegado a detectar ciclos celulares anormalmente breves, de hasta 1,8 horas de duración, y ello nos lleva a pensar que como consecuencia podría darse una replicación incompleta del genoma, así como una distribución no equitativa del DNA replicado entre las dos nuevas blastómeras. Los estudios de Somfai et al en modelos animales (Somfai 2010) mostraron que los cigotos con división directa tenían una capacidad de desarrollo y un número de células similar al de los embriones no DC2-3 pero con una alta frecuencia de anomalías cromosómicas que, de acuerdo a nuestra hipótesis, podría deberse a una replicación incompleta o distribución no equitativa del genoma.

La causa de este patrón de división anormal no está clara. Se ha observado en ovocitos polispérmicos (Somfai 2010, Kola 1987) y algunos estudios la ha relacionado con factores espermáticos (Somfai 2010).

Respecto a los ovocitos polispérmicos, lo que ocurre es que se forman husos meióticos con tres polos en lugar de dos, causados por un número anormalmente alto de centriolos. Kola observó al estudiar

estos ovocitos tripronucleares que la mayoría de ellos se dividían directamente a tres células y éstas tenían una composición cromosómica anómala. Pero ésta no puede ser la causa en nuestro estudio. Todos los embriones se analizaron mediante time-lapse y obviamente no se seleccionaron para transferir aquellos con síntomas de fecundación anómala, como sería el caso de cigotos tripronucleares.

En cuanto a los factores espermáticos, en los humanos los centriolos que controlan las primeras divisiones mitóticas del ovocito son introducidos por el espermatozoide. Defectos en el centrosoma podrían inducir aberraciones cromosómicas en los embriones. Estas aberraciones incluirían incorporación incompleta de los cromosomas, formación de micronúcleos, núcleos múltiples y husos meióticos anómalos, como se vio en el estudio de Sathananthan (Sathananthan 1998). En este trabajo demostró cómo los centriolos defectuosos del espermatozoide eran heredados por el ovocito y ello conducía a unas divisiones anómalas y un desarrollo embrionario comprometido. Por lo tanto cabría pensar que la calidad de los espermatozoides podría ser un factor añadido que influyese en la formación de husos meióticos anómalos en las primeras divisiones embrionarias. Podría tratarse de alteraciones en el cuello, donde se encuentran los centriolos y que normalmente se reflejan como problemas de movilidad, o también debidas a una incorrecta inmovilización durante la realización del ICSI.

En la búsqueda de más factores causantes de este fenómeno sería interesante analizar su incidencia en embriones procedentes de diferentes protocolos de estimulación, en función de si se realizó FIV convencional o ICSI, o incluso por diferentes grupos de edad. Otro análisis interesante podría ser el de la distribución de estos embriones en el grupo de pacientes; tal vez estén distribuidos aleatoriamente pero tal vez no, y resulta que existe una correlación entre el número de embriones con división directa y variables como parámetros espermáticos o el número de ovocitos obtenidos. La base de datos sobre la que trabajamos no puede proporcionarnos esta información debido a las

características multicéntricas de nuestro estudio pero sin duda estas variables van a ser analizadas en profundidad en la base de datos que se está generando en nuestra clínicas.

Una vez más cabe recalcar que estas anomalías permanecerían sin detectar cuando la selección del embrión a transferir se hace mediante simples observaciones puntuales de su morfología. Como parte complementaria del estudio decidimos analizar el tamaño de las blastómeras en el estadio de tres células en los 109 embriones catalogados mediante time-lapse como DC2-3. Para simular la observación puntual que se hubiese hecho de manera convencional en día 2 de desarrollo, se estudió la imagen de los embriones correspondiente a las 44 horas post ICSI. En este punto del desarrollo un embrión de buena calidad debería tener tres blastómeras, una de ellas más grande (supondría el 50% del volumen del embrión) y las otras dos más pequeñas (cada una de ellas un 25%). Tras analizar los embriones, vimos que 61 de ellos (56%) presentaban las tres blastómeras de igual tamaño, con lo cual hubiesen sido descartados en día 2 de desarrollo, pero eso significa que el 44% presentaban una morfología normal para ese estadio y si hubiesen sido transferidos. Como conclusión de este análisis, no podemos confiar en la morfología a través de una observación puntual para discriminar los embriones DC2-3 de aquellos con patrón de división normal. Otro conflicto que podría darse en el caso de tratar de detectar esta anomalía mediante observaciones puntuales es la dificultad para distinguir blastómeras de fragmentos de gran tamaño. Este problema no ocurre con un sistema time-lapse: al poder estudiar cada fase del ciclo celular es posible seguir la aparición y desaparición de los núcleos, de manera que se puede saber si verdaderamente se trata de tres células o dos más un fragmento.

Como ya hemos comentado anteriormente, desconocemos el origen de este fenómeno, pero tampoco sabemos si estos embriones se encuentran en cohortes de mala calidad general o se trata de anomalías puntuales. En la fase final del estudio analizamos los datos de aquellos ciclos en los que se había transferido exclusivamente un embrión DC2-3 para determinar si existía un embrión alternativo que transferir. Vimos que en 59 de los casos (54%) efectivamente había al menos un embrión extra de

calidad moderada a alta para ser transferido; a igualdad de calidad morfológica y disponiendo de un sistema time-lapse, en el 54% de los casos hubiésemos podido evitar seleccionar el embrión DC2-3, mejorando así los resultados clínicos.

Como conclusión, desconocemos la causa de la DC2-3, pero este análisis retrospectivo demuestra que los embriones con división directa de dos a tres células tienen una tasa de implantación significativamente menor que aquellos con un patrón de división normal. La relativamente elevada incidencia de este fenómeno en la cohorte embrionaria, en combinación con la baja implantación de estos embriones, nos hace afirmar que se trata de un parámetro morfocinético con la potencia suficiente para ser utilizado en la actividad clínica.

Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study

Irene Rubio, Ph.D.,^a Reidun Kuhlmann,^b Inge Agerholm, Ph.D.,^c John Kirk, M.D.,^b Javier Herrero, Ph.D.,^a María-José Escribá, Ph.D.,^a José Bellver, Ph.D.,^a and Marcos Meseguer, Ph.D.^a

^a Instituto Valenciano de Infertilidad Valencia, Universidad de Valencia, Valencia, Spain; ^b Maigaard Fertility Clinic, Aarhus, Denmark; and ^c Fertility Clinic Braedstrup, Braedstrup, Denmark

Objective: To evaluate embryos with direct cleavage (≤ 5 hours) from two to three cells (DC2–3) and correlate this morphokinetic parameter to implantation and ongoing pregnancy.

Design: Clinical multicenter retrospective study.

Setting: Private in vitro fertilization (IVF) centers.

Patient(s): From three clinics, a total of 979 treatments including 5,225 embryos using autologous or donated oocytes, of which 1,659 embryos were transferred.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Clinical pregnancy confirmed by ultrasound in week 7.

Result(s): Of the total embryo cohort, 715 (13.7%) underwent direct cleavage from two to three cells, 1,659 embryos were transferred to recipients, and 109 of the transferred embryos cleaved directly from two to three cells (6.6%). Only one DC2–3 embryo was known to result in a clinical pregnancy (1%) and 80 (73.4%) DC2–3 embryos did not implant. Of the 1,550 embryos transferred not showing DC2–3, 203 embryos were from treatments with 100% implantation (13.1%), and 804 (51.8%) embryos did not implant. The known implantation rate of DC2–3 embryos was statistically significantly lower than for embryos with a normal cleavage pattern (1.2% vs. 20.2%, respectively).

Conclusion(s): Embryos with DC2–3 had a statistically significantly lower implantation rate than embryos with a normal cleavage pattern, suggesting that rejection of these embryos for transfer could improve the implantation rate. (Fertil Steril® 2012;98:1458–63. ©2012 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Direct cleavage, embryo development, implantation, morphokinetic parameter, time lapse

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/rubio-embryo-development-time-lapse-direct-cleavage/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Evaluation of embryos in vitro has greatly improved over the past 20 years where classic embryo assessment has been supplemented by several additional morphologic characteristics that allow prediction of an embryo's development potential (1, 2).

Embryo kinetics evaluation is strongly related to most embryo morphology parameters such as cell number, fragmentation, or symmetry, but static evaluation limits their study. To remedy this, several publications have proposed morphokinetics as an

additional parameter to assist in embryo selection, as it appears to be related to embryo viability (3–8).

Many of these studies have investigated the relationship between the timing of the first embryonic division and in vitro development potential (9). Early onset of the first mitotic division is defined as a cell division resulting in a two-cell embryo at 25 to 27 hours after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Its impact on pregnancy rate in humans was first published by Edwards et al. (10). Subsequently, many studies have confirmed that the transfer of early cleavage embryos results in higher pregnancy and implantation rates compared with embryo transfers with delayed division (5, 8, 11–15).

Received May 25, 2012; revised July 24, 2012; accepted July 25, 2012; published online August 25, 2012.

I.R. has nothing to disclose. R.K. has nothing to disclose. I.A. has received consultant fees and employment from Unisense Fertilitech. J.K. has received consultant fees and employment from Unisense Fertilitech. J.H. has nothing to disclose. M.-J.E. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose. M.M. has nothing to disclose.

This work has not received any financial support from any commercial entity and the instrumentation, disposables and utensils have been fully paid by the IVI. None of the authors have any economic affiliation with Unisense Fertilitech A/S except I.A. and J.K. IVI is a minor shareholder in Unisense Fertilitech A/S.

Reprint requests: Marcos Meseguer, Ph.D., Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local, 3, Valencia 46015, Spain (E-mail: marcos.meseguer@ivi.es).

Fertility and Sterility® Vol. 98, No. 6, December 2012 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2012 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135>

Nonetheless, it has been unclear whether early cleavage is an independent predictor of pregnancy or is correlated during this period with other variables such as embryo morphology or cell number (16). Lemmen et al. (4) contributed to the discussion on the importance of early cleavage by using time-lapse recordings to confirm that early cleavage was positively and statistically significantly correlated with in vitro developmental potential (four-cell stage at day 2) but not with pregnancy outcome.

A key consideration in many studies on timing the first cleavage is the limited number of observations. Knowledge of the exact timing of an event cannot be obtained with a limited number of discrete observations. Indeed, one of the fundamental challenges in embryo quality assessment is the static evaluation of a dynamic, developing entity. Current methods evaluate the morphology at a few predefined points in time during embryo development, with a consequent lack of information about the development in between. Thus, continual monitoring might provide a strategy for creating a complete and continuous picture of embryo development kinetics (16). Time-lapse photography enables dynamic phenomena to be captured, providing an opportunity for classic embryo selection methods based on discrete observations to be improved, which may further improve the success rate of viable embryo selection.

Evidence provided by embryo time-lapse observations has defined the duration of the first cell cycles as the time between two consecutive cleavages (4, 6, 16). It has been established that the duration of the cell cycle is usually around 10 to 12 hours (4, 17), which should be sufficient time for the embryo to undergo two consecutive occurrences of cytokinesis and replicate the whole cell genome. Extremely short cell cycles could be due to other factors where an incomplete DNA replication may be associated with unequal distribution of DNA to blastomeres. By using a time-lapse monitoring system we can precisely identify each cell cycle and observe abnormal lengths of the cell cycle, such as the abrupt cleavage of human embryos from two to three cells in less than five hours, defined here as a direct cleavage (16). We studied the clinical pregnancy and implantation rates of embryos undergoing abrupt cell division from two to three cells, identified by use of time-lapse technology, to evaluate the clinical applicability of this morphokinetic parameter.

MATERIALS AND METHODS

This research project was a multicenter, retrospective study conducted by the Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI, Spain), the Maigaard Fertility Clinic (Denmark), and the Fertility Clinic Braedstrup (Denmark). The procedure was approved by the institutional review board that regulates and approves database analysis for research at IVI.

The present study sample was drawn from a total of 5,225 embryos analyzed in vitro for up to 72 hours after oocyte retrieval. These were taken from 979 in vitro fertilization (IVF) treatments between July 2009 and April 2011, and 1,659 of these embryos were subsequently transferred to the recipients. The IVI undertook 531 treatments, the Maigaard Fertility Clinic 315 treatments, and the Fertility Clinic Brædstrup

133 treatments. The data collected from the three clinics included all time-lapse observations from the specified period. Thus, the data include IVF and ICSI cycles, various stimulation protocols, a wide patient age range, and both donor and autologous cycles. All oocyte donors were from the oocyte donation program at IVI (18). Because of the rather low incidence of DC2-3, all time-lapse observations from the three clinics were included to give a suitable sample size for statistical analysis. All embryos were investigated by detailed time-lapse analysis that measured the developmental events in the hours after insemination.

Ovum Pickup and ICSI

Follicles were aspirated, and the oocytes were washed in Quinn's Advantage medium (QAM; Sage). After washing, oocytes were cultured in Quinn's Advantage Fertilization medium (QAFM; Sage) at 5.2% CO₂ and 37°C for 4 hours before oocyte denudation. Oocyte denudation was performed by mechanical pipetting in 40 IU/mL of hyaluronidase (Sydney IVF Hyaluronidase; Cook Australia) in the same medium (QAFM). Subsequently, ICSI was performed in a medium containing *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (HEPES, QAM). We performed ICSI at ×400 magnification using an Olympus IX7 microscope. Finally, the oocytes were placed on pre-equilibrated slides (EmbryoSlide; Unisense FertilTech) that also contained Quinn's Advantage cleavage (QAC) medium. In the conventional IVF cases, the oocytes were inseminated 4 hours after retrieval with 80,000 motile sperm in 1 mL of QAF medium. Fertilization was assessed after 16 to 19 hours after insemination after the cumulus and corona cells had been removed by mechanical pipetting, and the fertilized oocytes were placed on pre-equilibrated slides (EmbryoSlide) containing QAC medium.

Embryo Culture Conditions

The culture dish for the time-lapse system (EmbryoSlide) was constructed with a central depression containing 12 straight-sided cylindrical wells, each holding a culture medium droplet of 20 to 25 mL of QAC. This depression was filled with an overlay of mineral oil (Sydney IVF Culture Oil; Cook Australia) to prevent evaporation. The slides were prepared at least 4 hours in advance and were left in an incubator to pre-equilibrate at 37°C in a 5.0% to 6.0% CO₂ atmosphere. After pre-equilibration, the injected oocytes were placed individually in the EmbryoSlide microwells and were incubated in the time-lapse monitoring system at 37°C at 5.0% to 6.0% CO₂ concentration.

The IVF-inseminated oocytes were placed in the EmbryoSlide the next morning. The time-lapse instrument (EmbryoScope, Unisense FertilTech, Aarhus, Denmark) is a tri-gas incubator with a built-in microscope to automatically acquire images of up to 72 individual embryos during development (16, 19). In the EmbryoScope, the imaging system uses low-intensity red light (635 nm) from a single light-emitting diode with short illumination bursts of 30 ms per image to minimize the embryo exposure to light and to avoid emitting damaging short-wavelength light (20-22). Image stacks were acquired at five to seven equidistant focal planes every 15 or 20 minutes during embryo development inside the EmbryoScope.

Embryo Score and Implantation

Successful fertilization was assessed at 16 to 19 hours after insemination based on digital images acquired with the time-lapse monitoring system. Embryo morphology was evaluated on day 2 and day 3 based on the acquired images, taking into account the number, symmetry, and granularity of the blastomeres, type and percentage of fragmentation, presence of multinucleated blastomeres, and degree of compaction, as has previously been described elsewhere (23). In many of the treatments, two embryos were transferred, but in some cases one or three embryos were transferred because of embryo quality or the patient's request; the average number of transferred embryos was 1.69. Supernumerary embryos were frozen for potential future transfers using the Cryotop vitrification technique (Kitazato BioPharma) (24) or by the slow-freezing technique (Cook Australia).

Implantation of transferred embryos was confirmed at an ultrasound scanning for gestational sacs with fetal heartbeat after 7 weeks of pregnancy. In 204 cases, the number of gestational sacs matched the number of transferred embryos; that is, all embryos transferred in the treatment were known to implant. In treatments with multiple transfers (391 embryos) but only partial implantation, it was not possible to ascertain which of the transferred embryos had implanted. Thus, the fate (implanted or not) of the specific embryo in these treatments was unknown. Biochemical abortion was observed for 96 embryos, and clinical abortion for 84 embryos. A total of 884 embryos did not implant.

Time-Lapse Evaluation of Morphokinetic Parameters

Retrospective analysis of the acquired images of each embryo was made with an external EmbryoViewer (EV) workstation (Unisense FertiTech) by use of image analysis software in which all the considered embryo developmental events were annotated together with the corresponding timing of the events in hours after insemination. The EV was subsequently used to identify the precise timing of each cell division. The time of cleavage was defined as the first observed moment when the newly formed blastomeres were completely separated by confluent cell membranes (16). The kinetic variables were the first cleavage from one to two cells (t_2), the cleavage from the two- to three-cell stage (t_3), and the cleavage from three to four cells (t_4). The duration of the second cell cycle (cc_2) was defined as the time from division to the two-cell stage until division to the three-cell stage ($cc_2 = t_3 - t_2$). The second cell cycle also specifies the duration of the two-cell stage, allowing the identification of embryos with abrupt (or direct) cleavage from two to three cells (DC2-3). Direct cleavage from two to three cells was defined as the second cell cycle being shorter than 5 hours ($cc_2 = t_3 - t_2 < 5$ hours).

Statistical Analysis

The statistical analysis was performed on data with known implantation success (KID = known implantation data, in which the number of gestational sacs matched the number

of transferred embryos: 100% or 0) by comparing the known implantation rate, the KID ratio: $KID\ ratio = \frac{\text{Embryos known to implant}}{\text{Embryos known to implant} + \text{Embryos without gestational sac}}$ for the DC2-3 embryos and the non-DC2-3 embryos. The KID ratio was statistically analyzed using Fisher's exact test, two-tailed. The exact timings of the first (t_2), second (t_3), and third cleavage (t_4) and the duration of the second cell cycle (cc_2) were analyzed and compared for DC2-3 and non-DC2-3 transferred embryos via Student's *t*-test. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences 17.0 (SPSS Inc.).

RESULTS

Of the total 1,659 embryos transferred, a total of 484 implanted successfully (gestational sac with fetal heartbeat), giving rise to a 29.2% implantation rate (CI 95%, 27.0–31.4). The biochemical pregnancy rate per transfer was 48.9% (CI 95%, 45.8–52.1) ($n = 479$), and the clinical pregnancy rate per transfer was 43.2% (CI 95%, 40.1–46.3) ($n = 423$).

A detailed retrospective analysis of cleavage times was made for the 5,225 embryos, of which 715 (14% [CI 95%, 12.8–14.6]) underwent direct cleavage from two to three cells (DC2-3). The incidence of DC2-3 in the total embryo cohort and among the transferred embryos is presented in Figure 1. The implantation success of transferred DC2-3 and non-DC2-3 embryos is shown in Figure 2.

Of the 1,659 embryos that were transferred, a total of 109 were identified as DC2-3 (6.60% [CI 95%, 5.37–7.76]). Of these, 24 embryos (22.01% [CI 95%, 14.2–29.8]) were transferred accompanied with non-DC2-3 embryos, were considered as treatments with partial implantation, and thus the fate (implant or not) of the DC2-3 was unknown. Only one DC2-3 embryo was known to implant (1.2% [CI 95%, 0.03–6.56]). Of the 109 DC2-3 embryos transferred, 84 resulted in no implantation (77.06% [CI 95%, 69.09–85.69]), of which four DC2-3 embryos (3.66% [CI 95%, 1.00–9.12]) resulted in a biochemical or clinical abortion. Thus, the KID ratio for DC2-3 embryos was 1.2%.

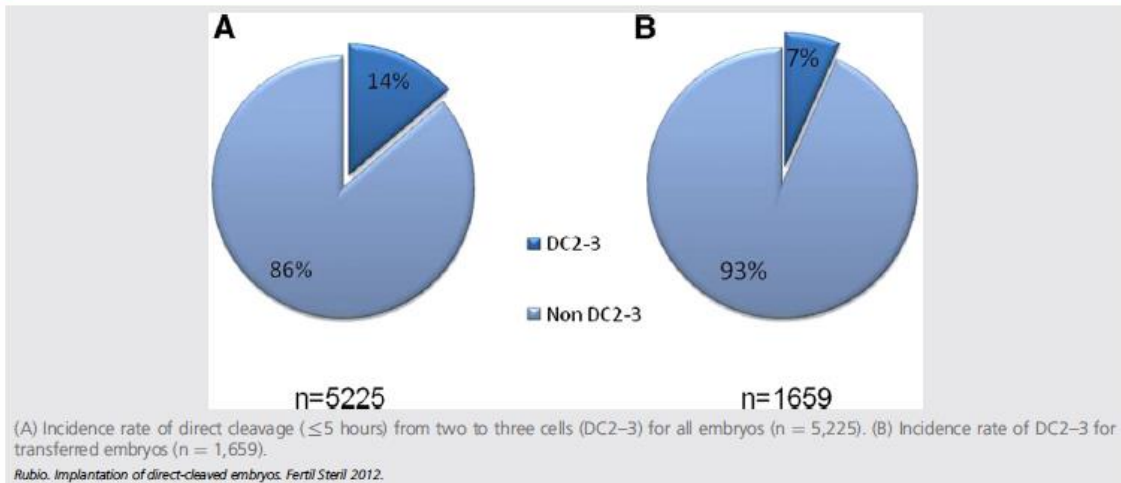
For embryos with a second cell cycle of more than 5 hours ($n = 1,550$), 203 (13.09% [CI 95%, 11.41–14.77]) were known to implant, and 804 (51.87% [CI 95%, 49.38–54.35]) failed to implant. Biochemical or clinical abortion was observed for 176 embryos (11.41% [CI 95%, 11.41–14.77]), and 367 non-DC2-3 embryos (23.67% [CI 95%, 21.56–25.79]) were from treatments with partial implantation (see Fig. 2). The KID ratio for the non-DC2-3 with known outcome—that is, implantation or not ($n = 1,007$)—was 20.2%. The KID ratio differed between DC2-3 and non-DC2-3 embryos ($P < .0001$).

We also performed a detailed analysis of t_2 , t_3 , t_4 , and cc_2 on the transferred embryos with and without DC2-3 (Table 1). This showed that t_2 on average occurred later in DC2-3 embryos than in non-DC2-3 embryos, while t_3 and t_4 occurred earlier. Similarly, in non-DC2-3 embryos, cc_2 lasted 12.1 hours, while for DC2-3 embryos this period was reduced to 1.8 hours, as expected.

DISCUSSION

This retrospective analysis demonstrates that embryos cleaving from two to three cells in less than 5 hours have

FIGURE 1



statistically significantly lower implantation potential than embryos with a normal cell cycle length. The KID ratio for DC2-3 embryos was 1.2%, and for non-DC2-3 embryos was 20.2%. Only a single DC2-3 embryo was known to implant, and all DC2-3 embryos transferred in treatments with partial implantation were transferred together with non-DC2-3 siblings. This indicates that DC2-3 is a strong predictor of implantation potential.

From published data, it has been established that the duration of the cell cycle is around 10 to 12 hours (17). This interval is sufficient for the embryo to undergo two consecutive phases of cytokinesis and replicate the whole cell genome. By use of

a time-lapse monitoring system, we detected an abnormally short cell cycle of as little as 1.8 hours. Extremely short cell cycles could be related to other factors and result in an incomplete DNA replication, which might be associated with an unequal distribution of DNA to blastomeres. As shown in previous studies with animal models, zygotes undergoing direct division from one cell to three blastomeres showed similar developmental ability and embryonic cell numbers to those with normal division, although with a high frequency of chromosomal abnormalities (20).

The cause of this kind of aberrant division pattern is not clear. Some studies have related it to sperm-driven factors

FIGURE 2

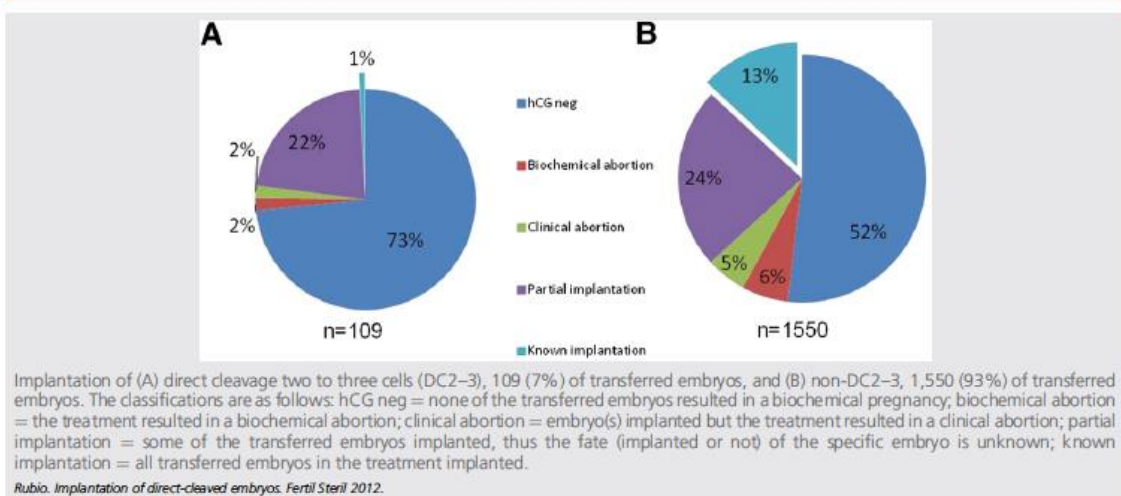


TABLE 1

Exact timing of t2, t3, t4, and cc2 from embryos with direct cleavage (< 5 hours) from two cell to three cells (DC2-3, < 5 hours) and embryos not showing direct cleavage (non-DC2-3, ≥ 5 hours).

Parameter	Hours after insemination				
	DC2-3 embryos (N = 715)		Non-DC2-3 embryos (N = 4,510)		P value
	Mean ± SD	95% CI	Mean ± SD	95% CI	
t2	29.1 ± 5.4	28.5–29.8	26.8 ± 3.4	26.7–26.9	< .0001
t3	30.9 ± 5.4	30.3–31.5	38.9 ± 4.3	38.8–39.0	< .0001
t4	38.8 ± 7.0	37.9–39.6	41.1 ± 6.0	40.9–41.3	< .0001
cc2	1.75 ± 1.06	1.63–1.88	12.1 ± 2.2	12.1–12.2	< .0001

Note: cc2 = second cell cycle; CI = confidence interval; SD = standard deviation; t2 = cleavage from one to two cells; t3 = cleavage from two- to three-cell stage; t4 = cleavage from three to four cells.

Rubio. Implantation of direct-cleaved embryos. *Fertil Steril* 2012.

(20), and it has been reported to occur in polyspermic human oocytes (20, 21). Direct cleavage from two cells to more than three blastomeres is believed in these cases to be related to the formation of tripolar spindles caused by an abnormally high number of centrioles. In human embryos, tripolar or tetrapolar spindle formation is often associated with abnormal distribution of chromosomes during cleavage in resultant blastomeres (20). Analyzing tripronuclear human oocytes, Kola et al. (21) observed that most of the tripronuclear oocytes cleaved directly to three cells at the first cleavage, and all embryos that cleaved to three cells had a severely abnormal chromosomal composition. But this explanation cannot be applied in our study, because the study population was formed from transferred embryos that obviously had been selected to avoid abnormally fertilized zygotes (i.e., tripronucleated embryos) and only properly fertilized bipronucleated zygotes were studied.

On the other hand, in humans the centrioles that control the first mitotic divisions of the oocyte are introduced by the spermatozoa; centrosomal defects could induce chromosomal aberrations in embryos, which would be morphologically expressed as nuclear defects in blastomeres. Such defects include incomplete incorporation of chromosomes, formation of micronuclei, multiple nuclei, and abnormal spindles (22). In 1991, Sathananthan (22) reported that if a defective male centrosome (centriole) was inherited by a human oocyte, it might lead to abnormal cleavage and compromised embryonic development. Consequently, it is possible that the quality of the spermatozoa could be an additional factor that influences the formation of abnormal spindles during the early cleavage of the embryo. The spermatozoa could have some alterations on the neck (reflected usually in the motility capability) where the inherited centrioles are located, or if they suffer any damage on the sperm neck during ICSI, this could be the cause of the aberrant embryo cleavage.

Embryos produced by different stimulation protocols, IVF, or ICSI, or even of different ages may differ in the morphokinetics parameters, and perhaps one of these variables affected the incidence of DC2-3 on our patient population. Further studies are mandatory to elucidate the effect of these variables. Also, it could be of interest to analyze the distribution of the DC2-3 embryos, whether they were randomly distributed among the patients or whether correlations existed

between them and variables such as sperm parameters or egg number. The database that we have currently available cannot provide this analysis due to the multicentric features of our study, but we are working to deeply analyze all these parameters from our time-lapse database, and the results will impact our future studies.

These cleavage anomalies may remain undetected when the embryo developmental status is determined by discrete observations. The continuous image acquisition and subsequent time-lapse analysis enable the exact timing of embryo cleavage in a clinical setting, which enables us to detect division phenomena such as the direct division from two to three cells. To evaluate the importance of the extra information provided by the time-lapse recordings, we inspected the single image showing the embryo 44 hours after insemination for each of the 109 DC2-3 embryos to assess the normality of their cell size. Three equal-sized blastomeres at 44 hours would be atypical for a normal embryo of good quality and could indicate a DC2-3 embryo; these normally would be discarded after use of conventional discrete embryo scoring on day 2. Of the 109 DC2-3 embryos, 61 (56%) were assessed as having a stage-specific cell size and thus would not have been classified as normal by conventional embryo scoring at day 2.

Furthermore, with time-lapse observations it is usually possible to detect if the embryo truly consists of three nucleated cells and not two cells and a large fragment, because embryos can be studied during the phase of the cell cycle when the nuclei are visible. Consequently, blastomeres with nuclei can be distinguished from large fragments without nuclei. In addition, we inspected the time-lapse data from the treatments where a DC2-3 embryo had been transferred, to determine whether there had been an alternative embryo available for transfer. The inspection was performed by a clinical embryologist. For 59 of the treatments transferring one single DC2-3 embryo (54%), there had been an extra electable embryo of moderate to high quality available. Still, these evaluations of cell size and availability of another embryo to select are subject to individual variance; they provide information on the value of time-lapse observations, and how the morphokinetic parameter DC2-3 can translate into clinical practice and improved pregnancy rates.

We do not know the exact cause of DC2-3, but this retrospective analysis demonstrates that embryos with direct

cleavage from two to three cells have a statistically significantly lower implantation rate than embryos with a normal cleavage pattern. The incidence of direct cleavage was as high as nearly 14% in the total embryonic cohort (715 cases out of 5,225 studied), which, combined with the markedly decreased implantation rate of DC2-3, means that this is a strong morphokinetic parameter that is valid for clinical use.

Acknowledgments: The authors thank Niels Birger Ramsing and Kamilla Sofie Pedersen from Unisense FertiTech for their clinical and technical support in the management of this study.

REFERENCES

- Baczowski T, Kurzawa R, Glabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol* 2004;4:5-22.
- Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007;22:230-40.
- Ciray HN, Ulug U, Tosun S, Erden HF, Bahcedi M. Outcome of 1114 ICSI and embryo transfer cycles of women 40 years of age and over. *Reprod Biomed Online* 2006;13:516-22.
- 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;17:385-91.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16:2652-7.
- Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:660.e1-5.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonners 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;13:182-7.
- 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;12:1531-6.
- Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Mendez Lozano DH, Feyereisen E, Frydman R, et al. Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril* 2008;89:1677-84.
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;1:3-23.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;76:1150-6.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177-81.
- Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2658-61.
- 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;17:407-12.
- Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY. Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:293-7.
- 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;26:2658-71.
- Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986;3:284-95.
- 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;17:3142-8.
- 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;28:569-73.
- Somjai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, et al. Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *J Reprod Dev* 2010;56:200-7.
- Kola I, Trounson A, Dawson G, Rogers P. Trippronuclear human oocytes: altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. *Biol Reprod* 1987;37:395-401.
- Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:129-39.
- 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;15:2634-43.
- Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25:2239-46.

CAPÍTULO 4

Comparación entre el cultivo y selección de embriones en sistema convencional y en sistema time-lapse.

La incubación y selección de embriones en un sistema de monitorización time-lapse mejora los resultados de embarazo comparado con un incubador convencional: un estudio retrospectivo de cohortes.

Marcos Meseguer, Irene Rubio, María Cruz, Natalia Basile, Julián Marcos y Antonio Requena

Fertility and Sterility

Vol.98, Issue 6, pp. 1481-1489, 2012

En cualquier tratamiento de reproducción asistida existen dos aspectos fundamentales directamente relacionados con el éxito del proceso. Uno de ellos es la capacidad del laboratorio de ofrecer unas condiciones de cultivo adecuadas para facilitar el desarrollo de los gametos y embriones *in vitro*, y el otro es la capacidad de los embriólogos para evaluar la calidad de los embriones y así seleccionar aquellos con un mayor potencial de implantación para ser transferidos.

Respecto al primer punto, hoy en día la mayor parte de los laboratorios cuenta con equipos (campanas de flujo laminar, incubadores, etc.) y conocimiento (adecuación de los medios de cultivo, parámetros de referencia, etc.) que permiten el desarrollo óptimo de los gametos y embriones.

En la práctica clásica, la evaluación de gametos y embriones se realiza en un momento puntual cada uno de los días del desarrollo, y podemos decir que está bien demostrada y documentada la correlación entre morfología embrionaria y viabilidad. En este sentido, diversas publicaciones han recomendado a lo largo del tiempo la evaluación secuencial de la morfología embrionaria en aras de mejorar la selección (Garrido 2002, Meseguer 2010, Melo 2009). El problema radica en que para ello es necesario sacar la placa de cultivo con los gametos y embriones del incubador y analizar bajo el microscopio las características de cada uno de los gametos/embriones (número de células y simetría, fragmentación, multinucleación, etc.). Si bien el entrenamiento y la pericia de los embriólogos hace que este proceso dure realmente poco, supone una interrupción de las condiciones de cultivo y por tanto una situación estresante que puede afectar la viabilidad de los embriones.

Este es pues el gran dilema en el laboratorio de FIV: la necesidad de evaluar gametos y embriones para poder clasificarlos y darles un destino apropiado sin interrumpir de tal manera las condiciones de cultivo que suponga un perjuicio para su desarrollo.

Este problema queda solventado con el uso de tecnología time-lapse (TMS, del inglés time-lapse monitoring system): (i) aumenta de manera exponencial el número de observaciones, (ii) estas son continuas (con lo cual se puede obtener una “película” del desarrollo completo que recoja todos los

eventos ocurridos y refleje la cinética del embrión) y (iii) no se alteran las condiciones de cultivo (García-Herrero 2011, Meseguer 2006, Meseguer 2011).

Como ya hemos mencionado en los capítulos anteriores, los estudios del grupo de Meseguer sugieren que los parámetros morfocinéticos que se pueden obtener mediante el uso de TMS podrían sustituir los métodos de selección embrionaria convencionales e incrementar las tasas de embarazo clínico en los ciclos de reproducción asistida. Una vez elaborado el modelo de selección según criterios morfocinéticos (Meseguer 2011) y profundizado en uno de los criterios de exclusión que mayor impacto tiene sobre la implantación embrionaria (Rubio 2012), con este trabajo quisimos comparar el cultivo y selección de embriones en sistema convencional (SI, del inglés *standard incubator*) y en sistema time-lapse. La intención del trabajo fue demostrar que la incubación y selección de embriones en un sistema de monitorización time-lapse mejora los resultados de embarazo comparado con un incubador convencional, y para ello realizamos un estudio retrospectivo de cohortes.

Respecto al diseño del estudio, cualquier nueva tecnología de uso clínico (como es el caso de los TMS) debe ser evaluada comparando los resultados obtenidos mediante su uso con los resultados obtenidos usando tecnología convencional. Esta evaluación se puede realizar de dos maneras: 1) mediante un estudio prospectivo donde los pacientes se distribuyen randomizadamente en dos grupos y las condiciones se mantienen tan idénticas como sea posible en ambos grupos; además debe tratarse de un estudio ciego para los grupos de tratamiento durante la evaluación; o 2) un estudio retrospectivo donde típicamente se cogen datos de un rango de condiciones heterogéneas y se agrupa para su análisis. Obviamente un estudio prospectivo es la elección ideal pero su diseño (necesidad de consentimientos informados y rigurosa aplicación del protocolo de estudio) hace que sólo un número limitado de casos clínicos realizados con la tecnología a probar pudiese ser válido para su inclusión. Este fue el motivo por el cual el estudio retrospectivo fue el elegido en la elaboración de este trabajo aunque podemos anticipar que en el siguiente capítulo se recoge el artículo donde realizamos el estudio prospectivo randomizado que completa esta tesis doctoral.

4.1. Material y Métodos

El propósito del estudio fue comparar los resultados clínicos de todos los tratamientos de ICSI realizados en el sistema time-lapse con los resultados obtenidos a partir del uso de incubadores estándar.

La elaboración del estudio se basó en los datos obtenidos a partir de diez clínicas de reproducción asistida españolas pertenecientes al mismo grupo, el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Al pertenecer a la misma entidad, todas las clínicas cumplen los mismos criterios estrictos de calidad, todas usaron el mismo tipo de equipo time-lapse y de incubadores convencionales, e idénticos o muy similares protocolos clínicos. El estudio incluyó un total de 8.414 tratamientos de reproducción asistida en el periodo comprendido entre julio del 2009 y julio del 2011. Todos los tratamientos incluidos son de ICSI porque más del 80% de los ciclos realizados con TMS en nuestras clínicas son ciclos de ICSI. El principal objetivo fue analizar la tasa de embarazo clínico en ambos grupos.

Los ciclos incluyen tanto ciclos autólogos como de donación ovocitaria, así como ciclos donde se utilizaron ovocitos frescos (donde se recuperó al menos un ovocito maduro que fue microinyectado posteriormente) como desvitrificados. La asignación de pacientes en ambos sistemas se basó fundamentalmente en el día en el que comenzó el tratamiento en el laboratorio ya que los huecos disponibles en los TMS se asignan de lunes a viernes, cuando el personal entrenado en su uso está presente.

Algunos de los ciclos no dieron lugar a transferencia embrionaria o bien hubo un fallo completo de fecundación, ninguno de estos casos fue excluido del estudio. Si se excluyeron casos que requirieron tratamientos más especializados que se salen de la normalidad y que podrían sesgar el estudio al no tener un número similar de casos en ambos grupos (estudio y control). Estos fueron casos de patologías raras o transferencia embrionaria en días diferentes a día 3 o 5 de desarrollo embrionario.

La edad media de las pacientes autólogas fue de 38.0 años (DS 4.7). En el caso de las donantes todas las incluidas en el estudio tuvieron entre 18 y 34 años (25.5 años de medía), ciclos menstruales

normales (de entre 26 y 34 días de duración) y un índice de masa corporal de 18-28 kg/m². Así mismo se aseguró que no habían seguido tratamiento endocrino (incluidos gonadotropinas y contracepción oral) en los tres meses precedentes al estudio, y útero y ovarios normales según ecografía (ausencia de signos de síndrome de ovario poliquístico). Como criterio de inclusión además se pidió que tuviesen un número de folículos antrales mayor de 20 en el primer día de administración de las gonadotropinas tras la administración del agonista de a GnRH.

Los criterios de exclusión tanto para pacientes autólogas como receptoras de ovocitos de donante fueron los siguientes: hidrosálpinx, patología uterina (miomas, adenomiosis, endocrinopatías, trombofilia, patologías crónicas adquiridas o anomalías uterinas congénitas), transferencia embrionaria diferente a días 3 y 5 de desarrollo y factor masculino severo (definido como aquel en el que encontramos < 1 millón de espermatozoides totales en el eyaculado). En el caso de los tratamientos autólogos además excluimos aquellas pacientes con endometriosis grado III o IV o índice de masa corporal >30 kg/m². Aplicando todos estos criterios de exclusión suprimimos un total de 1.109 tratamientos del estudio, quedando un total de 7.305 ciclos a analizar; de ellos 1.390 fueron en el TMS y 5.915 en el SI. De los 7.305 ciclos incluidos, 3.869 fueron ciclos autólogos y 3.436 de donación de ovocitos. Respecto al tipo de transferencia, 4.976 ciclos fueron transferencias en fresco, y en 2.329 ciclos los embriones fueron vitrificados para su transferencia en ciclos posteriores. La implantación de los embriones transferidos se confirmó mediante ecografía visualizando saco gestacional a las 7 semanas.

4.1.1 Estimulación y punción ovárica: la pauta de estimulación tanto en pacientes autólogas como receptoras de ovocitos fue la descrita por Melo et al (Melo 2009), que incluye tratamientos con agonistas y antagonistas, y desencadenación de la ovulación mediante hCG subcutánea al visualizar al menos 8 folículos de un diámetro de 18mm. La punción transvaginal para recuperar los CCOs se realizó 36 horas después; estos se lavaron en Quinn Advantage medium (QAM; SAGE). Tras

lavarlos se pusieron en cultivo en Quinn Advantage fertilization médium (QAF, SAGE) a 5,2% CO₂ y 37°C durante 4 horas hasta su decumulación.

4.1.2 Decumulación e ICSI: la decumulación de los ovocitos se hizo mediante pipeteo mecánico con capilares de diferentes diámetros en una solución de enzima hialuronidasa y posteriormente se microinyectaron los que resultaron maduros. Una vez inyectados los ovocitos se pasaron a placa de cultivo con medio pre equilibrado. En aquellos casos en los que los ovocitos pasaron al TMS fueron cultivados en placas EmbryoSlide®, mientras que en los casos asignados a SI se colocaron en placas Petri convencionales. La preparación de las placas de cultivo en ambos casos fue siempre con al menos 4 horas de antelación a su uso, pre equilibrando el medio en un incubador estándar a at 37°C y 5.0% CO₂.

4.1.3 Cultivo embrionario: el cultivo en el TMS requiere del uso de placas específicas (EmbryoSlide®; Unisense Fertili-Tech). Se trata de placas de cultivo con 12 pocillos, cada uno de ellos con un micropocillo central en su interior. El volumen de medio que contienen es de 20 µl (Cleavage Medium, COOK Sidney IVF) y todos ellos se cubren con una capa de 1,4 ml de aceite mineral (Irvine) para evitar la evaporación. En caso de formarse burbujas han de ser retiradas, ya que pueden interferir en las imágenes tomadas durante el cultivo. En el caso de los incubadores convencionales el cultivo se hizo en placas Petri corrientes siguiendo los protocolos habituales (gotas de 50 µl cubiertas con 10 ml de aceite mineral). En aquellos casos en los que la transferencia embrionaria se hizo en día 5 de desarrollo, se cambió a medio fresco pre equilibrado en día 3 (Blastocyst Medium, COOK Sidney IVF) para continuar hasta el estadio de blastocisto.

En ambos casos el cultivo fue en las mismas condiciones atmosféricas: 37°C y 5% CO₂, O₂ atmosférico.

4.1.4 Clasificación embrionaria y selección: en el caso de los embriones cultivados en el sistema convencional el método de clasificación fue el seguido tradicionalmente. Los embriones se evaluaron a las 48 y 72 horas tras el ICSI (días 2 y 3 de desarrollo respectivamente). Las variables estudiadas fueron el número de células, simetría y granulosidad, tipo y porcentaje de fragmentación, presencia de blastómeras multinucleadas y grado de compactación. Los blastocistos se evaluaron 120 horas tras el ICSI (día 5 de desarrollo), en base al grado de expansión de su blastocele y el número e integridad de células de la masa celular interna (ICM) y el trofoectodermo (TE).

En el caso del TMS la clasificación y selección embrionaria fue mediante el análisis de los vídeos obtenidos con el sistema y el marcaje de los eventos morfocinéticos ocurridos durante todo el desarrollo de los embriones. Una vez anotadas todas las variables se aplicó el modelo propuesto por Meseguer (Meseguer 2011). Como hemos explicado en el capítulo anterior, en este modelo los embriones son evaluados inicialmente por morfología convencional, luego se excluyen los que presentan algún criterio de exclusión (división directa, blastómeras asimétricas o multinucleación) y finalmente se clasifican siguiendo la jerarquía basada en las variables t5, s2 y cc2.

En ambos métodos de cultivo se decidió el día de desarrollo en el que transferir (D3 vs D5) teniendo en cuenta también criterios como el número total de ovocitos obtenidos, la historia previa de la paciente, el desarrollo embrionario en ciclos anteriores y en algunos casos la petición por parte de la paciente de hacer cultivo largo.

4.1.5 Transferencia embrionaria: el protocolo de preparación endometrial de las receptoras y pacientes fue el descrito por Meseguer et al (Meseguer 2008). Las transferencias embrionarias en día 3 de desarrollo se hicieron a las 72 horas tras el ICSI y ese fue el caso en 5.398 tratamientos; en caso de transferencias en el estadio de blastocisto se hicieron 120 horas tras el ICSI y se eligió esta opción en 1.907 tratamientos.

Tras la transferencia de los embriones todas las pacientes recibieron soporte de la fase lútea cada 12 horas; en el caso de las pacientes autólogas con una dosis diaria de 200 mg de progesterona vaginal

micronizada (Progeffik, Effik), y en el caso de las receptoras con una dosis de 400 mg de progesterona.

4.1.6 Análisis estadístico: el objetivo principal del estudio fue responder a la pregunta ¿afecta el método de incubación a la tasa de embarazo (definida como presencia de latido fetal en la semana 7 de gestación)?. Para ello se hizo una regresión logística, donde el método de incubación (TMS vs SI) fue la covariable. Se consideró también que había una serie de factores que podían influir sobre la tasa de embarazo además del método de incubación, y que aparecían en diferente medida en los dos grupos de estudio, de manera que se incluyeron en el análisis como posibles factores de confusión. Son los siguientes:

- Tipo de ciclo (autólogo vs heterólogo); variable de clase
- Día de transferencia (D3 vs D5); variable de clase
- Tipo de ovocito (fresco vs desvitrificado); variable continua
- Número de ovocitos maduros microinyectados; variable continua
- Edad de las pacientes de los ciclos autólogos; variable continua
- Número de tratamientos previos; variable continua
- Número de embriones transferidos; variable de clase
- Protocolo de estimulación; variable de clase
- Etiología femenina; variable de clase
- Clínica donde se realizó el tratamiento; variable de clase

El efecto de las variables de clase se analizó mediante un test Chi-cuadrado y un test de Fisher, mientras que el efecto de las variables continuas se determinó mediante regresión lineal. Se consideró la presencia de significación estadística cuando el valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico lo realizó una empresa independiente, Larix, usando el programa SAS Statistical.

4.2. Resultados

4.2.1 Análisis de las tasas de embarazo: La figura 8 muestra la mejora relativa en la tasa de embarazo en cada clínica incluida en el estudio en los ciclos en los que se usó el TMS en comparación con el SI. Las diez clínicas están ordenadas en orden descendente de izquierda a derecha según el número de ciclos que hicieron en TMS, como indican los diamantes azules en el eje Y secundario. Todas las clínicas salvo una mejoraron en sus resultados, siendo la mejora relativa global fue de un 21,2%.

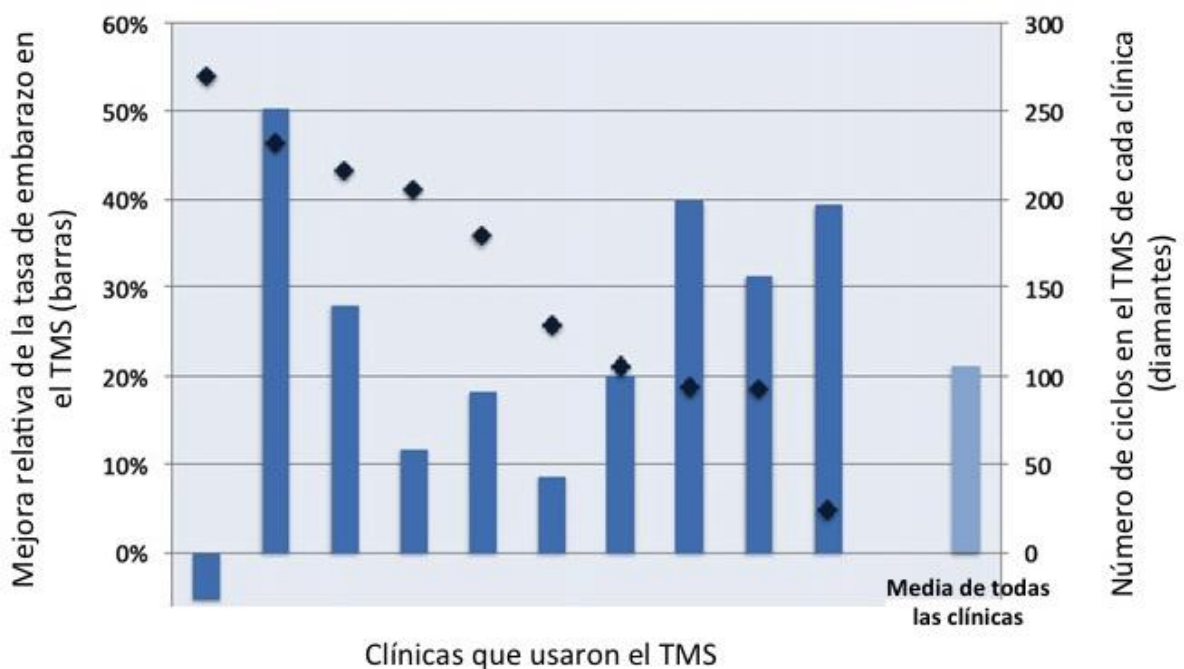


Figura 8: Diferencias en la tasa de embarazo en los ciclos realizados en cada clínica incluida en el estudio durante el periodo en el que se usó el TMS.

Además de la mejora de resultados atribuible al cultivo y selección en el TMS, las diferencias observadas podrían responder también a los siguientes motivos:

- 1) diferencias en el perfil de las pacientes de las distintas clínicas (etiología, edad, tipo de donación, etc.)
- 2) diferencias en el protocolo de estimulación elegido y día de la transferencia
- 3) diferencias en el número de ciclos incluidos en cada clínica y por lo tanto grado de influencia de cada clínica sobre el global (este parece haber sido el caso de la clínica que no experimenta mejoras, ya que la mayoría de sus ciclos TMS fueron transferencias en D3, 76%, y la mayor parte de los ciclos en el SI fueron transferencias en D5, 61%).

4.2.2 Análisis de los factores de confusión: como ya hemos explicado previamente, hay multitud de factores de confusión que podrían sesgar esa aparente mejora relativa de la tasa de embarazo. Vamos a analizarlos uno a uno.

- Ciclo autólogo vs donación ovocitaria: los ciclos de donación de óvulos tienen una tasa de embarazo significativamente más alta que la de los ciclos autólogos, como se puede ver en la figura 9A, y proporcionalmente hubo más ciclos de donación de óvulos incluidos en el grupo de TMS, con lo cual se habría dado una ventaja al grupo estudio vs control.

- Día de la transferencia: los ciclos con transferencia en día 5 tienen mayor tasa de embarazo (Figura 9B) y la mayor parte de las transferencias en día 5 se hicieron en el grupo de SI, con lo cual el grupo TMS estaría en desventaja.

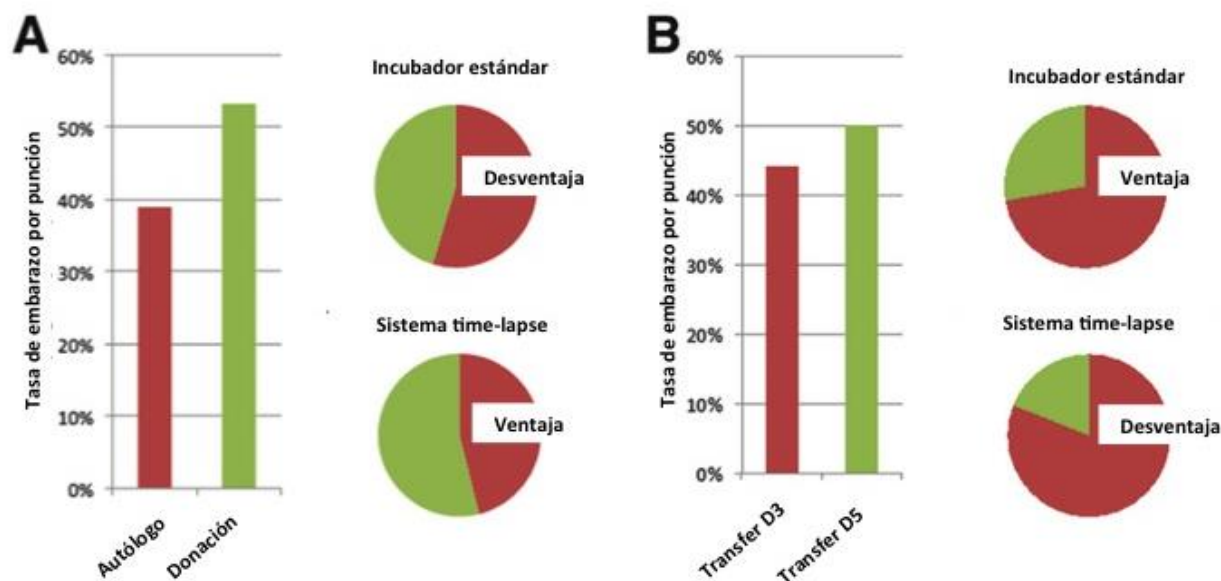


Figura 9: Representación gráfica de los dos factores de confusión principales. (A) Los ciclos de donación ovocitaria tienen una mayor tasa de embarazo en comparación con los ciclos autólogos, y hay más casos de donación en el sistema TMS. (B) Cuando la transferencia es en D5 de desarrollo embrionario la tasa de embarazo es significativamente mayor, y hay menos ciclos en D5 en el grupo del TMS.

- Resto de factores: se analizaron de similar manera las otras variables candidatas a ser factores de confusión, incluyendo el tipo de ovocito (fresco vs desvitrificado), número de ovocitos maduros inyectados (MII), edad de la paciente en los ciclos autólogos, número de tratamientos previos y número de embriones transferidos (Tabla 1). Igualmente se analizaron variables como el tipo de protocolo de estimulación, etiología femenina y clínica donde se realizó el tratamiento.

Variable	Tasa de embarazo	OR	p-Valor
Autólogo	38,9%	1,311 (95% IC 1,255-1,370)	>.001
Donado	53,4%		
Transfer D3	44,1%	1,115 (95% CI 1,059-1,173)	>.001
Transfer D5	49,9%		
Fresco	44,2%	1,039 (95% CI 0,994-1,087)	.092
Desvitrificado	46,3%		
Variable	SI	TMS	p-Valor
Edad materna	38,1 (95% CI 38,0-38,3)	37,8 (95% CI 37,6-38,1)	.017
Ovocitos MII inyectados	9,6 (95% CI 9,4-9,7)	9,5 (95% CI 9,3-9,7)	.896
Nº embriones transferidos	1,74 (95% CI 1,72-1,75)	1,79 (95% CI 1,76-1,82)	.002
Nº Tratamientos previos	2,73 (95% CI 2,67-2,79)	2,61 (95% CI 2,49-2,73)	.072

Tabla 1: Análisis de variables candidatas a ser factores de confusión

De todos estos factores sólo los incluidos en el cuadrante verde fueron incluidos finalmente en el modelo de regresión logística (Figura 10). Estos factores se caracterizan o bien por una tasa de embarazo significativamente diferente o bien por haber diferencias entre el número de casos incluidos en cada uno de los grupos (TMS vs SI).



Figura 10: Evaluación de los posibles factores de confusión incluidos en el modelo de regresión logística.

4.2.3 Tasa de cancelación: el porcentaje de ciclos sin transferencia (cancelaciones) fue significativamente menor en el grupo TMS comparando con el SI (2,8% vs 5,2%, $p = 0.0002$, test de Fisher). Esto puede deberse al mayor número de ciclos con transferencia en D3 en lugar de en blastocisto en los casos incubados en sistema time-lapse, ya que en los ciclos de cultivo prolongado la probabilidad de no tener embriones a transferir es más elevada. Esta diferencia también podría ser debida al mayor número de ciclos de donantes en el grupo de TMS; en estos casos la probabilidad de

un ciclo fallido es menor que en los ciclos con ovocitos propios. Además de estos dos motivos, también hay que considerar que las condiciones de cultivo estables y la menor manipulación en los ciclos de TMS igualmente pueden ser los motivos de esta menor tasa de cancelación en el grupo time-lapse.

4.2.4 Análisis de regresión logístico: se hizo una primera ronda de selección de variables mediante un modelo lineal en función de la clínica de tratamiento y con ello se pudo confirmar que las variables “fresco/vitrificado”, “nº de tratamiento en IVI” y “etiología femenina” carecían de poder predictivo, como ya se ha mencionado en los apartados previos.

A continuación se hizo una regresión logística completa para ver el efecto del resto de los factores de confusión, incluyendo la clínica, y se hicieron también tres cruces de variables:

- tipo de ciclo-método de incubación (donación/autólogo vs TMS/SI)
- tipo de ciclo-edad (donación/autólogo vs edad de la receptora)
- tipo de ciclo-nº ovocitos (donación/autólogo vs nº ovocitos obtenidos)

En primer lugar se vio que el efecto cruzado de tipo de ciclo-método de incubación era no significativo, de manera que se excluyó del modelo. En cambio, el número de ovocitos obtenidos y la edad de la receptora si varían en función del tipo de ciclo. El resto de las variables y estas dos interacciones mencionadas si se incluyeron en el análisis de regresión logística.

De este análisis se hicieron dos versiones, una que nos da la Odds Ratio (OR) para la tasa de embarazo en base a los 7.305 ciclos de punción (OR=1,201, es decir, 20,1% de tasa de embarazo relativa más alta en TMS que en SI), y una segunda versión que se basa en 6.961 ciclos con transferencia (OR=1,157, es decir, 15,7% de tasa de embarazo relativa más alta en TMS que en SI).

La principal diferencia entre ambos modelos es la baja tasa de cancelación en los ciclos de TMS comparando con los de SI. Podríamos decir que el primer modelo explica la intención de realizar el tratamiento y el segundo modelo refleja los tratamientos reales que se han podido realizar.

4.3. Conclusión

El resultado de este análisis de regresión logística es una tasa de embarazo significativamente mayor en los tratamientos en los que se utilizó un sistema time-lapse en lugar de un incubador convencional, siendo esa mejora sustancial de un 20,1%. La tasa de embarazo medía por ciclo iniciado en los tratamientos en los que se usó el SI fue de un 44,9%. Una mejora relativa del 20,1% significaría que esos mismos ciclos, si se hubiesen hecho en el TMS, tendrían una tasa de embarazo medía de un 53,9%, siendo la mejora absoluta de un 9%.

Teniendo en cuenta que se hicieron más transferencias en blastocisto en el grupo de SI, y que este tipo de ciclos tienen una tasa de embarazo mayor que los ciclos en D3, las ventajas del cultivo y selección en el sistema time-lapse superan con creces la influencia del cultivo prolongado a la hora de mejorar los resultados de un ciclo (20,1% vs 16,9%).

En cuanto a los motivos que pueden explicar esa mejora, puede haber varias explicaciones:

- 1) condiciones de cultivo estrictamente controladas y estables. El gas usado en el incubador se recicla cada 10 minutos haciéndolo pasar por un filtro HEPA y otro ultravioleta, eliminando así los compuestos orgánicos volátiles (VOCs, del inglés "*volatil organic compounds*"), contaminantes y partículas del aire. Además, mantiene la temperatura y concentración de gases estables y su capacidad de recuperación tras la apertura/cierre de puertas es mucho mayor que en el SI.
- 2) manipulación mínima de los embriones dentro y fuera del incubador. Gracias a la adquisición de imágenes la apertura/cierre de puerta y manipulación de los embriones es mínima, ya que no hace falta sacar los embriones del incubador para su evaluación.
- 3) mayor información disponible sobre el desarrollo embrionario para la evaluación cualitativa de su morfología. De esta manera es más sencillo distinguir aquellos embriones que siguen un patrón más adecuado de división y cuyo comportamiento permite inferir que su capacidad de implantar es mayor.

4) uso de parámetros morfocinéticos cuantitativos para la selección embrionaria. La monitorización continua de los embriones permite considerar parámetros de otro modo invisibles para el observador, aunque en este estudio no se puede asegurar que la mejora en los resultados sea debido a la aplicación del modelo diseñado por Meseguer además de por el cultivo en sí. Para saber si el método de selección además del sistema de cultivo tiene parte en la mejora de resultados es necesario un estudio prospectivo randomizado, que corresponde al siguiente capítulo de esta tesis doctoral.

Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study

Marcos Meseguer, Ph.D.,^a Irene Rubio, Ph.D.,^a Maria Cruz, Ph.D.,^b Natalia Basile, Ph.D.,^c Julian Marcos, Ph.D.,^d and Antonio Requena, M.D.^c

^a IVI, Universidad de Valencia, Valencia; ^b IVI Alicante, Alicante; ^c IVI Madrid, Madrid; and ^d IVI Murcia, Murcia, Spain

Objective: To quantify the effect on reproductive outcome of culturing and selecting embryos using a novel time-lapse monitoring system (TMS).

Design: Retrospective observational cohort study.

Setting: University-affiliated private center.

Patient(s): Donation and autologous intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles from ten IVF clinics using similar procedures, cultured in TMS (n = 1,390) or in a standard incubator (SI; n = 5,915).

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Clinical pregnancy rate confirmed by ultrasound in week 7.

Result(s): A logistic regression analysis, which included all significant confounding factors, was used to evaluate the effect of culturing and selecting embryos with the use of TMS. Comparing clinical pregnancy rates per oocyte retrieval with TMS and SI treatments gave a crude effect of odds ratio [OR] 1.190 (95% confidence interval [CI] 1.058–1.337). Oocyte source, maternal age, day of transfer, and number of retrieved oocytes were identified as significant confounding factors. After accounting for confounding factors, the effect of TMS culture was OR 1.201 (95% CI 1.059–1.363). Limiting analysis to treatments with embryo transfer and including number of transferred embryos as a confounding factor likewise gave a significant effect of TMS with OR 1.157 (95% CI 1.018–1.315).

Conclusion(s): Analysis of retrospective data indicated that culturing and selecting embryos by TMS significantly improved the relative probability of clinical pregnancy (+20.1% per oocyte retrieval, +15.7% per embryo transfer). The elevated clinical pregnancy rate was attributed to a combination of stable culture conditions and the use of morphokinetic parameters for embryo selection. (Fertil Steril® 2012;98:1481–9. ©2012 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Embryo development, time-lapse monitoring, culture system, clinical pregnancy, morphokinetic parameters, embryo selection

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/meseguerm-embryo-selection-time-lapse-monitoring/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

A critical step in all IVF procedures is the cultivation of fertilized oocytes and the subsequent selection of one or more presumably viable embryos for transfer. In classical IVF, embryo morphology

is inspected and evaluated at a few discrete time points during embryo development. The final decision on which embryo to transfer is based primarily on developmental stage and blastomere symmetry at the day of transfer, taking into account morphology evaluation at earlier observation points (1). A clear correlation between embryo morphology and viability has been well established and extensively documented, and several publications have recommended sequential assessment of

Received April 3, 2012; revised August 8, 2012; accepted August 9, 2012; published online September 10, 2012.

M.M. has nothing to disclose. I.R. has nothing to disclose. M.C. has nothing to disclose. N.B. has nothing to disclose. J.M. has nothing to disclose. A.R. has nothing to disclose.

IVI is a minor shareholder in Unisense Fertiltech.

Presented in part as an abstract submitted to the European Society for Human Reproduction and Embryology annual conference, 2012, in Istanbul.

Reprint requests: Marcos Meseguer, Ph.D., Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local, 3, Valencia 46015, Spain (E-mail: marcos.meseguer@ivi.es).

Fertility and Sterility® Vol. 98, No. 6, December 2012 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2012 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.016>

embryo morphology as a means of improving embryo selection (2, 3), although others have not found any significant improvement (4). Although multiple observations are expected to give a better understanding of embryo development, it is recognized that each observation involves handling and exposure of the embryos to suboptimal conditions outside the controlled environment of an incubator. To limit the workload and avoid stressing the embryos unnecessarily, great care has been taken to find optimal time points for morphologic assessment. Still, the embryologist's dilemma remains to strike a balance between a need to evaluate embryonic development and a need to limit handling and exposure to suboptimal conditions.

Time-lapse imaging of the developing embryo greatly increases the number of morphologic observations available to the embryologist for assessing embryo quality (5–9). The use of an automated time-lapse monitoring system (TMS) with continuous embryo surveillance provides comprehensive data on embryo development kinetics. Time-lapse monitoring allows the precise determination of the onset, duration, and interval between cell divisions. In addition, dynamic morphologic characteristics of a developing human embryo, such as pronuclei (PN) and nucleus formation and disappearance, fragmentation, and size distribution of blastomeres may be quantified with time-lapse monitoring. Quantitative measurements of the timing of embryo development, i.e., morphokinetic parameters, may be used to estimate embryo viability and implantation potential (7, 10). These recent findings suggest that morphokinetic parameters may supplement current embryo selection methods to possibly increase clinical pregnancy rates for IVF treatments. An earlier study investigated morphokinetic parameters of cleavage-stage animal embryos that could be used to predict which embryos developed successfully to the blastocyst stage (11). Recently, Wong et al. (12) identified an association between the ability of human frozen/thawed 2PN embryos to reach the blastocyst stage and early developmental parameters. Duration of the first cytokinesis, of the interphase between the first and second mitosis, and between the second and third mitosis were found to be predictors of whether an early embryo would develop into a blastocyst or not. Although any viable implanting embryo must develop to the blastocyst stage, additional factors may be required for the implantation and subsequent development. Studies of the morphokinetic parameters that characterize implanting human embryos include the time-lapse study by Lemmen et al. (7). A more recent study with a large number of transferred embryos was reported by Meseguer et al. (2011) (13), which identified embryo developmental parameters as predictors of human embryo implantation potential. That study reported an optimal range for each variable that correlated with a significantly higher probability of implantation.

Another potentially important advantage of time-lapse imaging is uninterrupted cultivation in a stable environment. Optimal culture conditions are essential for successful embryo development, implantation, and a healthy pregnancy (14–16). Strictly controlled incubation conditions are important because changes in temperature and pH may have negative effects on embryo development. Standard incubators give

excellent stability of growth conditions under constant operation. However, every time the incubator is opened, gas concentrations and temperature are significantly disturbed, and the time taken to revert to optimal growth conditions varies significantly between incubators. Embryo observation with the use of a microscope and the associated handling exposes the embryo to a different atmosphere (pO_2 and pCO_2) and possibly suboptimal temperatures. Even if the observations are performed as fast and efficiently as possible, they will invariably subject the embryo to stress if performed outside the incubator.

Advanced incubation systems that integrate strictly controlled and stable incubation conditions with uninterrupted time-lapse imaging and monitoring of the developing embryo may therefore improve reproductive outcome of IVF treatments by providing stable growth conditions, less handling, and more information to ease embryo selection. However, it is essential to evaluate the outcome of this new technology carefully to assess and document the possible benefits of time-lapse monitoring systems.

All novel medical technology, such as time-lapse monitoring of embryos, must be evaluated by comparing results obtained using the new technology and results obtained using a conventional baseline technology. Such an evaluation can be performed in two ways: 1) a prospective study, the classic highly controlled study, where patients are randomly distributed between two groups, conditions are kept as identical as possible for the two groups, and the operator should be blinded to the treatment group during evaluation; or 2) a retrospective study, where comprehensive data from a typically heterogeneous range of conditions are assembled for analysis. A prospective study is clearly preferable, but by design (informed consent and rigorous application of study protocol) it would include only a limited subset of all clinical treatments performed with the new technology. It is therefore essential that prospective studies are complemented by retrospective studies of all available data and that these studies are performed on the largest possible dataset without censorship or elimination of unfavorable results. The latter approach is used in the present study; the drawbacks and virtues of this retrospective analysis are discussed in the Supplemental Discussion (available online at www.fertstert.org).

The presented data offer a unique opportunity for a comprehensive retrospective analysis to evaluate the effect of time-lapse monitoring on treatment outcome. The data originate from ten Spanish IVF clinics that belong to the same chain of strictly controlled fertility clinics owned and operated by the Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). The ten clinics use the same time-lapse monitoring equipment and very similar standard incubators and identical or very similar clinical procedures. Herein we present a retrospective study of all intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatments performed at all IVI clinics that have used TMS clinically. The study includes 8,414 IVF treatment cycles that comprise all ICSI cycles performed in the clinics in the period when each clinic had access to the TMS system. We restricted the study to include only ICSI cycles, because the vast majority (>80%) of the TMS cycles performed at the IVI clinics were ICSI cycles. This study presents the first comprehensive

evaluation of time-lapse monitoring and use of morphokinetic parameters to improve clinical pregnancy rates in IVF. The purpose of this study was to compare the reproductive outcome of all ICSI treatments using a novel time-lapse monitoring system (TMS) with the outcome of treatments using a standard incubator (SI).

MATERIALS AND METHODS

A retrospective multicenter observational cohort study comprising a total of 8,414 assisted reproduction ICSI cycles from July 2009 to July 2011 was designed and approved by the Institutional Review Board of IVI. The study complies with the Spanish law governing assisted reproductive technologies (14/2006). The ten participating clinics were IVI Valencia I, IVI Valencia II, IVI Madrid, IVI Murcia, IVI Alicante, IVI Barcelona, IVI Sevilla, IVI Vigo, IVI Bilbao, and IVI Zaragoza. The study includes all ICSI cycles performed at the respective clinics for the period when each center was using the TMS system clinically. The first clinic started using the TMS system in July 2009 but most clinics did not receive a TMS system until 2010, so ~80% of the cycles are from the period July 2010 to July 2011.

The ICSI cycles performed at the respective clinics included all donation and autologous cycles and thus both fresh cycles where at least one mature oocyte was retrieved and ICSI performed and cycles with vitrified oocytes. Some of the cycles did not lead to embryo transfer, and these too were included, as were cycles with complete fertilization failure. However, to avoid inclusion of very rare patients with specialized treatments that could bias the results by not being evenly distributed between TMS and SI and too uncommon to be reasonably accounted for by the logistic regression model, we removed from the data used for the logistic regression analysis some of the rare pathologies and special treatments where the transfer was not on the normal day 3 (D3) or day 5 (D5). The exclusion criteria for both autologous patients and recipients were: hydrosalpinx, uterine pathology (myomas, adenomyosis, endocrinopathies, thrombophilia, chronic pathologies, acquired or congenital uterine abnormalities), transfer on days other than D3 or D5, and severe male factor (presenting <1 million sperm cells in total in the ejaculate). For autologous treatments only, patients with endometriosis (grade III or IV) or body mass index (BMI) >30 kg/m² were excluded. The exclusion criteria removed 1,109 treatments, leaving 7,305 cycles in the analysis, of which 1,390 were performed with TMS and 5,915 with SI. Of the included cycles, 4,976 were fresh transfers and 2,329 were cycles with vitrified embryos, most of which were oocyte donation cycles (57%).

All embryos were obtained after fertilization by ICSI and were part of IVI's autologous (3,869 treatments) and ovum donation programs (3,436 treatments). Implantation of transferred embryos was confirmed by ultrasound scanning for gestational sacs with fetal heart beat 7 weeks after embryo transfer.

Ovarian Stimulation, Ovum Pick-Up, and ICSI

Standard ovarian stimulation protocols were used as described in detail in the Supplemental Materials and Methods

(available online). The mean age of the female recipients was 38.0 years (SD 4.7). Ovum pick-up and ICSI followed routine procedures described in the Supplemental Materials and Methods. Immediately after ICSI, the zygotes for TMS cycles were placed in preequilibrated culture dishes (Embryoslide; Unisense Fertilitect) as described in the Supplemental Materials and Methods. Zygotes for SI cycles were placed in normal Petri dishes (Falcon) with the use of standard procedures.

Embryo Incubation

The embryos were placed individually in Embryoslide micro-wells or Petri dish droplets and incubated in the TMS (Embryoscope; Unisense Fertilitect) or the SI (Heraeus HeraCell). All embryos in both TMS and SI were incubated at 37 C, 5.0% CO₂ concentration, and atmospheric O₂ concentration until embryo transfer at D3 (72 hours after ICSI, 5,398 treatments) or D5 (120 hours after ICSI, 1,907 treatments). In summary, embryos were cultured singly in both systems in all clinics.

Image acquisition in the TMS system was performed every 15 minutes. For each embryo and time point we acquired a stack of five images at different focal planes to enable accurate assessment of the embryo morphology. The images were acquired with low-intensity red light with exposure times of 15–30 ms, and the total light exposure in the TMS was lower than the exposure during routine microscopy for the embryos incubated in the SI (13).

Embryo Scoring and Selection

Standard sequential scoring procedures were used to select embryos for transfer after incubation in the SI. The scoring system is described in (17) and in the Supplemental Materials and Methods. According to the scoring methods, we selected the embryos from the standard incubator for transfer on either D3 (n = 4,272) or D5 (n = 1,643). Similar criteria were used in all clinics for choosing the day of transfer (D3 or D5). The criteria included number of retrieved oocytes, embryo development in previous treatment cycles, and in some cases patient request for extended culture. Day 5 transfer was used for oocyte donation cycles with the use of similar criteria.

Embryo scoring and selection with the use of TMS was performed by analysis of time-lapse images of each embryo as described in the Supplemental Materials and Methods. The precise timing of cell divisions and development parameters, such as blastomere symmetry and multinucleation, were given in hours after ICSI. We used the hierarchic classification procedure described by Meseguer et al. (13) based on the exact timing of the observed cell division. The embryos cultured in the TMS were thus classified into ten categories and selected for transfer on either D3 (n = 1,126) or D5 (n = 264; see Supplemental Materials and Methods).

Statistical Analysis

The primary end point for this study was clinical pregnancy confirmed by the presence of gestational sacs with fetal heart beat by transvaginal ultrasound examination in week 7. The binary response parameter "clinical pregnancy" was either

“1” for presence of gestational sacs or “0” for absence of gestational sacs. The purpose of the analysis was to assess whether the primary end point was affected by the incubation method, i.e., TMS versus SI. A preliminary analysis of the ordinal parameter, implantation rate for each cycle, as an alternative end point gave very similar results with a significantly higher implantation rate in TMS cycles. However, because of space limitations in the publication of this manuscript, we discuss only the logistic regression analysis of the clinical pregnancy rate, because this is the most important clinical parameter.

The statistical model chosen was logistic regression with incubation method as covariate (TMS vs. SI). The study was observational and retrospective. Consequently, a series of factors may confound a simple analysis. The following list of factors have been considered to be potentially relevant to prediction of the outcome of clinical pregnancy defined as a binary variable indicating presence of gestational sac(s) and fetal heart beat confirmed by ultrasound at week 7:

- Type of incubation (TMS or SI), class variable, two states.
- Type of cycle (autologous or donation), class variable, two states.
- Day of transfer (D3 or D5), class variable, two states.
- Oocyte source (fresh or vitrified), class variable, two states.
- Number of mature oocytes microinjected (metaphase II oocytes), continuous variable.
- Patient age for autologous cycles, continuous variable.
- Number of previous treatments, continuous variable.
- Number of transferred embryos, class variable, three states.
- Stimulation protocol, class variable.
- Female etiology, class variable.
- Clinic where the cycle was performed, class variable, ten states.

Factors which were evenly distributed between TMS and SI were not included in the model, nor were factors with no significant effect on clinical outcome. Only factors that differed in incidence rate between the TMS and the SI and had a significant impact on clinical pregnancy rate were included as possible confounding factors in the model. Significant effects of class variables were determined by a chi-square test of contingency tables using Fisher exact test where appropriate. Significant effect of continuous variables was determined by linear regression where the slope must be significantly different from 0. Normal significance level of $\alpha = .05$ was used for these criteria (18).

Although the study was observational and not controlled, it is reasonable to include nontransfers in a “quasi-intention to treat” analysis, because the event of nontransfer is a typical way in which the fertility treatment can fail and nontransfer did occur more frequently in the SI (see Results). Consequently, the analysis comes in two versions: 1) based on all ICSI cycles with oocyte retrieval, including nontransfer cycles (i.e., clinical pregnancy per oocyte retrieval); and 2) only cycles with embryo transfer (i.e., clinical pregnancy per embryo transfer). In the former analysis, the number of transferred embryos was considered to be an intermediate covariate (because the number of available embryos for transfer could be a result of incubation method) and thus not included in the analysis. In the

latter, the number of transferred embryos was included in the analysis as baseline information (nominal variable). Then both scenarios were considered and quantified.

The data available for the stimulation protocol were excluded from the analysis because many treatments had incomplete information. The choice of stimulation protocol is, furthermore, closely linked to patient etiology, age, etc. Donation status has a special property, because the age of the donor remains unknown in the available database. Consequently, the effect of age acquires two different meanings in the two groups of donation and autologous cycles. Likewise, the effect of number of oocytes (#oocytes) might depend on donor status, as may the effect of incubation. Also the donation (autologous vs. donor) may interact with the incubation type (TMS vs. SI). This is treated in terms of three interactions: donation-age, donation-#oocytes, and donation-incubation type. We have tried to explain why these interactions were included, but from the statistical point of view we have to evaluate all of the possible interactions between the significant variables and keep those that are significant. This evaluation is defined as the modification of the effect of TMS on pregnancy rate. In this way, we created new variables that represented the interaction between all real confounding factors and TMS. The variables obtained were submitted to computer analysis (Wald method) and those with P values of $>.05$ were not considered to be modifiers of the effect. After this statistical analysis, the variables in question were classified as those that significantly modified the effect of TMS on the parameters of outcome considered.

The clinic identification is not of interest in itself, but is forced into the model selection procedure because it appears to be significant for some clinics. This could be due to minor differences in procedures and possible differences in the recruited patients that are not adequately described by the other confounding factors. The remaining factors, including the three interactions listed above, were introduced in a logistic regression model, treating IVF center as a fixed effect.

Statistical analyses were performed by an independent contract research organization, Larix, using SAS statistical software version 9.2.

Additional information about ovarian stimulation protocol, ovum pick-up and ICSI, preparation of culture dishes and culture media, embryo assessment and selection, and the scoring systems used can be found in the Supplemental Materials and Methods.

RESULTS

Ten clinics contributed 8,414 IVF treatment cycles to this study. These clinics all operate according to stringent and very similar procedures. However, the clinics did not contribute the same numbers of cycles. Each of the clinics except one contributed >90 TMS cycles, with the largest contribution being 269 TMS cycles. The number of SI cycles also varied widely between clinics.

Gross Results in Different Clinics

Because the clinics contributed different numbers of clinical cycles, it is possible that the overall result could be dominated

by a few active clinics where results were substantially different from the rest. It is therefore initially relevant to look at the gross results of all ICSI treatments at each clinic for the period when the clinic used TMS, without excluding any patient groups (i.e., all 8,414 ICSI cycles with oocyte retrieval).

Figure 1 shows the relative improvement in pregnancy rates for the cycles performed at each clinic using TMS versus SI. The clinics are listed in descending order according to the number of TMS cycles performed at each clinic, as indicated by the blue diamonds on the secondary y-axis. It is clear that all clinics except one experienced higher pregnancy rates for TMS cycles than for SI cycles, although there are notable differences between the clinics (as was expected—see Discussion). The average improvement was 24%, but that is a somewhat misleading figure owing to very positive results from clinics with relatively few TMS cycles. A more reasonable weighted average, where the improvement is weighted by the number of TMS cycles performed in each clinic is included in the figure (+21.2% relative improvement). Apart from the possible improvement provided by TMS, the observed differences could reflect: 1) large differences between clinics in the type of patients, i.e., etiology, age, share of donation cycles; 2) differences in the choice of protocol for the different types of patients, notably, day of embryo transfer; and/or 3) differences in the number of included cycles in each clinic and thus the extent that the result of each clinic was influenced by random variations. In consequence, differences in patient types could also bias the relative pregnancy rates for TMS versus SI cycles. This would be the case if different patient types with different prognoses were not evenly distributed between TMS and SI treatments. This appears to have been the case for the single clinic with negative results in Figure 1, where most of the TMS cycles were D3 transfers (76%), whereas most of the SI cycles were D5 transfers (61%). It is therefore essential that we evaluate and correct for possible confounding factors

when we assess the significance of potential differences between the two incubation methods.

Exclusion Criteria

Some possible confounding factors known to affect IVF outcome have such low abundance that we cannot reliably account for them and correct for them in the logistic model. We chose to eliminate those treatment cycles by excluding infrequent etiologies with known strong impact on IVF and special treatment types that are not likely to be evenly distributed between the two incubation types. From the total of 8,414 ICSI cycles collected from ten clinics, 1,109 were excluded and 7,305 retained after applying the exclusion criteria (described in Materials and Methods). It should be noted that the clinical pregnancy rates of the excluded cycles performed with TMS were consistently higher than the pregnancy rates with SI, yet they were excluded because the abundance of these rare cycles differed between the two systems and endometriosis and a high BMI are known to cause reduced pregnancy rates.

Assessment of Confounding Factors

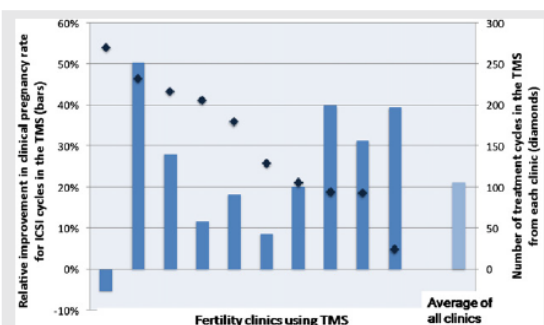
The purpose of the present study was to compare the outcome of TMS treatments with that of SI treatments. However, the large heterogeneity in the dataset necessitated a close scrutiny of possible confounding factors influencing pregnancy rates that may not have been evenly distributed between the TMS and SI treatments. One such factor is autologous versus donation cycle. Oocyte donation cycles have a significantly higher average clinical pregnancy rate than autologous cycles (bar graph in Fig. 2A), and there are proportionally more donation cycles with TMS (pie graphs in Fig. 2A). The uneven distribution of donation cycles would give TMS an advantage and higher pregnancy rates than SI.

Another confounding factor is the day of transfer, where D5 transfers have a higher pregnancy rate than D3 (bar graph in Fig. 2B). However, in our study there were fewer D5 transfers in the TMS system (pie graphs in Fig. 2B), which would lower the pregnancy outcome of TMS and disadvantage TMS compared with SI.

Similar assessments of other relevant candidate factors, including oocyte source (fresh or vitrified), number of mature oocytes microinjected (metaphase II oocytes), patient age for autologous cycles, number of previous treatments, and number of transferred embryos, are presented in Supplemental Tables 1–4, available online at www.fertstert.org. Additional candidates, such as stimulation protocol, female etiology, and clinic where the cycle was performed, which are also factors known to influence the likelihood of a successful implantation, were considered.

Figure 3 shows the outcome of the assessment of possible confounding factors that could be included in the logistic regression model. Only the parameters in the green quadrant characterized by a significant difference in pregnancy rate within the different variables and by a difference in their incidence in the TMS and the SI treatments were included in the model. There was no significant difference in pregnancy rate

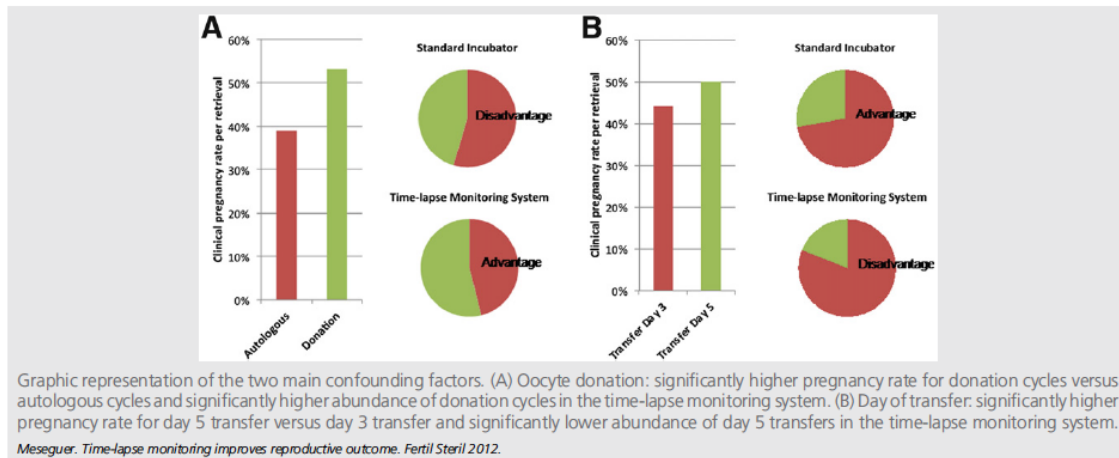
FIGURE 1



Differences in clinical pregnancy rate for all intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatments for the period in which the time-lapse monitoring system (TMS) was used in the different clinics: relative improvement in clinical pregnancy rate for all ICSI treatments using TMS versus standard incubator (blue bars, left-hand y-axis), and the number of TMS treatment cycles in each clinic (diamonds, right-hand y-axis). The average value is weighted by the number of TMS cycles in each clinic.

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. *Fertil Steril* 2012.

FIGURE 2



between fresh and frozen cycles, nor did female etiology significantly affect pregnancy outcome after the exclusion of cycles with BMI >30 kg/m² and severe endometriosis. The number of IVF cycles performed at IVI clinics was evenly distributed between TMS and SI, and, surprisingly, did not appear to correlate significantly with outcome. This could be because the IVI clinics are private clinics and many patients have tried several treatment cycles in the public system or other private chains before they are treated at IVI. These previous cycles before enrollment in the IVI system are not included in the number of IVF cycles. Some data for

BMI <30 kg/m² and stimulation protocol were missing. However, the available data indicated a similar distribution between the TMS and SI and the parameters were not included in the model.

Significant Differences in Cancellation Rates (i.e., Cycles without Transfer)

The percentage of cycles without transfer (i.e., cancellations) was lower in TMS (2.8%, 39/1,390) than in SI cycles (5.2%, 305/5,915). The difference in cancellations was significant (P=.0002; Fisher exact test) and could be related to the relatively larger number of D3 transfers than D5 transfers in the TMS group, because D5 transfers have a higher cancellation rate. In the TMS group, 19% were D5 transfers compared with 28% in the SI group. The difference could also have been due to the higher percentage of donor cycles with TMS. The reduced cancellation rate with TMS could also be due to other factors, such as incubation environment and reduced handling.

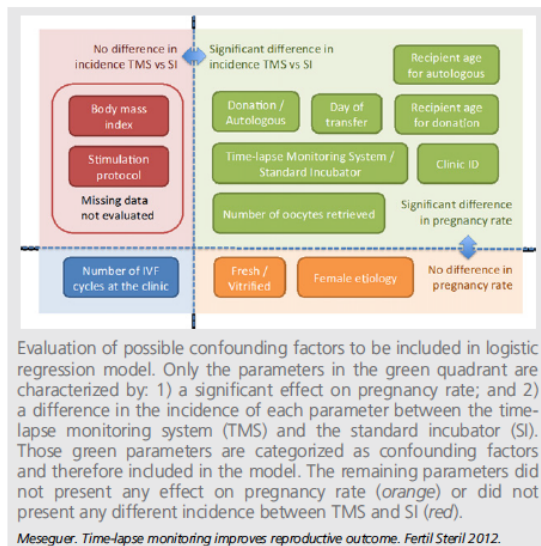
Logistic Regression Analysis

A first round of variable selection was performed in a linear model, treating the IVF center effect as random. This quite clearly confirmed that the factors “fresh/vitrified,” “cycle number within the IVI system,” and “female etiology” lacked predictive power, as discussed above.

A full logistic regression analysis was performed to account for the effect of the remaining confounding factors addressed above, including the clinic ID and the three cross-effects:

- Donation–incubation, i.e., interaction between donation/autologous versus TMS/SI.
- Donation–age, i.e., interaction between donation/autologous versus recipient age.

FIGURE 3



- Donation-#oocytes, i.e., interaction between donation/autologous versus number of retrieved oocytes.

A key finding was that the cross-effect donation-incubation could be discarded in this setup (as not significant), allowing for an overall assessment of the TMS effect. The effects of age and #oocytes depend significantly on donation status and therefore were retained in the models.

The remaining factors, including the interactions, were used in the logistic regression analysis, now treating center as a fixed effect. The final modeling results are given in Table 1. Two versions of the final model are presented:

- Odds ratio (OR) for clinical pregnancy based on 7,305 cycles with oocyte retrieval.
- Odds ratio for clinical pregnancy based on 6,961 cycles with embryo transfer.

The notable difference between the models is due to the lower cancellation rate (i.e., frequency of cycles without transfer) in the TMS cycles than in the SI cycles (see above). Model A most closely resembles “intention to treat,” because it includes the significant difference in cancellation rate discussed above and thus most closely reflects the general outcome of using TMS in place of SI.

The quantities shown for each explanatory factor are the adjusted OR estimate, confidence interval (CI), and *P* value, as well as the unadjusted crude estimates. As seen from the tables, the two models do not differ much in terms of estimated effects.

Note, however, that the alternative model B differs in the way the number of transferred embryos was used. In the first analysis, A, that variable is excluded, whereas in the second analysis, B, it is included and treated as a classification. The reason for this choice is basically that absence of transfer is directly (logically) linked to a negative response rather than being a strong predictor. “No transfer” implies a pregnancy

probability of zero, which, strictly speaking, is forbidden by the logistic model. The number of transferred embryos is thus an intermediate covariate on the pathway from oocyte retrieval to clinical pregnancy and should therefore be excluded from the analysis in model A.

In model B, which only includes treatment cycles with embryo transfer, the effect of the number of transferred embryos is treated as a class variable (with values 1, 2, or 3) and considered as baseline information.

Crude (uncorrected) ORs are listed for each of the variables in the two models. The crude ORs were obtained by disregarding the heterogeneity of data and the confounding factors, i.e., by pooling all of the data in the analysis. This uncorrected analysis of all 7,305 cycles with oocyte retrieval showed a clinical pregnancy rate that was significantly higher with TMS than with SI, with OR 1.190, i.e., a 19% higher relative pregnancy rate for TMS treatments.

The fully corrected OR in the model for clinical pregnancy per cycle with oocyte retrieval (*n* = 7,305) was 1.201 (95% CI 1.059–1.363; *P* = .0043), which corresponds to a significant relative improvement in clinical pregnancy rate of +20.1% per oocyte retrieval.

Limiting the analysis to only the treatments with embryo transfer (*n* = 6,961) and including the number of transferred embryos as a confounding factor likewise gave a significant effect of TMS, with OR 1.157 (95% CI 1.018–1.315; *P* = .0254). The effect of TMS on the relative pregnancy rate (+15.7%) was less pronounced per cycle with transfer because the significantly lower cancellation rate for TMS cycles did not factor into the estimate.

DISCUSSION

The clinical pregnancy rates with TMS and SI were compared in this large-scale retrospective analysis. Two types of study

TABLE 1

Logistic analysis of outcome, taking into account all significant confounding factors.

Factor	Comparison	Crude estimate	Estimate	Logistic regression model		<i>P</i> value
				Lower CL	Upper CL	
Odds ratio for clinical pregnancy based on 7,305 cycles with oocyte retrieval						
Incubation	TMS vs. SI	1.190	1.201	1.059	1.363	.0043
Day of transfer	Day 5 vs. day 3	1.272	1.169	1.039	1.312	.0092
Donation cycle	Donation vs. autologous	1.786	1.921	1.674	2.205	.0000
Per year of age	Per year less in autologous	1.057	1.100	1.080	1.121	.0000
	Per year less in donation cycles	0.971	1.019	1.003	1.035	.0194
No. of oocytes	Per oocyte less in autologous cycles	0.951	0.974	0.959	0.989	.0005
	Per oocyte less in donation cycles	0.914	0.946	0.925	0.966	.0000
Odds ratio for clinical pregnancy based on 6,961 cycles with embryo transfer						
Incubation	TMS vs. SI	1.141	1.157	1.018	1.315	.0254
Day of transfer	Day 5 vs. day 3	1.598	1.612	1.419	1.832	.0000
Donation cycle	Donation vs. autologous	1.653	1.709	1.483	1.969	.0000
Per year of age	Per year less in autologous	1.035	1.078	1.057	1.100	.0000
	Per year less in donation cycles	0.979	1.013	0.997	1.03	.1227
No. of oocytes	Per oocyte less in autologous cycles	0.958	0.992	0.976	1.007	.283
	Per oocyte less in donation cycles	0.923	0.967	0.946	0.989	.0033
No. transferred	3 embryos transferred vs. 1	1.448	1.714	1.199	2.451	.0031
	3 embryos transferred vs. 2	0.768	0.899	0.640	1.262	.5376

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. *Fertil Steril* 2012.

designs are usually used to evaluate new medical technology: randomized prospective study, and retrospective study. A challenge in any retrospective study is to compensate for biases of the available data. The approach used in the present study was to use the largest available dataset with broad inclusion criteria, omitting only rare events not evenly distributed in the study groups. Subsequently, statistical analysis was used to account for confounding factors. For a discussion of the approach taken, and the relative merits and weaknesses of both types of study, see the Supplemental Discussion.

Outcome of Comparison of Efficacy of TMS and SI Treatments

The result of the presented logistic regression analysis is a significantly increased clinical pregnancy rate for treatments using TMS over those using SI. The estimated relative improvement of 20.1% is substantial. The estimated improvement due to TMS incubation exceeded the effect of D5 transfer per cycle with oocyte retrieval in the same study (OR 1.169, 95% CI 1.039–1.312), giving a larger impact of TMS incubation than of blastocyst culture in the analyzed dataset (20.1% vs. 16.9% relative improvement).

For treatments with SI, the average clinical pregnancy rate per initiated cycle with oocyte retrieval was a respectable 44.9%. A relative improvement of 20.1% implies an expected clinical pregnancy rate for the same cycles had they been incubated in the TMS of 53.9%, an absolute improvement of 9%. If all of the 5,915 SI treatments had been carried out using TMS, we could thus have expected about 530 additional pregnancies. The choice of 7 weeks' gestation as the clinical outcome variable is a limitation compared with the take-home baby rate as final outcome.

Possible Explanations for Improved Pregnancy Rates with the Use of TMS

The observed increase in clinical pregnancy rate for TMS treatments may have multiple explanations: 1) strictly controlled and stable incubation conditions; 2) minimal handling of embryos inside and outside the incubator; 3) increased information on embryo development for qualitative evaluation of morphology; and 4) the use of quantitative morphokinetic parameters for selecting viable embryos. Strictly controlled and stable incubation conditions are important for embryo development, because variations in temperature and pH may impair embryo development and quality (14–16). The TMS that was used purifies the gas in the chamber by completely recycling the gas every 10 minutes through an active carbon filter, a HEPA filter, and a UV filter cartridge to effectively remove volatile organic compounds, contaminants, and particles from the airstream, a feature which may benefit embryo development. The TMS shows minimal variation of temperature and gas concentrations when doors are opened as well as a fast recovery to optimal conditions compared with the larger and slower SI. In addition, the door is opened less frequently when using the TMS, because there is no need to repeatedly remove the embryos from the incubator for evaluation. Using the TMS

for continuous embryo monitoring and documentation significantly decreases manual handling of the culture dishes and embryos, leaving the embryos undisturbed under optimal growth conditions.

TMS provides embryologists with additional information about embryo development, and it is possible that this information can be used to improve our ability to select viable embryos for transfer. The IVF clinics involved in the present study routinely use sequential observations at specific time points in their standard assessment of embryo viability. It has repeatedly been inferred that viable embryos are those that follow a predetermined temporal pattern of cell divisions and developmental events (2, 3, 19). The advent of continuous monitoring with the use of TMS allows a more precise identification of embryos that follow this normal developmental pattern and are less likely to be chromosomally abnormal (i.e., aneuploid) (6, 20). The images provided by TMS facilitate assessments of previously published observations on embryo viability, e.g., that a lack of divisional synchrony negatively affects implantation (7, 21). Furthermore, annotation and quantification of important morphokinetic parameters characterizing embryo development were performed in our clinics according to the procedures described by Meseguer et al. (13). Nevertheless, the present study cannot deduce that the significantly improved pregnancy rates found for the TMS cycles were due to the use of the hierarchic selection algorithm based on morphokinetic parameters.

Although any new technology that relatively improves clinical pregnancy rates by 20% can make a substantial difference for a given clinic at a given time, it does not automatically follow that all clinics would experience improved results all of the time. The Supplemental Discussion contains a theoretical discussion, illustrated by three figures, of the reasonable expectations from any technology that yields a relative improvement of 20%. The discussion is based on simulations using binomial distributions for pregnancy outcome with pregnancy rates that differ relatively by 20%.

CONCLUSION

The present study represents the largest retrospective analysis of clinical time-lapse treatments ever compiled and evaluated, comprising data from 7,305 IVF treatments from ten clinics (1,390 TMS cycles and 5,915 SI cycles). A specific strength of the result is that data were collected from ten different clinics and show a general clinical applicability of incubation and selection with TMS. However, collecting retrospective data from ten different clinics resulted in a heterogeneous dataset requiring complex statistical analyses, even with the clinics being part of a chain that uses very similar procedures. A comprehensive analysis of possible confounding factors was performed, and all significant confounding factors were included in a logistic regression model. The results indicate that the use of TMS instead of SI can improve the clinical pregnancy rate by an estimated relative 20% (OR 1.201; $P=.0043$). Additional advantages of the use of TMS include less handling of embryos and their dishes for intermediate observations, which would reduce the risk of loss or contamination within the laboratory. To validate the

findings of this retrospective study, a controlled randomized prospective study has been initiated to quantify the improvement of reproductive outcome due to incubation and selection with the use of TMS.

Acknowledgments: The authors acknowledge the assistance and helpful contributions of Bjørn Molt Petersen, Kamilla Sofie Pedersen, Karen Marie Hilligsøe, and Niels Birger Ramsing from Unisense Fertilitech in data analysis and in preparing this manuscript. The authors also acknowledge the helpful comments and suggestions of the anonymous peer reviewers to improve and clarify the original manuscript.

REFERENCES

1. Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011;26:1270–83.
2. Neuber E, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D. Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil Steril* 2006;85:794–6.
3. Finn A, Scott L, O'Leary T, Davies D, Hill J. Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online* 2010;21:381–90.
4. Racowsky C, Ohno-Machado L, Kin J, Biggers J. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? *Hum Reprod* 2009;9:2104–13.
5. 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;12:532–41.
6. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:660.e1–5.
7. 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;17:385–91.
8. Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, Losonczi E, Zadori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010;21:533–6.
9. 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;28:569–73.
10. Arav A, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and “shortest-half” analysis. *Reprod Biomed Online* 2008;17:669–75.
11. Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, et al. Respiration rates of individual bovine in vitro–produced embryos measured with a novel, noninvasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 2005;130:669–79.
12. 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;28:1115–21.
13. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658–71.
14. Popovic-Todorovic B, Loft A, Lindhard A, Bangsboll S, Andersson AM, Andersen AN. A prospective study of predictive factors of ovarian response in “standard” IVF/ICSI patients treated with recombinant FSH. A suggestion for a recombinant FSH dosage nomogram. *Hum Reprod* 2003;18:781–7.
15. Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson GD, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) world report: assisted reproductive technology 2003. *Fertil Steril* 2011;95:2209–22, 2222.e1–17.
16. de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2010;25:1851–62.
17. Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86:1376–85.
18. Hosmer DW, Lemeshow S. *Applied logistic regression*. 2nd ed. New York: Wiley; 2000.
19. 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;18:1307–12.
20. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens 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;13:182–7.
21. Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* 2007;22:230–40.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Allocation of patients to the two systems was largely based on the weekday of treatments, because the available slots in the time-lapse monitoring system (TMS) were filled on the weekdays, when personnel trained in the use of the TMS were in attendance.

Ovarian Stimulation in Autologous Patients and Oocyte Donors

The mean age of the female recipients was 38.0 years (SD 4.7). All donors were obtained from the IVI oocyte donation program. The detailed selection criteria for donors were as described by Garrido et al. (1). Briefly, all donors had normal menstrual cycles lasting 26–34 days, were aged 18–34 years (average 25.5 years), and had a body mass index (BMI) of 18–28 kg/m², no endocrine treatment (including gonadotropins and oral contraception) for the 3 months preceding the study, normal uterus and ovaries at transvaginal ultrasound (no signs of polycystic ovary syndrome), and an antral follicle count of >20 on the first day of gonadotropin administration, after down-regulation with GnRH agonist (2).

The protocol for controlled ovarian stimulation was as described by Melo et al. (3), and both GnRH agonist and antagonist treatments were included. hCG (Ovitrelle; Serono Laboratories) was administered subcutaneously when at least eight leading follicles reached a mean diameter of ≥18 mm. Transvaginal oocyte retrieval was scheduled 36 hours later. The protocol for endometrial preparation of recipients was as described Meseguer et al. (4).

After embryo transfer, all patients received luteal phase support every 12 hours, whereby autologous patients received a daily dose of 200 mg and oocyte recipients a daily dose of 400 mg vaginal micronized progesterone (Progeffik; Effik).

Preparation of Culture Dishes

The culture dishes (Embryoslide, Petri dishes) were prepared at least 4 hours in advance and preequilibrated in a standard incubator at 37°C and 5.0% CO₂. Culture in the TMS requires specialized cultivation slides (Embryoslide; Unisense Fertil-Tech). The culture dish is constructed with 12 wells, each with a central microwell. Each well received a culture medium droplet of 20 μL Quinn Advantage cleavage medium. To prevent evaporation of the culture medium, the slide was covered with 1.4 mL mineral oil, and any air bubbles formed in the central microwell were carefully removed.

Culture in the SI was performed in normal Petri dishes (Falcon) with the use of standard procedures. The Petri dish contained culture medium droplets of 50 μL covered with 10 mL mineral oil to prevent evaporation. Embryo culture until day 5 was performed with the use of sequential media: cleavage medium, changing to new preequilibrated medium on day 3 of development, and blastocyst medium (Sydney IVF; Cook).

Ovum Pick-Up and ICSI

Follicles were aspirated and the oocytes were washed in Quinn Advantage medium (QAM; Sage). After washing, oocytes

were cultured in Quinn Advantage fertilization medium (Sage) at 5.2% CO₂ and 37°C for 4 hours before oocyte denudation. Oocyte denudation was carried out by mechanical pipetting 40 IU/mL hyaluronidase in the same medium. Subsequently, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was performed in a medium containing HEPES (QAM) (5), at ×400 magnification with the use of an Olympus IX7 microscope. Finally, the oocytes were placed in preequilibrated culture dishes. Embryos from cycles incubated in the TMS were placed in Embryoslide. Embryos from SI cycles were placed in normal Petri dishes (Falcon) with the use of standard procedures.

Embryo Scoring and Selection

For embryos in SI, embryo morphology was evaluated at 48 and 72 hours after ICSI. Evaluated parameters included cell number, symmetry and granularity, and type and percentage of fragmentation, presence of multinucleated blastomeres, and degree of compaction, as previously described (6). Blastocysts were scored on day 5 (120 hours) based on expansion of the blastocoele and the number and integrity of both the inner cell mass (ICM) and trophectoderm cells. We defined the following groups: group A, complete trophectoderm and high-cell-number compact ICM; group B, incomplete trophectoderm and several grouped cells; and group C, few cells in trophectoderm or ICM (6). According to the scoring methods, we selected the embryos from the standard incubator for transfer on either day 3 (n = 4,272) or day 5 (n = 1,643).

Embryo scoring and selection with TMS was performed by analysis of time-lapse images of each embryo on an external computer with software developed for time-lapse image analysis, the Embryoviewer workstation (Unisense Fertil-Tech). Embryo morphology and developmental events were annotated, including precise timing of the observed cell divisions in hours after ICSI.

The precise timing of cell divisions and development parameters, such as blastomere symmetry and multinucleation, were determined, deriving the following morphokinetic parameters: time of cleavage to 2-blastomere embryo (t2); time of cleavage to 3-blastomere embryo (t3); time of cleavage to 4-blastomere embryo (t4); and time of cleavage to 5-blastomere embryo (t5). Additionally, duration of the second cell cycle (cc2), i.e., the duration of the 2-blastomere embryo phase (t3–t2), and synchrony (s2) in divisions from a 2-blastomere embryo to a 4-blastomere embryo (t4–t3) were calculated (7).

We used the hierarchic classification procedure described by Meseguer et al. (7). Briefly, the procedure starts with a morphologic screening of all embryos to eliminate embryos clearly not viable (category F). Subsequently a set of exclusion criteria is used to categorize embryos with very low implantation potential (category E), and afterward classification follows a strict hierarchy based on the binary timing of variables t5, s2, and cc2 (categories A+/A–, B+/B–, C+/C–, and D+/D–). Based on this classification procedure, embryos cultured in the TMS were classified into ten categories and selected for transfer on either day 3 (n = 1,126) or day 5 (n = 264).

SUPPLEMENTAL DISCUSSION

Approaches to Evaluation of New Technology

The prospective study is the criterion standard for technology evaluation. A well conducted prospective study has limited bias between the study groups owing to strict adherence to a detailed study protocol, inclusion and exclusion criteria, randomization, double-blind setup, and extensive validation to detect and eliminate any systematically differing factors and conditions other than the one in question. The controlled conditions, randomization, and thus limited bias are the clear advantages and merits of prospective studies. The main disadvantages of prospective studies are the limited number of cycles they represent, the long time required for their completion, and that the findings may not be directly applicable to other protocols and procedures being used clinically. Despite these limitations, the prospective study remains the cornerstone of clinical evaluation, but for general clinical applicability it must be supplemented by retrospective analyses of all available clinical data using the novel technology.

A challenge in any retrospective study is the need to compensate for the biases and shortcomings of the available data. One possible solution is to perform a comprehensive stratification of the data, which can be seen as a way of crudely mimicking conditions for a prospective study. Unfortunately, stratification often yields numerous different subsets of data, making the sample size in a single subset too small to provide sufficient statistical power. A pitfall with this approach is the temptation to focus on a single subset of data with significant trends and make interpretations therefrom, disregarding the subsets without similar trends. An alternate approach in retrospective analysis is the one used in the present study: using the largest available dataset with broad inclusion criteria and omitting only relatively rare events that are not evenly distributed in the study groups. A major challenge associated with the subsequent analysis is the considerable heterogeneity in conditions not related to the prime concern of the study. Several of these conditions often correlate with both the supposed causal variables and the dependent variable and in this way act as confounding factors. Confounding factors therefore need to be accounted for in retrospective studies, because their control helps to prevent a false-positive error leading to conclusions of a causal relationship of a factor with the dependent variable where none exists. Even after correcting for confounding factors, such an analysis will always be inferior to an analysis of a homogeneous dataset. Despite these shortcomings, retrospective studies also have virtues. A large-scale retrospective study may offer a larger explorative potential than a prospective study. Furthermore, retrospective studies can often be performed on existing data from, for example, clinical practice, and thus often have the advantage of large sample sizes and the necessary statistical power to perform appropriate analyses.

Expectations for a Novel Technology that Improves Relative Pregnancy Rates by 20%

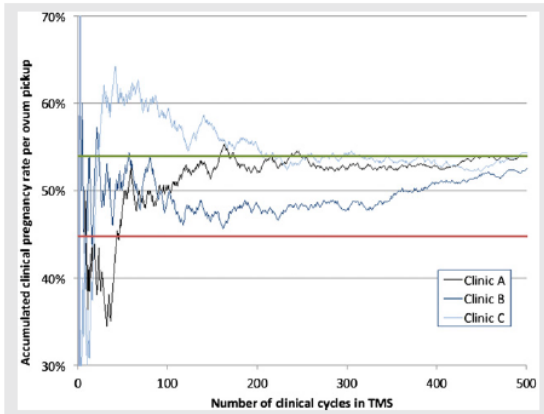
Although a new technology that improves clinical pregnancy rates by 20% can make a substantial difference for

a given clinic at a given time, it does not automatically follow that all clinics would experience improved results all of the time. Supplemental Figure 1 shows a simulation of clinical pregnancies for different clinics using a new technology with a 20.1% relative improvement in clinical pregnancy rate. The original pregnancy rate was 44.9% (as was the average pregnancy rate using SI in the present study). The simulations thus assume a relative increase in pregnancy rate by 20.1%, i.e., to 53.9%. The simulations were made with a simple random number generator giving a uniformly distributed number between 0 and 1. If the number was <0.539 , it resulted in a pregnancy. Supplemental Figure 1 shows simulations of accumulated pregnancy rates for three representative clinics after an increasing number of clinical cycles. Initial results are excellent for clinics B and C, but poor for clinic A. The outcome of the first 80 cycles in clinic A is similar or even inferior to the original pregnancy rate, and the clinic would be tempted to reconsider the new technology. Only after ~ 200 cycles does the expected improvement potential appear. Ultimately, all curves would converge on 53.9% as the numbers of cycles approach infinity. Using simple binomial distributions we can estimate the proportion of clinics expected to experience a given improvement or deterioration after a given number of cycles. Supplemental Figure 2 shows the theoretical expectations after 50, 100, and 200 cycles. After 50 treatment cycles we would still expect 10% of the clinics to have worse results than with the conventional technology, but this becomes increasingly unlikely as the number of cycles increases. After 200 cycles we would expect almost all clinics ($>99\%$) to see improvements, although a sizeable share (26% relative) still experience only a minor improvement of $<15\%$ relative. Poor initial results are thus to be expected for some clinics, but it is increasingly unlikely that the poor results would persist as the number of cycles increases. Another aspect of this is shown in Supplemental Figure 3, which depicts the same simulated dataset as Supplemental Figure 1. However, the curves in Figure 3 represent running average pregnancy rates for the last 50 treatments. All three clinics experience recurring periods of poor performance (about 10% of the time, as expected from Supplemental Figure 2), and some of the periods can be quite persistent, even though this is a purely random simulation. Based on these random simulations, it is to be expected that a running average of clinical pregnancy rates used for quality control in IVF clinics would sometimes give poor results for extensive periods of time, even if there are no physical causes of this. Obviously the clinic has to take appropriate measures to find and eliminate any possible cause of poor performance—even knowing that the inferior performance may just be a random event—and such investigations must be a recurring priority for all IVF clinics. It is possible—and even likely—that morphokinetic parameters may in the future be used for quality control to help evaluate whether or not such periods of poor performance are associated with unusual developmental patterns. Unusual development may indicate problems with embryo culture, whereas normal development may indicate that a current poor pregnancy rate is more likely to be a random event.

REFERENCES

1. Garrido N, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Flow cytometry in human reproductive biology. *GynecolEndocrinol* 2002;16:505–21.
2. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *FertilSteril* 2010;95:124–8.
3. Melo M, Busso CE, Bellver J, Alama P, Garrido N, Meseguer M, et al. GnRH agonist versus recombinant HCG in an oocyte donation programme: a randomized, prospective, controlled, assessor-blind study. *Reprod Biomed Online* 2009;19:486–92.
4. Meseguer M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *FertilSteril* 2008;89:1191–9.
5. Garda-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;22:25–36.
6. Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86:1376–85.
7. 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;26:2658–71.

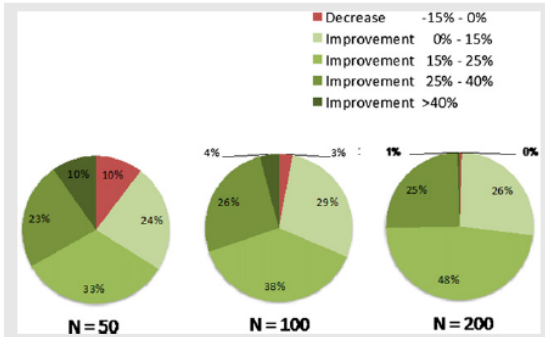
SUPPLEMENTAL FIGURE 1



Simulated development of accumulated clinical pregnancy rate for three sample clinics. The *red* line indicates the average pregnancy rate encountered in the standard incubator in the present study (44.9%). The *green* line is the expected average pregnancy rate assuming a 20.1% relative increase, i.e., 53.9%. The outcome of different clinics would vary initially, but after several hundred cycles the results converge near the expected clinical pregnancy rate. TMS = time-lapse monitoring system.

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. Fertil Steril 2012.

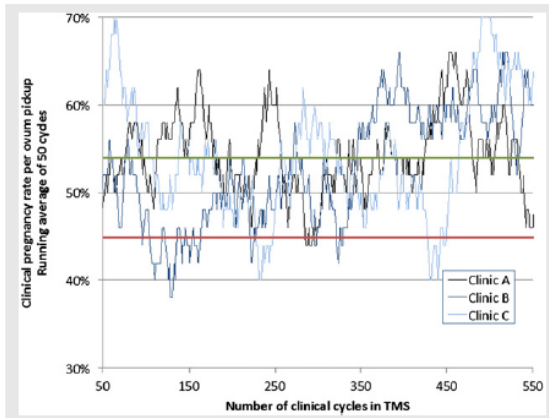
SUPPLEMENTAL FIGURE 2



Expected percentage of clinics with a given improvement after a given number of cycles based on a binomial distribution of pregnancy outcome. The clinical pregnancy rate for the standard incubator in the present study was 44.9%. The expectations assume an average pregnancy rate relative increase of 20.1%, i.e., to 53.9%. The different colored areas represent the proportions of clinics that are expected to experience a improvements in pregnancy success rate. With limited number of cycles it is to be expected that many clinics would experience an inferior or an unsustainable elevated result.

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. Fertil Steril 2012.

SUPPLEMENTAL FIGURE 3



Simulated development of running average of clinical pregnancy rate for the last 50 cycles for the three sample clinics in [Supplemental Figure 1](#). The *red* line indicates the average pregnancy rate encountered in the standard incubator in the present study (44.9%). The *green* line is the expected average pregnancy rate assuming a 20.1% relative increase, i.e., to 53.9%. Given the probability of success, it is expected that all clinics would occasionally experience extended periods with inferior results. TMS = time-lapse monitoring system.

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. Fertil Steril 2012.

SUPPLEMENTAL TABLE 1

Variations in the proportions of variables analyzed between patients using a time-lapse monitoring system (TMS) and a standard incubator (SI).

Variable	SI	TMS	P value
Autologous	83.5%	16.5%	>.001
Donated	78.3%	21.7%	
Day 3 transfer	79.2%	20.8%	>.001
Day 5 transfer	86.3%	13.7%	
Fresh	85.9%	14.1%	>.001
Vitrified-warmed	78.8%	21.2%	

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. Fertil Steril 2012.

SUPPLEMENTAL TABLE 2

Relationship between the binary variables proposed as confounding factors and clinical pregnancy.

Variable	Clinical pregnancy	OR	P value
Autologous	38.9%	1.311 (95% CI 1.255–1.370)	>.001
Donated	53.4%		
Day 3 transfer	44.1%	1.115 (95% CI 1.059–1.173)	>.001
Day 5 transfer	49.9%		
Fresh	44.2%	1.039 (95% CI 0.994–1.087)	.092
Vitrified-warmed	46.3%		

Note: CI = confidence interval.

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. *Fertil Steril* 2012.

SUPPLEMENTAL TABLE 3

Variations in the averages of variables analyzed between patients cultured in a TMS and SI.

Variable	SI	TMS	P value
Maternal age (y)	38.1 (95% CI 38.0–38.3)	37.8 (95% CI 37.6–38.1)	.017
Mature oocytes retrieved	9.6 (95% CI 9.4–9.7)	9.5 (95% CI 9.3–9.7)	.896
Transferred embryos	1.74 (95% CI 1.72–1.75)	1.79 (95% CI 1.76–1.82)	.002
No. of previous treatments	2.73 (95% CI 2.67–2.79)	2.61 (95% CI 2.49–2.73)	.072

Note: Abbreviations as in Supplemental Tables 1 and 2.

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. *Fertil Steril* 2012.

SUPPLEMENTAL TABLE 4

Mean differences in the continuous variables candidates to be confounding factors in patients achieving or not achieving a clinical pregnancy.

Variable	Pregnant	Not pregnant	P value
Maternal age (y)	38.0 (95% CI 37.8–38.1)	38.2 (95% CI 38.0–38.3)	.067
Mature oocytes retrieved	10.2 (95% CI 10.1–10.3)	9.0 (95% CI 8.9–9.1)	>.001
Transferred embryos	1.88 (95% CI 1.87–1.90)	1.63 (95% CI 1.61–1.65)	>.001
No. of previous treatments	2.73 (95% CI 2.67–2.80)	2.69 (95% CI 2.61–2.77)	.410

Meseguer. Time-lapse monitoring improves reproductive outcome. *Fertil Steril* 2012.

CAPÍTULO 5

Validación clínica del cultivo y selección de embriones en el sistema time-lapse EmbryoScope®

Validación clínica del cultivo embrionario y selección a través del análisis morfocinético: un estudio controlado y randomizado del EmbryoScope®

Irene Rubio, Aránzazu Galán, Zalóa Larreategui, Fernando Ayerdi, José Bellver, Javier Herrero y Marcos Meseguer

Fertility and Sterility

Vol.102, Issue 5, pp. 1287-1294.e5, 2014

Este capítulo es la culminación de los estudios previos sobre el EmbryoScope® como sistema de incubación time-lapse y de selección embrionaria en base a la morfocinética. Una vez creado el algoritmo de selección (Meseguer, 2011) y comprobado que la incubación en TMS ofrece una ventaja considerable en cuanto a tasa de embarazo con respecto a los incubadores estándar, el siguiente paso lógico fue realizar un estudio prospectivo randomizado para validar el modelo propuesto. El objetivo del estudio fue comprobar si el cultivo y selección en base a un modelo multivariable morfocinético mejoraba los resultados reproductivos en comparación con el cultivo en incubadores estándar y selección mediante métodos convencionales basados en la morfología. Las variables analizadas fueron la tasa de embarazo, tasa de implantación, embarazo evolutivo y pérdida gestacional.

5.1. Material y Métodos

Se trata de un estudio experimental, prospectivo, triple ciego randomizado y llevado a cabo en dos centros, las clínicas de IVI Valencia e IVI Bilbao. Este trabajo cumple con la ley española y fue aprobado por el comité ético de la institución (1009-C-088-IR); de igual manera fue inscrito en la “Clinical Trial Web Site” (www.clinicaltrials.gov) con código NCT01549262. De igual modo el tipo de incubador time-lapse utilizado en el estudio (EmbryoScope®) posee el certificado europeo de calidad (CE: DGM-673), así como la producción, instalación y mantenimiento de los incubadores y sus accesorios (CE: DGM-672).

Se incluyeron 930 pacientes de tratamientos de FIV, tanto autólogos como del programa de ovodonación en el periodo comprendido entre febrero 2012 y julio 2013. Las pacientes se dividieron randomizadamente en dos grupos:

- Grupo control: pacientes cuyos embriones se desarrollaron en incubadores convencionales y se evaluaron y seleccionaron mediante criterios morfológicos exclusivamente

- Grupo estudio: pacientes cuyos embriones se cultivaron en el EmbryoScope® y se evaluaron y seleccionaron aplicando el modelo multivariable morfocinético.

La randomización se hizo mediante una tabla generada por un sistema informático (SPSS, IBM) que fue completada por un embriólogo designado para tal fin el día antes de cada punción ovocitaria o donación.

El estudio se considera triple ciego porque (i) el embriólogo asignó el grupo de estudio en base únicamente a la tabla de randomización, y no a las características del ciclo, (ii) el ginecólogo no supo en qué grupo estaba asignada cada paciente y (iii) el estadístico que obtuvo y evaluó los resultados lo hizo en base a un código binario y no por tipo de incubador.

Los motivos de inclusión de las pacientes en el programa de ovodonación fueron: fallo en la consecución de embarazo tras al menos tres ciclos de RA, desórdenes genéticos o baja respuesta a la estimulación ovárica.

Los criterios de inclusión en el estudio para las pacientes fueron los siguientes: edad comprendida entre 20-38 años, primer o segundo ciclo de ICSI, índice de masa corporal (IMC) 18-25 kg/m². Respecto a las donantes: tener ciclos menstruales normales de entre 26 y 34 días, tener entre 18 y 34 años (la media fue de 25,5 años), IMC 18-25 kg/m², no haber recibido tratamiento endocrino (incluyendo gonadotropinas y contracepción oral) en los tres meses previos y tener útero y ovarios normales (sin signos de síndrome de ovario poliquístico).

Los criterios de exclusión fueron: factor masculino severo (nº total de espermatozoides móviles < 1 millón), hidrosálpinx, malformaciones uterinas adquiridas o congénitas, endocrinopatías, pérdida recurrente de embarazos, endometriosis o pacientes bajo tratamiento concomitante para cualquier otro problema de salud que pueda interferir en los resultados del estudio. En el caso de los ciclos autólogos, además se excluyeron aquellas pacientes diagnosticadas como baja-respondedoras (menos de 6 ovocitos metafase II por ciclo), con una hormona foliculoestimulante (FSH) basal > 12 o con

una concentración de hormona antimülleriana (AMH) < 1.7 pmol/L. Cada paciente se incluyó en el estudio una sola vez.

5.1.1 Estimulación y punción ovárica: el protocolo de estimulación fue el descrito por Melo (Melo 2009), y se usaron tanto agonistas de la GnRH como antagonistas. Se administró gonadotropina coriónica humana (hCG, Ovitrelle, Serono Laboratories) subcutáneamente cuando se detectaron al menos tres folículos de 18 mm de diámetro y 36 horas después se realizó la punción ovárica.

Los ovocitos de los ciclos de donación se usaron en fresco o tras su desvitrificación en algunos casos en los que se recurrió al banco de óvulos de la clínica. El protocolo de criopreservación de ovocitos está descrito y nuestro grupo ha publicado resultados comparables a los de los ovocitos en fresco (Cobo 2008).

La preparación endometrial de las receptoras se hizo siguiendo el protocolo descrito por Meseguer (Meseguer 2008). Tras la transferencia embrionaria las pacientes recibieron soporte de la fase lútea cada 12 horas; en el caso de los ciclos autólogos con una dosis de 400 mg diarios, mientras que en las receptoras de óvulos donados fue de 800 mg (Progeffik; Effik).

5.1.2 ICSI y Cultivo embrionario: una vez obtenidos, los ovocitos fueron mantenidos en cultivo 4 horas en una incubadora convencional a 37°C y 5,5% CO₂. La denudación de los ovocitos se realizó mecánicamente con ayuda de la enzima hialuronidasa y posteriormente se procedió a hacer el ICSI. Una vez inyectados, los ovocitos de los ciclos TMS se colocaron individualmente en placas EmbryoSlide® (descrita ya en los capítulos anteriores) pre equilibradas para comenzar el cultivo de los cigotos en el EmbryoScope® a 37°C y 5,5% CO₂. Los ovocitos inyectados de los ciclos SI (Heracell; Heraeus) se cultivaron en placas Petri convencionales en gotas de medio de cultivo a 37°C y 5,5% CO₂.

Todos los embriones, tanto en el TMS como en el SI, se cultivaron en las mismas condiciones atmosféricas y en medio Cleavage Medium (COOK) hasta día 3 de desarrollo, seguido de medio

CCM (Vitrolife) en aquellos casos en los que se hizo cultivo prolongado. La decisión de hacer o no cultivo prolongado se tomó según criterio médico y se comunicó al laboratorio de FIV el mismo día de la punción ovocitaria.

5.1.3 Evaluación y selección embrionaria: en los casos incluidos en el SI la morfología embrionaria se evaluó a las 48 y 72 horas tras el ICSI. Los parámetros considerados fueron el número de células y su simetría, granulosis citoplasmática, tipo y porcentaje de fragmentos, presencia de blastómeras multinucleadas y grado de compactación. Se definieron como embriones óptimos aquellos que en día 2 de desarrollo tenían 4 células, menos de un 15% de fragmentación, simetría buena o moderadamente buena y no multinucleación. En día 3 se consideraron embriones óptimos aquellos con 6 o más células y las condiciones previamente mencionadas en cuanto a fragmentación y simetría. Aquellos que se consideraron viables en día 3 fueron transferidos o vitrificados. En los casos en los que la transferencia se planificó en día 5 de desarrollo, la evaluación morfológica se hizo en base al grado de expansión del blastocele y el número e integridad de las células de la masa celular interna y el trofoectodermo. Según este criterio se definieron tres clases: A, trofoectodermo completo y elevado número de células altamente compactadas en la MCI; B, trofoectodermo incompleto y abundantes células agrupadas en la MCI; C, células escasas en el trofoectodermo y/o MCI. Según este criterio se seleccionaron los embriones a transferir y vitrificar en día 5, considerando óptimos aquellos A y B.

La clasificación y selección embrionaria en los ciclos TMS se hizo mediante la morfología como primer criterio de exclusión, y el marcaje y evaluación posterior de variables morfocinéticas siguiendo el modelo propuesto por Meseguer (Meseguer 2011). Como ya se explicó en los capítulos previos las variables marcadas incluyeron los tiempos de división a 2 células (t_2), a 3 células (t_3), a 4 células (t_4) y a 5 células (t_5), la duración del segundo ciclo celular (cc_2), y la sincronía de las divisiones de 2 a 4 células (s_2). Una vez aplicado el modelo cada embrión resultó clasificado en

alguna de las 9 categorías establecidas de A+ a E (Figura 1) y acorde a ello se decidió cuáles fueron candidatos a ser transferidos, vitrificados o desechados.

Con el fin de poder comparar las categorías obtenidas con el sistema de clasificación time-lapse, se trató de categorizar también en el sistema convencional, obteniéndose cinco categorías:

- Categoría 1: el cigoto 2PN está en 2 células a las 27 h tras la inseminación, 4 células en día 2, y 8 células en día 3. El tamaño de las blastómeras es equivalente en los estadios de 2, 4 y 8 células, no se observa multinucleación en ningún momento y la fragmentación es menor del 10%.
- Categoría 2: el cigoto 2PN está en una o dos células a las 27 horas, 3 o 4 células en día 2, y de 6 a 8 células en día 3. Sólo se admite una disparidad, o bien 1 célula a las 27 horas, o bien 3 células en día 2, o 6 o 7 células en día 3. Las blastómeras deben ser simétricas en los estadios de 2, 4 y 8 células, no se observa multinucleación en ningún momento y la fragmentación es menor del 10%.
- Categoría 3: el cigoto 2PN está en una o dos células a las 27 horas, 2 a 4 células en día 2, y de 6 a 8 células o mórula en día 3. El embrión puede tener blastómeras asimétricas y se puede observar multinucleación en un máximo de una blastómera en cada estadio celular. El grado de fragmentación es menor del 20%.
- Categoría 4: el cigoto 1PN o 2PN está en una o dos células a las 27 horas, 2 a 6 células en día 2, y cuatro o más de 8 células o mórula en día 3. El embrión puede tener blastómeras asimétricas y estar multinucleado. El grado de fragmentación es menor de 50%.
- Categoría 5: el embrión tiene un número cualquiera de células a las 27 horas, en día 2 y en día 3. Las blastómeras son asimétricas, y comprende cualquier tipo de multinucleación y de fragmentación. Pertenecen a esta categoría los embriones atrésicos.

5.1.4 Resultados clínicos: la variable principal analizada fue el embarazo evolutivo, confirmado por la presencia de saco gestacional con latido cardíaco detectado mediante ecografía transvaginal en la semana 12. Como variables secundarias se analizaron también las tasas de fecundación, tasa de desarrollo embrionario, tasa de implantación (calculada como número de sacos con latido cardíaco partido el número de embriones transferidos), tasa de embarazo (niveles de β hCG sérica por encima de 10 UI/mL el día 14 tras el ICSI) y tasa de pérdida gestacional temprana (considerada cuando tras una gestación positiva esta no resulta en un embarazo evolutivo).

5.1.5 Tamaño muestral y análisis estadístico: partimos de la premisa de que la tasa de embarazo clínico en nuestro programa de FIV está en torno a un 50% de media, y nuestra hipótesis de partida fue que la combinación de la morfología embrionaria y el algoritmo morfocinético junto con las mejores condiciones de cultivo del sistema time-lapse incrementaría las probabilidades de embarazo en al menos un 10%.

Para determinar el tamaño muestral necesario se utilizó macro N2IPV! 2006.02.24 (Domenech, Gransero y Sesma), obteniéndose un total de 776 pacientes, 388 por rama. Esta cifra se aumentó en un 15% con la intención de prevenir la potencial pérdida de pacientes.

La comparación cuantitativa de las variables se hizo mediante una t de Student, y la de los datos categóricos se utilizó un test de Fisher para comparar proporciones entre ambos grupos. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos siempre que $P < 0.05$ y todos los análisis estadísticos se hicieron mediante el programa SPSS.

5.2. Resultados

De las 930 pacientes incluidas en el estudio, 74 se excluyeron antes de la randomización. Otras 13 se excluyeron tras haber sido randomizadas pero antes de finalizar el ciclo, dejando un total de 843 pacientes incluidas en el estudio: 438 en el grupo estudio (TMS) y 405 en el grupo control (SI) (Figura 11).

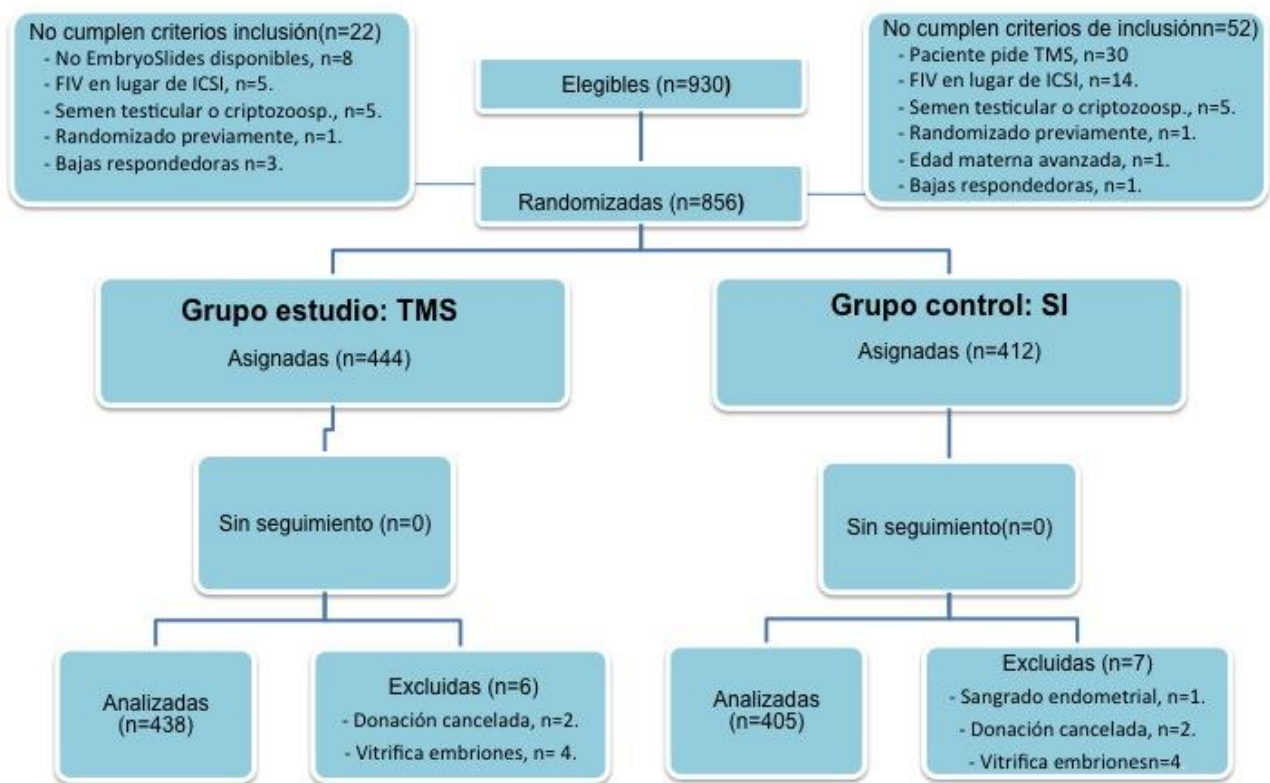


Figura 11: Diagrama de flujo que representa el número de pacientes incluido por rama y descripción de los motivos de exclusión de cada caso.

5.2.1 Características descriptivas de pacientes, donantes y receptoras en el grupo TMS y el SI

Para evaluar la efectividad de la randomización de los casos se analizaron diferentes características tanto de las pacientes, como de las donantes y las receptoras. En la tabla 2 se observa que no hay diferencias entre los dos grupos estudiados (TMS vs SI) para ninguno de los parámetros en pacientes, receptoras o donantes; en ambos grupos la edad media es similar, así como el IMC y los parámetros relacionados con la estimulación ovárica (dosis de gonadotropinas, número de ovocitos donados, duración de la estimulación y concentración final de estradiol). La tasa de fecundación media fue similar también en ambos grupos, aproximadamente un 74,5% por cohorte de ovocitos. El número de ovocitos obtenidos y número de ovocitos microinyectados fue también comparable en ambos grupos.

	TMS (n=438)	SI (n=405)	p
Edad (Años; pacientes y receptoras)	34,7 (34,4-34,9)	34,6 (34,4-34,9)	NS
IMC (kg/m ²)	23,2 (22,6-23,7)	23,04 (22,5-23,5)	NS
Estimulación: Largo, agonista GnRH (%)	14,8	16,4	NS
Estimulación: Corto, antagonista GnRH (%)	85,2	83,6	
Dosis total FSH	1781 (1709-1853)	1832 (1763-1900)	NS
Dosis total hMG	1127 (1035-1219)	990 (913-1066)	NS
E ₂ el día de hCG (pg/ml)	1981 (1882-2079)	1964 (1860-2067)	NS
P ₄ el día de hCG (ng/ml)	0,76 (0,72-0,80)	0,74 (0,70-0,78)	NS
Días de estimulación	13,0 (12,5-13,6)	13,2 (12,6-13,8)	NS
Receptoras de ovocitos (%)	47,1 (42,4-51,8)	49,1 (44,2-53,9)	NS
Ovocitos Metafase II (n)	8,0 (7,76-8,26)	8,1 (7,8-8,3)	NS
Tasa de fecundación (%)	75,3 (73,8-76,9)	74,0 (72,3-75,7)	NS
Transferencias en D3 (% del total)	72,5 % (68,3-76,7)	75,5 % (71,3-79,7)	NS
Transferencias en blastocisto (% del total)	27,5 (23,3-31,7)	24,5 (20,3-28,7)	

Tabla 2: Características descriptivas de las pacientes y de la práctica del laboratorio de FIV en los grupos estudio y control.

El porcentaje de ovocitos desvitrificados usados en ambos grupos fue muy parecido: 120 pacientes en el grupo TMS (27,4%) y 112 en el grupo SI (27,6%). El número de pacientes sometidos al primer intento en la clínica fue significativamente diferente entre un grupo y el otro: 305 (69,6%) en TMS y 328 (81,0%) en SI, $p < 0,05$. En cuanto a las diferencias en la distribución de pacientes entre las dos clínicas, también en IVI Bilbao hay un número ligeramente mayor de casos con transferencia en día 5 (31,6%) comparando con IVI Valencia (22,0%), $p < 0,05$.

5.2.2 Características del desarrollo embrionario en el grupo TMS y el SI

Respecto a las características relacionadas con desarrollo embrionario, se resumen en la tabla 3. El porcentaje de fragmentación embrionaria fue significativamente más alto en el grupo TMS comparado con el SI (7,5% vs 6,9%). También se observaron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de embriones óptimos en día 3 (46,2% vs 43,1%, $P=0,01$) y 5 de desarrollo (20,9% vs 16,6%, $P = 0,001$) a favor del TMS.

	TMS (embriones = 2638)	SI (embriones = 2427)	<i>P</i>
Fragmentación embrionaria (%)	7,5 (7,2 – 7,9)	6,9 (6,5-7,1)	0,006
Número blastómeras	6,9 (6,8 – 6,9)	6,9 (6,8 – 7,0)	NS
Embriones óptimos en D3 (%)	46,2 (44,2 -48,1)	43,1 (41,3 – 45,1)	0,010
Tasa de blastocisto (%)	52,3 (50,3 – 54,2)	50,5 (48,5 – 52,5)	NS
Embriones óptimos D5 (%)	20,9 819,4 – 22,4)	16,6 (5,1 – 18,1)	0,001
Embriones transferidos (por tratamiento)	1,86 (1,8 – 1,9)	1,86 (1,8 – 1,99)	NS
Embriones criopreservados (por tratamiento)	3,9 (3,6 – 4,1)	3,6 (3,4 – 3,9)	NS

Tabla 3: Características descriptivas del desarrollo embrionario en los grupos estudio y control

5.2.3 Correlación entre categorías morfológicas y categorías time-lapse

En las tablas 4 y 5 se muestra la correlación entre cada categoría (morfocinética o morfológica) y la tasa de implantación, correspondiendo la tabla 4 a los embriones cultivados y seleccionados en el TMS y la tabla 5 a los incluidos en el grupo SI.

Categoría embrionaria	N total (n = 513)	N Implantan	Implantación (%)	Categoría embrionaria	Implantación (%)
A+	122	74	60,6	A	52,9
A-	80	33	41,2		
B+	46	24	52,2	B	43,9
B-	36	12	33,3		
C+	67	30	44,8	C	39,5
C-	52	17	32,7		
D+	28	13	46,5	D	29,3
D-	30	4	13,3		
E	51	7	13,7	E	13,7

Tabla 4: Correlación entre las categorías morfocinéticas del algoritmo aplicado en el TMS y la tasa de implantación. Los resultados recogen únicamente aquellos ciclos con implantación conocida (0% o 100%).

Categoría embrionaria	N total (n = 469)	Implantación (%)
I	72	38,8
II	224	35,7
III	146	24,7
IV	27	11,1
V	0	-

Tabla 5: Correlación entre las categorías morfológicas convencionales y la tasa de implantación.

Los resultados recogen únicamente aquellos ciclos con implantación conocida (0% o 100%).

5.2.4 Resultados clínicos

En la tabla 6 se recogen los resultados obtenidos para las variables clínicas estudiadas. Teniendo en cuenta todos los ciclos, incluidos aquellos en los que finalmente no hubo transferencia embrionaria, la tasa de embarazo evolutivo fue significativamente mayor en el grupo TMS comparado con el

grupo SI (51,4% vs 41,7%). Respecto a la tasa de embarazo, las tasas no fueron significativamente diferentes (61,6% vs 56,3%).

Al analizar los resultados por ciclo con transferencia los resultados son similares: la diferencia en cuanto a tasa de gestación evolutiva es significativamente diferente en ambos grupos a favor del TMS (54,5% vs 45,3%) pero no ocurre así con la tasa de embarazo (65,2% vs 61,1%).

Al analizar en los ciclos con embarazo la tasa de pérdida gestacional temprana, obtuvimos que era significativamente menor en el grupo TMS comparando con el SI (16,6% vs 25,8%).

Por último, la tasa de implantación resultó significativamente mayor en el grupo TMS con respecto al SI (44,9% vs 37,1%).

Resultado	Grupo TMS (estudio)	Grupo SI (control)	Riesgo relativo (RR)	P valor
Todos los ciclos con punción	438	405		
Embarazo (%)	61,6 (56,9-66,0)	56,3 (51,4-61,0)	1,09 (0,98-1,23)	0,12
Embarazo evolutivo (%)	51,4 (46,7- 56,0)	41,7 (37,0-46,6)	1,23 (1,06-1,43)	0,005
Todas las transferencias	415	373		
Embarazo (%)	65,3 (60,6-69,7)	61,1 (56,1-65,9)	1,07 (0,95-1,19)	22
Embarazo evolutivo (%)	54,5 (49,6-59,2)	45,3 (40,3-50,4)	1,20 (1,04-1,39)	0,01
Todos los ciclos con embarazo	271	228		
Pérdida gestacional temprana	16,6 (12,6-21,4)	25,8 (20,6-31,9)	0,64 (0,45-0,91)	0,01
Todos los embriones transferidos	775	699		
Tasa de implantación (%)	44,9 (41,4-48,4)	37,1 (33,6-40,7)	1,43 (1,05-1,39)	0,02

Tabla 6: Resultados clínicos por intención de tratamiento, por ciclo, por transferencia y por embrión transferido

El aumento en los resultados clínicos no resultó ser diferente entre las clínicas incluidas en el estudio, como se pudo observar mediante un test Chi-cuadrado, y tampoco se observaron diferencias significativas entre hacer transferencia en día 3 o en día 5 de desarrollo.

5.3. Discusión

Este ha sido el primer estudio prospectivo randomizado que ha cuantificado la mejora en los resultados clínicos tras incubación y selección embrionaria el sistema time-lapse EmbryoScope® en ser publicado. En vista de los resultados, se puede afirmar que el uso del TMS estudiado así como la aplicación del modelo de selección publicado por nuestro grupo en 2011 (Meseguer 2011) suponen una considerable mejora en las tasas de embarazo evolutivo e implantación, así como una reducción en la tasa de pérdida gestacional temprana.

¿Cuáles pueden ser los motivos que expliquen esta mejoría?. Probablemente sean varios simultáneamente: (1) las estrictas y controladas condiciones de cultivo, (2) la manipulación mínima de los embriones tanto dentro como fuera del incubador, (3) la mayor información sobre el desarrollo embrionario para poder evaluar cualitativamente su morfología, y (4) el uso de parámetros morfocinéticos cuantitativos para seleccionar los mejores embriones.

La mejora relativa de la tasa de embarazo usando el modelo de regresión logística se estimó en un 15,7% por transferencia embrionaria, como se explicó en detalle en el capítulo anterior. Los resultados obtenidos en este trabajo están en línea con esa estimación, que es de un 16,9% por transferencia.

La mayor limitación de este estudio es que no podemos saber con seguridad cuánta de esa mejora es atribuible a las condiciones de cultivo y cuánta al modelo de selección, aunque eso es algo que los autores consideramos desde el primer momento y asumimos en el diseño del estudio. En cuanto a otras limitaciones menores podríamos señalar que la randomización de las pacientes no fue perfecta, ya que cabía esperar una distribución 50:50 y en lugar de ello fue de 51,9:48,1. La principal razón de

esta desviación fue que la demanda de cultivo TMS por parte de las pacientes fue menor. otra limitación es que los criterios de inclusión fueron muy estrictos, con lo cual sólo entraron en el estudio pacientes con buen pronóstico, de manera que el valor potencial del EmbryoScope® sería aplicable sólo a ese grupo de pacientes. Otra limitación del estudio es que el cultivo embrionario se realizó a concentración de O₂ atmosférico, con lo cual la mejor observada podría no darse en condiciones de cultivo diferentes.

Otro aspecto a tener en cuenta y que podría ser un potencial factor de confusión es la disparidad de volúmenes de medio de cultivo al comparar la placa de cultivo convencional con la del EmbryoScope®. También observamos una correlación inversa entre el grado de fragmentación de los embriones y la proporción de embriones óptimos entre TMS y SI. En ambos casos las diferencias fueron muy pequeñas y ese mayor grado de fragmentación finalmente no ha impactado sobre el porcentaje de embriones obtenidos.

Como conclusión final podemos decir que nuestro estudio demuestra prospectivamente una mejora en los resultados clínicos tras el cultivo en el EmbryoScope® y selección de los embriones en base a criterios de selección/deselección basado en la morfocinética.

Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope

Irene Rubio, Ph.D.,^a Arancha Galán, Ph.D.,^a Zaloa Larreategui, Ph.D.,^b Fernando Ayerdi, Ph.D.,^b Jose Bellver, M.D.,^a Javier Herrero, Ph.D.,^a and Marcos Meseguer, Ph.D.^a

^a Instituto Universitario IVI Valencia, University of Valencia, Valencia; and ^b IVI Bilbao, Bilbao, Spain

Objective: To determine whether incubation in the integrated EmbryoScope time-lapse monitoring system (TMS) and selection supported by the use of a multivariable morphokinetic model improve reproductive outcomes in comparison with incubation in a standard incubator (SI) embryo culture and selection based exclusively on morphology.

Design: Prospective, randomized, double-blinded, controlled study.

Setting: University-affiliated private in vitro fertilization (IVF) clinic.

Patient(s): Eight hundred forty-three infertile couples undergoing intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Intervention(s): No patient intervention; embryos cultured in SI with development evaluated only by morphology (control group) and embryos cultured in TMS with embryo selection was based on a multivariable model (study group).

Main Outcome Measure(s): Rates of embryo implantation, pregnancy, ongoing pregnancy (OPR), and early pregnancy loss.

Result(s): Analyzing per treated cycle, the ongoing pregnancy rate was statistically significantly increased 51.4% (95% CI, 46.7–56.0) for the TMS group compared with 41.7% (95% CI, 36.9–46.5) for the SI group. For pregnancy rate, differences were not statistically significant at 61.6% (95% CI, 56.9–66.0) versus 56.3% (95% CI, 51.4–61.0). The results per transfer were similar: statistically significant differences in ongoing pregnancy rate of 54.5% (95% CI, 49.6–59.2) versus 45.3% (95% CI, 40.3–50.4) and not statistically significant for pregnancy rate at 65.2% (95% CI, 60.6–69.8) versus 61.1% (95% CI, 56.2–66.1). Early pregnancy loss was statistically significantly decreased for the TMS group with 16.6% (95% CI, 12.6–21.4) versus 25.8% (95% CI, 20.6–31.9). The implantation rate was statistically significantly increased at 44.9% (95% CI, 41.4–48.4) versus 37.1% (95% CI, 33.6–40.7).

Conclusion(s): The strategy of culturing and selecting embryos in the integrated EmbryoScope time-lapse monitoring system improves reproductive outcomes.

Clinical Trial Registration Number: NCT01549262. (Fertil Steril® 2014;102:1287–94. ©2014 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Early pregnancy loss, embryo culture, embryo selection, implantation, ongoing pregnancy rate, time-lapse

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertilityforum.com/rubio-embryo-culture-selection-morphokinetic-analysis/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching the "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

In recent years, clinical practice efforts have been directed toward improving embryo selection. The

identification of embryos with a higher capacity for implantation means we can reduce the number of embryos for

transfer without reducing the chances of pregnancy in a cycle of assisted reproduction. To this end, different noninvasive embryo selection methods have been designed that provide information on how to distinguish embryos with better prognosis (1). There are different methods of embryo gradation (2), but they are all based on morphology, and evaluation of morphology under microscope is subject to observer subjectivity (1). One of the noninvasive embryo evaluation methods to have come into the limelight in recent years is the time-lapse

Received January 17, 2014; revised and accepted July 9, 2014; published online September 11, 2014. I.R. has nothing to disclose. A.G. has nothing to disclose. Z.L. has nothing to disclose. F.A. has nothing to disclose. J.B. has nothing to disclose. J.H. has nothing to disclose. M.M. has received payment for lectures from Ferring and Merck Serono.

The instrumentation, disposables, and utensils used in this study were fully paid for by IVI. IVI is a minor shareholder in UnisenseFertiliTech A/S, but none of the authors have any economic affiliation with UnisenseFertiliTech A/S.

Reprint requests: Marcos Meseguer, Ph.D., Instituto Valenciano de Infertilidad, Plaza de la Policía Local, 3, Valencia 46015, Spain (E-mail: marcos.meseguer@ivi.es).

Fertility and Sterility® Vol. 102, No. 5, November 2014 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2014 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of the American Society for Reproductive Medicine. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.738>

monitoring systems (TMS). Image capturing with time-lapse devices is a noninvasive method that offers the possibility of 24-hour monitoring of embryo development and of increasing the quantity and quality of information without disturbing the culture conditions (3–5). The system generates unique determinations that combine the morphologic assessment with the timing of embryonic cleavages, thus diminishing observer subjectivity (6). With an integrated TMS (EmbryoScope; UnisenseFertiliTech A/S, Aarhus, Denmark), the image acquisition unit is an integral part of the culture chamber, which facilitates the monitoring of embryos while they remain inside a controlled, stable culture environment. The safety of this system has been demonstrated (7). In 2011, Meseguer et al. (8) published a report on the development of a multivariable model in which, through a decision tree, the embryos were classified according to their implantation rate. This proposed a predictive algorithm based on a combination of morphokinetic exclusion and selection criteria that can be applied in real time to exclude morphologically normal embryos that display aberrant cleavage patterns.

Our previous retrospective cohort study published in 2012 showed a relative improvement in clinical pregnancy rate of more than 10% per embryo transferred by using the same algorithm and incubation conditions (9). Our present work is a prospective, randomized study to validate this multivariable model. We randomly selected a control group of patients whose embryos were cultured in standard incubators (SI) and were assessed only by conventional morphological criteria is compared with a study group in which the embryos were cultured in a tri-gas incubator with a built-in camera for the automatic acquisition of images at specific times and evaluation by the multivariable model. In this way, we could compare the results for both groups and verify an expected improvement in pregnancy rates of at least 10% in the study group compared with the controls. To our knowledge, ours is the first randomized clinical study available on this topic.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Participants

An experimental, prospective, triple-blind, double-center, randomized controlled trial was performed at two IVI clinics, one in Valencia and one in Bilbao. The study complies with the Spanish law governing assisted reproductive technologies (14/2006), and the institutional review board approved the study as did the institution's ethics committee (1009-C-088-IR). The study was registered with the Clinical Trial Web site (www.clinicaltrials.gov; registration number: NCT01549262).

In the study, 930 patients undergoing assisted reproduction were selected based on the inclusion-exclusion criteria we will describe, resulting in an embryo cohort from a group of patients that had autologous or oocyte donation (OD) cycles between February 2012 and July 2013. The oocyte recipients entered our OD program for one of the following diagnoses: failure to achieve pregnancy after at least three cycles of assisted reproduction techniques, genetic female or chromosomal disorders, or low response to controlled ovarian hyperstimulation.

The patients were randomly divided into a control group of patients whose embryos were developed in a conventional incubator, which were assessed only by conventional morphologic criteria, and a study group, in which embryos were cultured in the EmbryoScope TMS and were evaluated using the multivariate morphokinetic model.

The inclusion criteria for both autologous patients and recipients were as follows: age 20–38 years, first or second intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycle, body mass index (BMI) of >18 and <25 kg/m². The exclusion criteria were severe male factor (total motile sperm <1 million), hydrosalpinx, presenting uterine diseases after two-dimensional ultrasound evaluation, and/or three-dimension (if in doubt) or hysteroscopy (for acquired or congenital uterine abnormalities), endocrinopathies (thrombophilia), recurrent pregnancy losses, endometriosis, or patients receiving concomitant medication as a treatment for any other condition that might interfere with the results of the study. For autologous treatments, low-responder patients (fewer than six metaphase II (MII) per cycle) or those with a follicle-stimulating hormone (FSH) basal determination >12 or an antimüllerian hormone (AMH) concentration of <1.7 pmol/L (based in our own clinical experience) were also excluded. Each patient was enrolled in the study only once.

The time-lapse technology used is CE-certified (i.e., meets the health and safety requirements for equipment in the European Union), and in our study it was used for the purposes for which it was approved. The CE certificate (number: DGM-673) endorses the quality of the system from UnisenseFertiliTech A/S in terms of its manufacture and final inspection of the IVF incubators and accessories related to class II (including IVF incubators and the plates used for such incubators). The production, installation, and servicing of IVF incubators and accessories from UnisenseFertiliTech A/S are likewise certified (certificate number: DGM-672).

Randomization

Patients entering the trial were allocated to either TMS (study group) or SI (control group) using a computer-generated randomization table (obtained by SPSS software; IBM), which was handled by an embryologist at the laboratory in charge (A.G.) the day before the oocyte retrieval or oocyte donation. The study is considered double-blind because: [1] the gynecologist (evaluating the primary effect) did not know to which group the patients had been assigned, and [2] the statistician evaluating the results only knew the incubators by a binary code and not by type.

Ovarian Stimulation in Autologous Patients and Oocyte Donors

All donors were obtained from the IVI oocyte donation program. The detailed selection criteria for donors were as described by Garrido et al. (10). Briefly, all donors had normal menstrual cycles lasting 26 to 34 days, were aged 18–34 years (average 25.5 years), had a body mass index (BMI) of 18–25 kg/m², had received no endocrine treatment (including gonadotropins and oral contraception) for the 3 months

preceding the study, and had a normal uterus and ovaries at transvaginal ultrasound (no signs of polycystic ovary syndrome) (11).

The protocol for controlled ovarian stimulation was as described by Melo et al. (12), and both GnRH agonist and antagonist treatments were included. Human chorionic gonadotropin (hCG, Ovitrelle; Serono Laboratories) was administered subcutaneously when at least three leading follicles had reached a mean diameter of 18 mm. Transvaginal oocyte retrieval was scheduled 36 hours later. Donor oocytes were used in fresh cycle, but in some cases we used oocytes from our oocyte bank. The oocyte vitrification protocol has been previously described elsewhere and yielded comparable results to what has previously been demonstrated by our group (13). The protocol for endometrial preparation of recipients was as described by Meseguer et al. (14). After embryo transfer, all patients received luteal phase support every 12 hours, whereby autologous patients received a daily dose of 400 mg and oocyte recipients a daily dose of 800 mg of vaginal micronized progesterone (Progeffik; Effik).

Ovum Pick-up and ICSI

Follicles were aspirated, and the oocytes were washed in Gamete Medium (Cook IVF). After washing, oocytes were cultured in fertilization medium (Cleavage Medium; Cook IVF) at 5.5% CO₂ in air and 37°C for 4 hours before oocyte denudation. Oocyte denudation was performed by mechanical pipetting 40 IU/mL of hyaluronidase in the same medium. Subsequently, ICSI was performed in a medium containing HEPES (Gamete Medium; Cook IVF) at 400× magnification using an Olympus IX7 microscope. Immediately after ICSI, the injected oocytes for TMS cycles were placed individually in preequilibrated culture dishes (EmbryoSlide; UnisenseFertilittech A/S) under oil at 37°C and 5.5% CO₂ in air in a time-lapse incubator (EmbryoScope). Zygotes for the conventional incubator (Heraeus; HeraCell) cycles were placed in normal Petri dishes (Falcon) (drop culture) of culture media (Cleavage Medium; Cook IVF) under oil at 37°C and 5.5% CO₂ in air.

Embryo Culture

All embryos in both the SI and TMS were incubated at 37°C, 5.5% CO₂, atmospheric O₂ concentration and were cultured individually until embryo transfer at day 3 (72 hours after ICSI) in Cleavage Medium (Cook IVF); from day 3 to day 5, we used CCM Medium (Vitrolife). For SI, we prepared the culture dishes with three washing drops of 100 µL and six culture drops of 50 µL, covered by 7 mL of mineral oil. For the TMS, we placed 25 µL of culture media in each well of the EmbryoSlide, covered with 1.2 mL of mineral oil. From D3 to D5, a new EmbryoSlide were used. In the TMS, the imaging system uses low-intensity red light (635 nm) from a single light-emitting diode with short illumination bursts of 30 ms per image to minimize embryo exposure to light and to avoid emitting damaging short-wavelength light. Image stacks were acquired at five to seven equidistant focal planes every 15 or 20 minutes during embryo development inside the EmbryoScope.

Embryo Scoring and Selection

On the day of oocyte capture, all patients included in this study were assigned the day of embryo transfer (day 3 vs. day 5) based on previous medical criteria. Categorization by the embryologist was not considered for deciding the day of transfer. For embryos incubated in the SI, embryo morphology was evaluated at 48 and 72 hours after ICSI. Evaluated parameters included cell number, symmetry, and granularity as well as the type and percentage of fragmentation (fragment defined as an anuclear, membrane-bound extracellular cytoplasmic structure and calculating the percentage of the total volume of the embryo constituted by fragments), presence of multinucleated blastomeres, and degree of compaction as previously described elsewhere (11). According to the scoring methods, we selected the embryos from the SI for transfer on day 3. On day 2, optimal embryos were defined as those with four cells, less than 15% fragmentation, high or moderate symmetry, and no multinucleation. On day 3, they were defined as those with six or more cells and the previously mentioned fragmentation and symmetry features (15). Embryos considered to be viable on day 3 were those that were transferred or vitrified (16).

Embryo scoring and selection with TMS was performed by analysis of time-lapse images of each embryo on an external computer with software developed for time-lapse image analysis (EmbryoViewer workstation; UnisenseFertilittech A/S). Embryo morphology and developmental events were annotated, including the precise timing of the observed cell divisions in the hours after ICSI. The precise timing of cell division and developmental parameters, such as blastomere symmetry and multinucleation, were determined, deriving the following morphokinetic parameters: time of cleavage to two-blastomere embryo (t2), time of cleavage to three-blastomere embryo (t3), time of cleavage to four-blastomere embryo (t4), and time of cleavage to five-blastomere embryo (t5). Additionally, the duration of the second cell cycle (cc2)—that is, the duration of the two-blastomere embryo phase (t3 – t2)—and synchrony (s2) in divisions from a two-blastomere embryo to a four-blastomere embryo (t4 – t3) were calculated. We used the hierarchical classification of embryos described by Meseguer et al. (8); the model is represented graphically in Supplemental Figure 1 (available online).

Human blastocysts were scored on day 5 (120 hours) according to the expansion of blastocoel cavity and the number and integrity of both the inner cell mass and trophectoderm cells. We defined for comparison the following groups: group A, complete trophectoderm and high-cell number compact inner cell mass; group B, incomplete trophectoderm and several grouped cells; and group C, few cells in trophectoderm or inner cell mass (17). According to this grading system, we selected the embryos for transfer on day 5. Optimal blastocysts were those with trophectoderm cells and inner cell mass in A or B groups (14). In TMS group, embryos were selected on day 3 and 5 by using hierarchical classification on those embryos, which were defined as morphologically optimal. In other words, we used the initial morphology to discard those embryos with suboptimal morphology and then morphokinetics were applied. Embryo

morphokinetic categories were not used to decide the number of embryos for transfer or the day of transfer. To make a comparison between morphology and the time-lapse classification tree categories, as we previously published and compared, we defined and analyzed the morphology of the transferred embryos using the same and prior published morphology categories (8), a description of which is provided herein.

Category 1: The two pronuclear (2PN) embryo consists of two cells at 27 hours after insemination, four cells at day 2, and eight cells at day 3. The blastomere size is even at the two-, four-, and eight-cell stages, no multinucleation is observed at any time, and the fragmentation is less than 10%.

Category 2: The 2PN embryo consists of one to two cells at 27 hours, three to four cells at day 2, and six to eight cells at day 3. Only one mismatch is allowed: either one cell at 27 hours, three cells at day 2, or six to seven cells at day 3. Blastomeres are even sized at the two-, four-, and eight-cell stages, no multinucleation is observed at any time, and the fragmentation is less than 20%.

Category 3: The 2PN embryo consists of one to two cells at 27 hours, two to four cells at day 2, and six to eight cells or morula at day 3. The embryo can have asymmetric blastomeres, and multinucleation can be observed in maximally one blastomere at each stage. The degree of fragmentation is less than 20%.

Category 4: The 1PN or 2PN embryo consists of one to two cells at 27 hours, two to six cells at day 2, and four or more than eight cells or morula at day 3. The embryo can have asymmetric blastomeres and be multinucleated. The degree of fragmentation is less than 50%.

Category 5: The embryo consists of any number of cells at 27 hours, day 2, and day 3. Asymmetric blastomere size, multinucleation, and any degree of fragmentation is allowed. Atretic embryos and embryos with arrested development belong to this category.

Outcome Measures

The primary end point for this study was ongoing pregnancy confirmed by the presence of gestational sacs with fetal heartbeat detected by transvaginal ultrasound examination in week 12. The binary response variable of ongoing pregnancy was either "1" for the presence of gestational sacs with fetal heartbeat or "0" for the absence of gestational sacs with fetal heartbeat. The purpose of the analysis was to assess whether the primary end point was affected by the incubation method, TMS versus SI.

For secondary outcomes, we analyzed fertilization rates, embryo development (defined previously), implantation rates and pregnancy (defined as having a serum β -hCG level higher than 10 IU/mL on day 14 after ICSI), and early pregnancy loss. Pregnancy was defined as the detection of a positive β -hCG 2 weeks after embryo transfer. Implantation rate was

calculated by dividing the number of gestational sacs with fetal heartbeat detected by the number of embryos transferred. Early pregnancy loss was considered when the (β -hCG-positive) pregnant cycles did not result in an ongoing pregnancy.

Sample Size Calculation and Statistical Analysis

We started on the premise that the clinical pregnancy rate in our IVF program is about 50%, and our hypothesis was that the combination of embryo morphology and the morphokinetic algorithm along with better growing conditions (demonstrated by 7 and 9) would increase the chances of pregnancy by at least 10%. We used macro N2IPV! 2006.02.24 (Domenech, Granero, and Sesma) for the sample size and power determination of two independent proportions. The sample size required per group was 388 patients per arm, with an alpha risk of 5% and beta risk of 20%, which means a power of 80%. The calculation method followed a normal asymptotic approximation and a one-sided hypothesis. That is, we needed a total number of 776 patients (388 in the control group and 388 for the study group) to complete the study with the proposed hypothesis. We increased the number of patients recruited approximately 15% with the intention of overcoming the potential loss of patients.

Comparison of quantitative variables (Tables 1 and 2) between the TMS and control groups was done using Student's *t* test for independent samples when data were normally distributed (tested by Kolmogorov-Smirnov test). For comparing categorical data, Fisher's test was performed to compare proportions among the groups according to the TMS incubation and selection procedure performed. Yates's correction equation was used instead when the expected frequency was less than 5. $P < .05$ was considered statistically significant.

We calculated the positive pregnancy test rate and ongoing pregnancy rates in each group and the corresponding relative risk (RR) with 95% confidence intervals for all intended cycles (all initiated cycles enrolled in the study), all treated cycles, and all cycles with transfer (of one or more embryos). Furthermore, the early pregnancy loss was calculated on the cycles that led to a positive pregnancy test as the ones that did not result in a ongoing pregnancy. Implantation rate was calculated as the number of implanted embryos out of the transferred embryos. Differences between the two groups were tested using Fisher's exact test. $P < .05$ was considered statistically significant. Power determination of the main variable outcome (ongoing pregnancy rate) was performed to demonstrate the validity of the results by using the previously described SPSS macro.

To confirm and quantify the crude two group analysis, the implantation of all transferred embryos were fitted to a logistic regression with the following covariates: type of incubation (TMS or SI), class variable, two states; type of cycle (autologous or donation), class variable, two states; day of transfer (day 3 or 5), class variable, two states; and the age of the patient at the time of transfer, continuous variable, measured in years.

TABLE 1

Descriptive characteristics of the patient and IVF laboratory practice in the time-lapse and control groups.

	TMS group (n = 438)	Control group (n = 405)	P value
Age (y), patients and recipients	34.7 ± 2.7 (34.4–34.9)	34.6 ± 2.7 (34.4–34.9)	NS
Age (y), patients and donors	30.4 ± 5.5 (29.9–31.0)	30.0 ± 5.5 (29.5–30.5)	NS
BMI (kg/m ²)	23.2 ± 3.7 (22.6–23.7)	23.04 ± 2.8 (22.5–23.5)	NS
COS protocol			
Long GnRH agonist (%)	14.8 (65)	16.4 (66)	NS
Short GnRH antagonist (%)	85.2 (373)	83.6 (339)	NS
Total dose of FSH	1,781 ± 631 (1,709–1,853)	1,832 ± 603 (1,763–1,900)	NS
Total dose of hMG	1,127 ± 664 (1,035–1,219)	990 ± 538 (913–1,066)	NS
E ₂ on hCG day (pg/mL)	1,981 ± 943 (1,882–2,079)	1,964 ± 962 (1,860–2,067)	NS
P ₄ on hCG day (ng/mL)	0.76 ± 0.38 (0.72–0.80)	0.74 ± 0.35 (0.70–0.78)	NS
Days of stimulation	13.0 ± 3.45 (12.5–13.6)	13.2 ± 3.42 (12.6–13.8)	NS
Donor recipients (%)	47.8 (208) (43.2–52.6)	49.1 (200) (44.2–53.9)	NS
Metaphase II oocytes (n)	8.0 ± 2.7 (7.76–8.26)	8.1 ± 3.0 (7.8–8.3)	NS
Fertilization rate (%)	75.3 ± 16.5 (73.8–76.9)	74.0 ± 17.4 (72.3–75.7)	NS
Day 3 ET (% of total)	72.5 % (318) (68.3–76.7)	75.5 % (306) (71.3–79.7)	NS
Blastocyst ET (%)	27.5 (120) (23.3–31.7)	24.5 (99) (20.3–28.7)	NS

Note: Values are mean, and values in brackets are 95% confidence intervals or the total number of patients. BMI = body mass index; COS = controlled ovarian stimulation; E₂ = estradiol; ET = embryo transfer; FSH = follicle-stimulating hormone; GnRH = gonadotropin-releasing hormone; hCG = human chorionic gonadotropin; hMG = human menopausal gonadotropin; NS = not statistically significant; P₄ = progesterone; TMS = time-lapse monitoring system.

Rubio. Clinical validation of EmbryoScope. Fertil Steril 2014.

RESULTS

During the study period, we identified 930 eligible couples between February 2012 and July 2013. Of the 930 couples, 74 patients dropped out before randomization. After randomization, 13 patients dropped out before completing the cycle. Therefore, 843 patients were finally included: 438 in the study group (TMS) and 405 in the control group. The participant flow through the trial is displayed in Supplemental Figure 2 (available online).

Descriptive Characteristics of the Patients, Donors, and Recipients and Preincubation Characteristics in the TMS and Control Group

Test results of the effectiveness of randomization based on patient, donor, and recipient characteristics are shown in Table 1. There were no differences between the two groups studied for any of the patient, donor, or recipient parameters; both presented a similar age, body mass index, and ovarian stimulation parameters, such as gonadotropin dosage, number of oocytes donated, duration of stimulation, and final E₂ serum concentrations. The mean fertilization

rate was similar in both groups at approximately 74.5% per patient oocyte cohort; there was only one fertilization failure in the SI group. The number of oocytes obtained and number of MII oocytes did not differ between the two groups. Oocyte donors who used vitrified warmed oocytes were 120 (27.4%) and 112 (27.6%) in TMS and SI groups, respectively. The number of patients going through their first attempt in the clinic was 305 (69.6%) and 328 (81.0%) in TMS and SI groups, respectively ($P < .05$). Regarding the differences in the distribution of the patients between the two clinics, only a slightly increased proportion of day 5 transfers in IVI Bilbao were observed (31.6%) versus IVI Valencia (22.0%) ($P < .05$); the remaining clinical features compared were not statistically significantly different (data not shown).

Embryo Development Characteristics in the TMS and Control Group

Detailed results for the developmental characteristics are shown in Table 2. The embryo fragmentation percentage was higher in the TMS group compared with SI (7.5% vs.

TABLE 2

Descriptive characteristics of the embryo development and fate in the time-lapse and control groups.

	TMS group (n = 2,638)	Control group (n = 2,427)	P value
Embryo fragmentation (%)	7.5 ± 0.1 (7.2–7.9)	6.9 ± 9.4 (6.5–7.1)	.006
No. of blastomeres	6.9 ± 2.3 (6.8–6.9)	6.9 ± 2.7 (6.8–7.0)	NS
Embryo symmetry	1.7 ± 0.5 (1.7–1.7)	1.7 ± 0.5 (1.7–1.7)	NS
Optimal embryos (day 3) (%)	46.2 (1,219) (44.3–48.1)	43.1 (1,046) (41.3–45.1)	.010
Blastocyst rate (%)	52.3 (576) (50.3–54.2)	50.5 (471) (48.5–52.5)	NS
Optimal blastocyst (day 5) (%)	20.9 (230) (19.4–22.4)	16.6 (155) (15.1–18.1)	.001
Transferred embryos	1.86 ± 0.37 (1.8–1.9)	1.86 ± 0.40 (1.8–1.9)	NS
Cryopreserved embryos	3.9 ± 2.2 (3.6–4.1)	3.6 ± 2.2 (3.4–3.9)	NS

Note: Values are mean, and values in brackets are 95% confidence interval or the total number of embryos.

Rubio. Clinical validation of EmbryoScope. Fertil Steril 2014.

6.9%). There was a statistically significantly higher percentage of optimal embryos on day 3 in the TMS group (46.2% compared with 43.1% in the control group; $P=.01$). Likewise, there was a statistically higher percentage of optimal embryos on day 5 out of all embryos cultured to day 5 in the TMS group (20.9%) compared with the control group (16.6%) ($P=.001$).

Comparison between Morphology and Time-lapse Categories

The observed correlations between morphokinetic categories and embryo implantation in the transferred embryos cultured and selected in the TMS are presented in [Supplemental Table 1](#) (available online). The transferred embryos split into the previously described morphology categories and cultured in SI are described in [Supplemental Table 2](#) (available online).

Outcome Results

Taking into account all cycles, including those that did not result in an embryo transfer, the ongoing pregnancy rate (OPR) was significantly increased at 51.4% (95% CI, 46.7–56.0) ($P=.005$) for the TMS group compared with 41.7% (95% CI, 36.9–46.5) for the SI group ([Table 3](#)). For pregnancy rate (PR), differences were not statistically significant at 61.6% (95% CI, 56.9–66.0) versus 56.3% (95% CI, 51.4–61.0). Results per transfer were similar: statistically significant differences in OPR 54.5% (95% CI, 49.6–59.2) versus 45.3% (95% CI, 40.3–50.4) ($P=.01$) and not statistically significant for pregnancy rate at 65.2% (95% CI, 60.6–69.8) versus 61.1% (CI 95%, 56.2–66.1). Results per transfer for day 3 versus day 5 transfers are presented in [Supplemental Table 3](#) (available online). The early pregnancy loss rate was statistically significantly decreased ($P=.01$) for the TMS group with 16.6% (95% CI, 12.6–21.4) versus 25.8% (95% CI, 20.6–31.9). The implantation rate of the transferred embryos was statistically significantly increased at 44.9% (95% CI, 41.4–48.4) versus 37.1% (95% CI, 33.6–40.7) ($P=.02$). The increase in the clinical outcome was not statistically significantly different between clinics as analyzed by a

chi-square analysis ($P>.05$). We did not have any reports of ectopic pregnancy.

Logistic Regression Analysis

A logistic regression analysis was performed on OPR to account for the effect of the remaining confounding factors addressed in the [Materials and Methods](#) section.

The factors used in the logistic regression model were incubation type, day of transfer, oocyte source, and the egg age of the patient at the time of oocyte retrieval. The final modeling results are given in [Table 4](#). The analysis was based on 843 patients who either presented an ongoing pregnancy or failed. Of the four covariates, only incubation type and day of transfer had a statistically significant effect in the model. Taking into account these other covariates led to an odds ratio (OR) of the TMS group versus the control group of 1.36 (95% CI, 1.10–1.68).

DISCUSSION

Our present study represents the first controlled, randomized prospective study to quantify the improvement in reproductive outcome after incubation and selection using the EmbryoScope time-lapse system. The observed increase in implantation and ongoing pregnancy rates using the advantages of undisturbed embryo culture in a stable device such as the EmbryoScope time-lapse incubator in association with the use of the model of embryo selection developed by our group represents an important improvement in reproductive medicine. Incubation and selection in the studied TMS improves the ongoing pregnancy and implantation rate and reduces the early pregnancy loss.

The observed increase in clinical parameters may have multiple explanations, as previously described by Meseguer et al., such as: [1] strictly controlled and stable incubation conditions, [2] minimal handling of embryos inside and outside the incubator, [3] increased information on embryo development for qualitative evaluation of morphology, and [4] the use of quantitative morphokinetic parameters for selecting viable embryos.

TABLE 3

Outcome results per intention to treat, per cycle, per transfers and per embryo transferred.

Outcome	TMS group	Control group	RR	P value
All cycles with oocyte retrieval	438	405		
Pregnancy (% of all treated cycles)	61.6 (56.9–66.0)	56.3 (51.4–61.0)	1.09 (0.98–1.23)	.12
Ongoing pregnancy (% of all treated cycles)	51.4 (46.7–56.0)	41.7 (37.0–46.6)	1.23 (1.06–1.43)	.005
All transfers	415	373		
Pregnancy (% of all transfers)	65.3 (60.6–69.7)	61.1 (56.1–65.9)	1.07 (0.95–1.19)	.22
Ongoing pregnancy (% of all transfers)	54.5 (49.6–59.2)	45.3 (40.3–50.4)	1.20 (1.04–1.39)	.01
All pregnant cycles	271	228		
Early pregnancy loss (% of all pregnancies)	16.6 (12.6–21.4)	25.8 (20.6–31.9)	0.64 (0.45–0.91)	.01
All transferred embryos	775	699		
Implantation rate (% of all transferred embryos)	44.9 (41.4–48.4)	37.1 (33.6–40.7)	1.43 (1.05–1.39)	.02

Note: Results shown as proportion with 95% confidence limits in brackets, relative risk (RR) with 95% confidence limits in brackets and the corresponding P value (Fisher's exact test). Total number of cycles are also presented in brackets.

Rubio. Clinical validation of EmbryoScope. Fertil Steril 2014.

TABLE 4

Logistic regression analysis of ongoing pregnancy after week 12 as affected by incubation type, day of transfer, oocyte source, and age of the patient.

Model effect	Values	OR (95% CI)	P value
Incubation	TMS versus SI	1.41 (1.06–1.86)	.015
Day of transfer	Day 5 versus day 3	1.53 (1.08–2.16)	.016
Oocyte source	Autologous versus donation	0.89 (0.60–1.30)	NS
Age	Years	Per year, 1.01 (0.98–1.05)	NS

Note: CI = confidence interval; OR = odds ratio; NS = not statistically significant; SI = standard incubator; TMS = time-lapse monitoring system.

Rubio. Clinical validation of EmbryoScope. Fertil Steril 2014.

Strictly controlled and stable incubation conditions are important for embryo development because variations in temperature and pH may impair embryo development and quality (18). The safety of the TMS used in this study has been validated (7, 19). The TMS that was used purifies the gas in the chamber by constant recirculation through an active carbon filter, a HEPA filter, and a UV filter cartridge to effectively remove volatile organic compounds, contaminants, and particles from the airstream, which ensures a stable and reliable gas supply. The TMS shows minimal variation of temperature and gas concentrations when doors are opened as well as a fast recovery to optimal conditions compared with the larger and slower SI (9).

Time-lapse image acquisition can minimize disturbance to the culture environment and the embryo development by integrating the incubation and image acquisition into one system. In contrast, with SI embryo development has to be monitored by removing the embryos from the incubator (7, 20).

Several studies have demonstrated the predictive value of morphokinetics (8, 21–24). Our embryo quality assessment model, published in 2011, correlates embryo morphology evaluation and clinical results (8). The use of morphokinetic variables for embryo selection allowed us to reject embryos with a lower chance of implantation while distinguishing embryos with higher probabilities of implanting based on morphokinetic characteristics. The relative improvement of clinical pregnancy using the regression model was estimated to be 15.7% per embryo transfer, as published in the retrospective study of 8,414 cycles performed in 2012 (9). The results obtained in our present prospective study are in line with this estimation, which is 16.9% per embryo transfer.

The main limitation in this trial is that we did not know how much of this improvement was due to the culture conditions because the system does not allow us to differentiate. We performed the study conscientiously and assumed that the improvement was related to both culture conditions and the selection model, but the contribution of each was not enough to perform a randomized study to clarify that point.

Several publications have demonstrated the potential use of morphokinetics to improve selection by using early (22) and late development parameters (23, 24), and some of them were validated prospectively (25), which confirms the

potential improvement that can be provided by morphokinetics selection. In favor of the potential improvement that is provided by the use of morphokinetics are the results provided in Supplemental Tables 1 and 2. We observed that both morphokinetic and morphology categories are significantly related to implantation potential. In relation to the morphokinetic algorithm, the selection process clearly increased the proportion of transferred embryos corresponding to the A and more likely to the A+ category. The model significantly distinguished between embryos with different implantation potential, although the + category provided by cc2 overcomes the categorization of the s2 variable. A consequence could be the trading of place in the hierarchy between the variables s2 and cc2, leaving cc2 as the secondary and s2 as the tertiary variable after this analysis. In any case, we have been able to identify prospectively the real benefit that is provided by the use of our morphokinetic algorithm for embryo selection.

The trial had several secondary limitations. [1] The randomization were not perfectly performed as the patient distribution to the two groups would have been expected to be closer to a 50:50 ratio than the reported 51.9:48.1. The main reason for this deviation was limited patient requests for TMS culture. [2] The inclusion criteria were quite strict in favor of good-prognosis patients; in consequence, the potential value of the EmbryoScope system for improving clinical outcome might only be relevant to good-prognosis patients. [3] This randomized, controlled trial was performed using high O₂ tension, and is possible that the observed improvements may not be detected under different conditions if we also consider that culturing in low O₂ does appear to be beneficial, at least in extended-culture embryos (26).

As minor aspect that could be a potential confounder in our study is the disparity in the volumes of media used in the SI and TLM. We have also observed an inverse correlation between the percentage of embryo fragmentation and the proportion of optimal embryos between SI and TLM; in both variables, the differences were very small, and the increased percentage of embryo fragmentation did not finally affect the proportion of optimal embryos; the increased proportion in TMS may be due a higher proportion of embryos with an optimal number of blastomeres.

In a recently published study, Kirkegaard et al. (27) did not find any significant differences in the morphokinetics of embryos that implanted and those that failed to implant in their study population, and thus they suggested that morphokinetic selection criteria may not be universally applicable whereas deselection by morphokinetics seems more generally predictable. Although the study by Kirkegaard's group was prospective, it was based on a limited sample size, which was recognized by the investigators. Hence, a comparison of their study (n = 84) to our current one (n = 513) is not meaningful. The morphokinetic selection criteria published to date have been based on a specific embryo cohort (e.g., patients from one clinic/chain of clinics) and therefore may not be valid for all embryo cohorts, as several factors have been shown to impact morphokinetics (28–31).

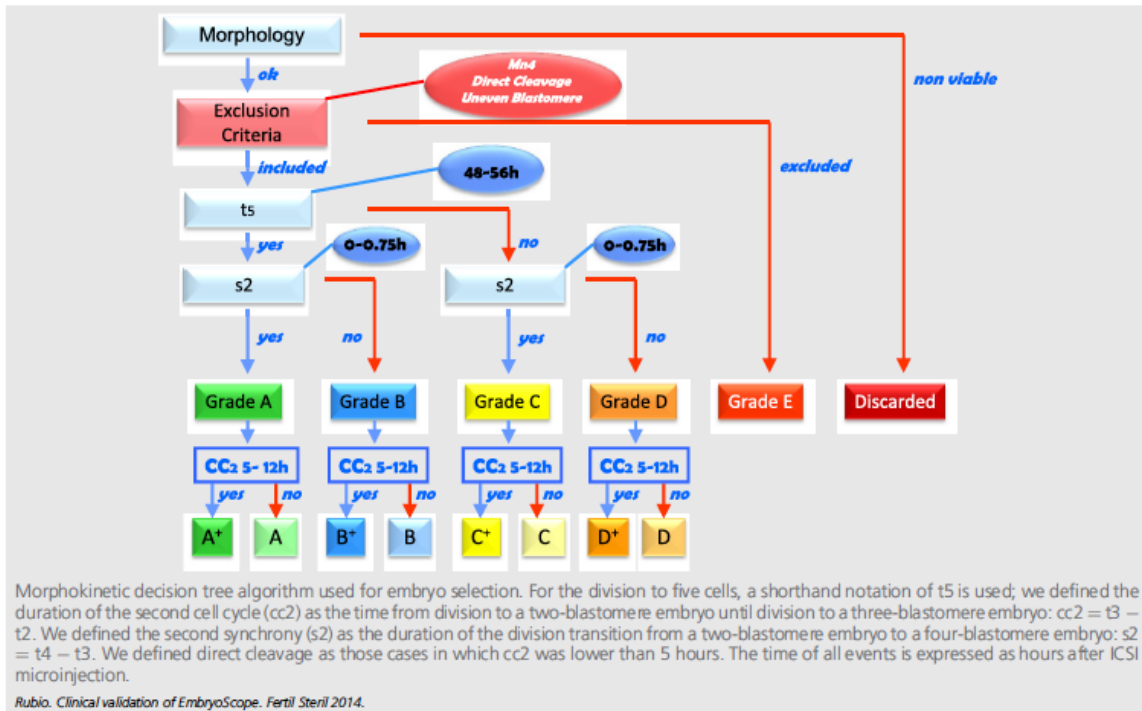
Our study prospectively demonstrated an improvement in reproductive outcomes by using the EmbryoScope TMS and a set of selection and deselection criteria based on embryo morphokinetics. The study is limited by the unknown effect of the more stable culture environment provided by the EmbryoScope incubator. However, better embryo development is an integral part of the concept of culture in this specific time-lapse device and hence a prerequisite for applying a morphokinetic algorithm to choose from morphologically optimal embryos that resulted in the improved outcomes.

Acknowledgments: The authors thank María Cruz, Natalia Basile, and María José de los Santos and the entire IVF team for their enthusiasm and support.

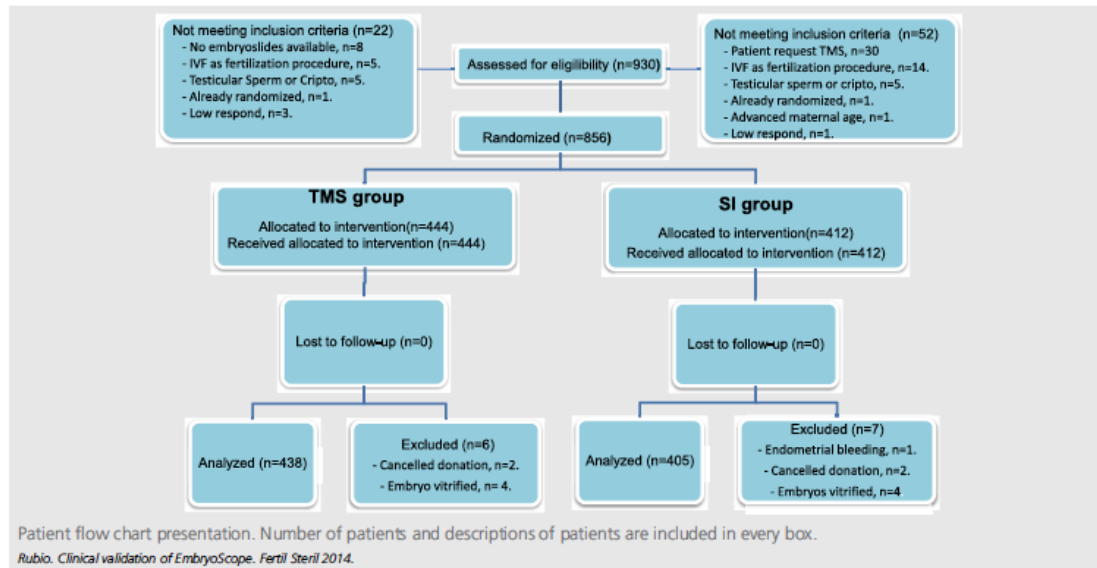
REFERENCES

1. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:237–49.
2. ALPHA Scientists In Reproductive MedicineESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* 2011;22:632–46.
3. Aparicio B, Cruz M, Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod Biomed Online* 2013;27:654–63.
4. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012;27:1277–85.
5. Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertil Steril* 2013;99:1030–4.
6. Sundvall L, Ingerslev HJ, Knudsen UB, Kirkegaard K. Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Hum. Reprod* 2013;28:3215–21.
7. Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martínez M, Pérez-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;28:569–73.
8. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658–71.
9. 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 with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;98:1481–9.
10. Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, Simón C, Remohí 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;17:3142–8.
11. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, García-Herrero S, Remohí J, Fernández JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2010;95:124–8.
12. Melo M, Busso CE, Bellver J, Alama P, Garrido N, Meseguer M, et al. GnRH agonist versus recombinant hCG in an oocyte donation programme: a randomized, prospective, controlled, assessor-blind study. *Reprod Biomed Online* 2009;19:486–92.
13. Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657–64.
14. Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;89:1191–9.
15. Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simon C, Remohi J, et al. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:2413–9.
16. 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;93:447–54.
17. Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86:1376–85.
18. deMouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, Castilla JA, Ferraretti AP, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2010;25:1851–62.
19. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grøndahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:565–72.
20. 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;27:93–6.
21. Příbelský C, Matyas S, Kovacs P, Losomczí E, Zadori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod Biomed Online* 2010;21:533–6.
22. Wong C, Loewke K, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115–21.
23. Dal Canto M, Coticcio G, 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;25:474–80.
24. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Fontes CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013;26:477–85.
25. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, Ivani K, Chenette PE, Boostanfar R, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril* 2013;100:412–9.
26. Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. *Cochrane Database Syst Rev* 2012: CD008950.
27. Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictor of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod* 2013;28:2643–51.
28. Wolff HS, Fredrickson JR, Walker DL, Morbeck DE. Advances in quality control: mouse embryo morphokinetics are sensitive markers of in vitro stress. *Hum Reprod* 2013;28:1776–82.
29. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* 2013;99:738–44.
30. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:891–900.
31. Fréour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S, Barrière P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril* 2013;99:1944–50.

SUPPLEMENTAL FIGURE 1



SUPPLEMENTAL FIGURE 2



SUPPLEMENTAL TABLE 1

Implantation in the embryo categories of the hierarchical classification tree model applied in the time-lapse monitoring system, results are only referred to those embryos with known implantation (known implantation data embryos).

Embryo category	N total (n = 513)	N implanted (no.)	Implantation (%)	Embryo category	Implantation (%)
A+	122	74	60.6	A	52.9
A-	80	33	41.2		
B+	46	24	52.2	B	43.9
B-	36	12	33.3		
C+	67	30	44.8	C	39.5
C-	52	17	32.7		
D+	28	13	46.5	D	29.3
D-	30	4	13.3		
E	51	7	13.7	E	13.7

Rubio. Clinical validation of EmbryoScope. Fertil Steril 2014.

SUPPLEMENTAL TABLE 3

Outcome results depending on embryo transfer day done day 3 versus blastocyst stage (day 5).

	TMS group	Control group	P value
Day-3 transfers	301	284	
Transferred embryos per treatment	1.90 (1.86–1.94)	1.89 (1.84–1.93)	.694
Pregnancy	61.8 (56.3–67.3)	58.8 (53.1–64.5)	.460
Ongoing pregnancy	49.8 (44.1–55.4)	44.0 (38.2–49.8)	.159
Implantation rate (% of all transferred embryos)	40.7 (36.1–45.2)	34.3 (29.9–38.8)	.050
Early pregnancy loss (% of all pregnancies)	19.9 (36/187) (14.1–25.6)	25.1 (42/168) (18.5–31.6)	.151
Blastocyst transfer	114	90	
Transferred embryos per treatment	1.78 (1.69–1.86)	1.80 (1.72–1.88)	.701
Pregnancy (% of all transfers)	74.3 (66.2–82.3)	68.5 (58.9–78.1)	.363
Ongoing pregnancy (% of all transfers)	66.4 (57.7–75.1)	49.4 (39.1–59.7)	.015
Early pregnancy loss (% of all pregnancies)	10.7 (9/85) (4.1–17.2)	27.8 (17/62) (16.6–38.9)	.003
Implantation rate (% of all transferred embryos)	57.5 (49.5–65.3)	46.9 (37.8–60.0)	.082

Note: Results shown as proportion with 95% confidence limits in brackets, relative risk (RR) with 95% confidence limits in brackets and the corresponding P value (Fisher's exact test). Number of cycles are also presented between brackets. TMS = time-lapse monitoring system.

Rubio. Clinical validation of EmbryoScope. Fertil Steril 2014.

CAPÍTULO 6

Resumen global de los resultados obtenidos

- La incidencia de la división directa en la población es de un 13,68% lo cual convierte a este fenómeno en suficientemente frecuente como para ser tenido en cuenta a la hora de evaluar el desarrollo embrionario.
- La duración del segundo ciclo celular es mucho menor en los embriones que presentan división directa.
- Estos embriones cuya división de dos a tres células ocurre en menos de 5 horas (incluso a veces sin pasar por el estadio de dos células sino directamente de una a tres) tienen un potencial de implantación significativamente menor que aquellos con una duración del segundo ciclo celular normal, en torno a un 1,2%.
- La tasa de embarazo es significativamente mayor en los tratamientos en los que se utiliza un sistema time-lapse en lugar de un incubador convencional, siendo esa mejora sustancial de un 20,1%.
- El porcentaje de ciclos sin transferencia (cancelaciones) es significativamente menor en el grupo TMS comparando con el SI (2,8% vs 5,2%).
- El porcentaje de embriones óptimos fue significativamente mayor en el grupo TMS comparado con el incubador convencional, tanto en día 3 (46,2% vs 43,1%, $P=0,01$) como día 5 de desarrollo (20,9% vs 16,6%, $P = 0,001$).
- La tasa de embarazo evolutivo por ciclo es significativamente mayor en el TMS comparado con el SI (51,4% vs 41,7%). La tasa de embarazo evolutivo por transferencia también es significativamente mayor en el TMS comparado con el SI (54,5% vs 45,3%).
- La pérdida de embarazo temprano es significativamente menor en los ciclos TMS comparado con el SI (16,6% vs 25,8%).
- La tasa de implantación es significativamente mayor en los ciclos TMS en comparación con el SI (44,9% vs 37,1%).

CAPÍTULO 7

Conclusiones generales

- La tecnología time-lapse es una nueva herramienta que permite al embriólogo seleccionar embriones con una mayor capacidad de implantación. Lo hace a través de la detección de marcadores cualitativos y cuantitativos que son medibles gracias a un monitoreo continuo del embrión.
- La relativamente elevada incidencia del fenómeno de división directa en la cohorte embrionaria, en combinación con la baja implantación de estos embriones, nos hace afirmar que se trata de un parámetro morfocinético con la potencia suficiente para ser utilizado en la actividad clínica.
- La aplicación del algoritmo de selección embrionaria basado en variables morfocinéticas diseñado por nuestro grupo permite un incremento absoluto de un 10% de las tasas de implantación y embarazo clínico.
- El estudio prospectivo randomizado nos indica que la estrategia de cultivo y selección embrionaria en un TMS como es el EmbryoScope® mejora los resultados clínicos de los tratamientos de reproducción asistida.

Bibliografía

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;15:2634-43.

Al-Nuaim L, Jenkins J. A brief historical overview of assisted reproduction. South Afr Obstet Gynecol. 2007; 13(2):38-41

Arav A, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis. Reprod Biomed Online 2008;17:669-75.

Ardoy M, Calderón G, Cuadros J et al. II Cuaderno de embriología clínica. Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Madrid: ASEBIR; 2007

Barnes FL, Crombie A, Gardner DK, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari AM, Tiglias J, Wood C, Trounson AO. Hum Reprod. 1995 Dec; 10(112):3243-7

Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. Hum Reprod 2001;16:2658-61.

Brezina PR, Zhao Y. The ethical, legal and social issues impacted by modern assisted reproductive technologies. Obs and Gynecol Internat 2011; 686253:1-7

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. Reprod Biomed Online. 2013 Aug;27(2):140-6.

Cobo A, Kuwayama M, Pérez S, Ruiz A, Pellicer A, Remohí J. Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertil Steril* 2008;89:1657-64.

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;28:569-73.

Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani S and Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;16:749-756.

Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A and Simon C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008;23:1993-2000.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984; 1:3-23

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;17:407-12.

French DB, Sabanegh ES, Jr, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril* 2010;93:1097-103.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;22:25-36

Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 1998;49:83-102.

Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 6:9-23.

Garrido N, Meseguer M, Remohí J, Pellicer A, Simon C. Flow cytometry in human reproductive biology. *Gynecol Endocrinol* 2002;16:505-21

Giorgetti C, Terriou P, Auquier P et al. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10:2427-31

Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A and Sirard MA. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008;23:1118-1127.

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;5:36-8

Higdon HL,3rd, Blackhurst DW, Boone WR. Incubator management in an assisted reproductive technology laboratory. *Fertil Steril* 2008;89:703-10

Holm P, Booth PJ, Callesen H. Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction* 2002;123:553-65

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ and Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002;17:999-1005

Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Repr Update* 2015;21:411-426

Kamel RM. Assisted reproductive technology after the birth of Louise Brown. *J Reprod Infertil* 2013;14(3):96-109

Katz-Jaffe MG and 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;17:497-501

Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* 2012;27:1277-85

Leese HJ. What does an embryo need? *Hum Fertil (Camb)* 2003;6:180-5

Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 2008;14:667-72

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;17:385–91

Lopata A, Johnston IW, Houlst IJ, Speirs AI. Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by in vitro fertilization of a preovulatory egg. *Fertil Steril* 1980;33(2):117-20

Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;16:2652-7

Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8:333-43

Melo M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *FertilSteril* 2008;89:1191-9

Melo M, Busso CE, Bellver J, Alama P, Garrido N, Meseguer M, et al. GnRH agonist versus recombinant HCG in an oocyte donation programme: a randomized, prospective, controlled, assessor-blind study. *Reprod Biomed Online* 2009;19:486–92

Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86:1376-85

Meseguer M, Martínez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohí J, Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *FertilSteril* 2008;89:1191-9

Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *FertilSteril* 2010;95:124-8

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;26:2658–71

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 with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;98(6):1481-1489

Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:660.e1–5

Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J and Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-391

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;9:1743-8

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;18:1307-12

Palermo G, Jorjas H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340 (8810):17-8

Patrizio P, Sakkas D. From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;91:1061-6

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;12:532-41

Pennings G. International evolution of legislation and guidelines in medically assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2009;18 Suppl 2:15-8

Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update* 2005;11:575-93.

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;21:533-6

Remohí JA, Cobo C, Prados N, Romero JL, Pellicer A. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. Capítulo 30; Editorial médica Panamericana, 2012

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E and Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;10:669-681

Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. New culture devices in ART. *Placenta* 2011;32 Suppl 3:S248-51

Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows HJ. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1993

Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J and Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope®. *Fertil Steril* 2014;102(5):1287-1294

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;13:182-7

Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril* 2001;76:1150-6

Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003;18:821-5

Sathananthan AH. Paternal centrosomal dynamics in early human development and infertility. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:129-39

Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod Biomed Online* 2003;6:201-14

Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:237-49

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;12:1531-6

Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, et al. Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. *J Reprod Dev* 2010;56:200-7

Stephens PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *The Lancet* 1978; 2:366

Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 2003;9:557-82

Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N and Meseguer M. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril* 2011;96:618-623

Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and independent – oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2000;62:1866-74

Trounson A, Leeton J, Besanko M, Wood C, Conti A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilised in vitro. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;286(6368):835-8

Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 1983;305(5936):707:9

Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY. Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynaecol Obstet* 2002;76:293-7

Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum Reprod* 2001;16:719-29

Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004;19:2103-8

Veeck LL, Wortham JW Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, García JE, et al. Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983;39(5):594-602

Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online* 2004;8:212-8

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385:810-3

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;28:1115-21