



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA 
Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

PROGRAMA DE DOCTORADO: 3139

Título: Análisis morfocinético utilizando un sistema de time-lapse automatizado

Trabajo de Tesis Doctoral

Realizado por Dña. Belén Aparicio Ruiz

Licenciada en Biotecnología, para optar al grado de doctora por la Universidad de Valencia

Directores

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

Dra. Dña. Sonia Pérez Albalá

Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Valencia, Octubre 2019

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



El presente trabajo de tesis doctoral se encuentra adscrito a la Facultad de
Medicina y Odontología



**Título: Análisis morfocinético utilizando un sistema de time-lapse
automatizado**

Trabajo de Tesis Doctoral

Realizado por Dña. Belén Aparicio Ruiz

Licenciada en Biotecnología, para optar al grado de doctora por la Universidad de
Valencia

Directores

Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá

Dra. Dña. Sonia Pérez Albalá

Dr. D. José Alejandro Remohí Giménez

Dra. D^a. Sonia Pérez Albalá, Doctora en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Doña Belén Aparicio Ruiz ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Análisis morfocinético utilizando un sistema de time-lapse automatizado”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa pública.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.



Valencia, octubre de 2019

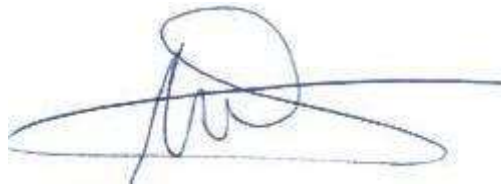
Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor en Biología por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Doña Belén Aparicio Ruiz ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: "Análisis morfocinético utilizando un sistema de time-lapse automatizado".

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa pública.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

A handwritten signature in blue ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Valencia, octubre de 2019

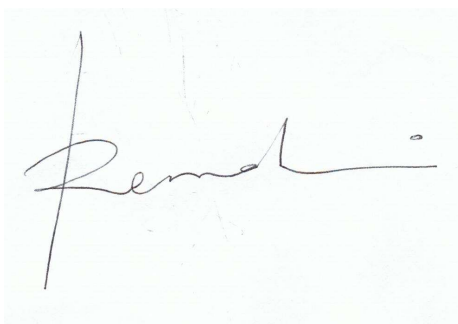
Dr. D. José Remohí Giménez, Doctor en Medicina por la Universidad de Valencia

INFORMA:

Que Doña Belén Aparicio Ruiz ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación que ha dado lugar a la memoria titulada: “Análisis morfocinético utilizando un sistema de time-lapse automatizado”.

Dicha memoria está concluida y se considera apta para su lectura y defensa pública.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación.

A handwritten signature in black ink on a light-colored background. The signature is cursive and appears to read 'Remohí'.

Valencia, octubre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Por fin, puedo dedicarme al apartado de agradecimientos, lo que significa que ya veo la luz al final del túnel de todos estos años dedicados a mi Tesis Doctoral.

Desde pequeña decía que quería dedicarme a la investigación y a la docencia. Pero lo que nunca imaginé es que mi futuro iba a estar tan encaminado hacia lo que más me gusta, que iba a poder compaginar estas dos aficiones y sobre todo que lo iba a hacer en el centro líder en el mundo.

Después de una intensa Licenciatura de Biotecnología dudé entre dedicarme a la Biología Molecular a nivel oncológico o a la Reproducción Asistida. Ambos mundos me resultaban apasionantes y tenía que tomar una decisión. La aplicación clínica de la Reproducción Asistida fue lo que me convenció para decidirme y tomar una de las mejores decisiones de mi vida a nivel profesional, pudiendo disfrutar del trabajo clínico a la vez que de la investigación incluso con algo de docencia en mi día a día.

En primer lugar, quería darle las gracias al Dr. Pellicer, Dr. Remohí y a la Dra. Amparo Ruiz por darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo y poder disfrutar día a día de lo que más me gusta, rodeado de los mejores profesionales en cada departamento de los cuales no dejé de aprender cada día.

A mi jefa, M^a José de los Santos, por darme la oportunidad de formar parte de este gran laboratorio y animarme a seguir aprendiendo cada día cosas nuevas a nivel tanto profesional como personal.

A Ernesto. Muchas gracias por todo primo. Por tu apoyo incondicional en todo momento, tus consejos, tu cariño y tu confianza en mí. Me hace muy feliz poder trabajar día a día contigo, aprender de ti, y disfrutar de tenerte cerca. Te quiero mucho.

A Elena. Por tu cariño y tu apoyo, por ayudarme en la parte “médica” de la tesis y por estar ahí siempre que te he necesitado. Gracias prima.

A Marcos, por darme la oportunidad de trabajar contigo y confiar en mí en tantas ocasiones. Porque siempre has sido un gran apoyo y un buen amigo tanto dentro como fuera del Laboratorio. Me siento muy afortunada de haberte tenido como Director de Tesis y de tener tu confianza para poder hablar contigo de todo. Espero que sigamos trabajando mucho juntos, seguir aprendiendo a tu lado y escuchando tus consejos.

A Sonia. Porque has sido una pieza clave en el desarrollo de esta Tesis. Por tu dedicación, tu esfuerzo, por hacer divertidos incluso los momentos más pesados de este trabajo. Por todo tu apoyo como Directora, como compañera, pero sobre todo como amiga. Muchas gracias.

A todo el laboratorio de FIV, Departamento de DPI. Departamento de Vitricación y Departamento de Semen. Gracias por vuestro esfuerzo y apoyo para que este proyecto siguiera adelante.

A mis “Donetes”. Muchas gracias por estar siempre a mi lado, por todas esas risas juntas y tantos momentos divertidos. Gracias amigas por ayudarme, aconsejarme y sobre todo por vuestro gran apoyo en los momentos difíciles a nivel profesional y personal.

A Lala, por tu colaboración en todo este trabajo. Por animarme a seguir adelante y por tantos momentos compartidos juntas. Por todas esas largas conversaciones desahogándonos de todo, lágrimas, risas... y ¡porque no imagino mi día a día sin ti! Gracias por todo.

A mis amigas, a “Puerta Marrón”, porque, aunque ahora no podamos vernos tanto, sois un gran apoyo y siempre seréis un pilar muy importante en mi vida. ¡Os quiero mucho chicas!

A mis padres. Un ejemplo a seguir en mi vida. Por todo vuestro esfuerzo y vuestra dedicación incondicional. Porque gracias a la educación que me habéis dado he podido llegar donde estoy, sois sin duda ejemplo de esfuerzo, trabajo y respeto. Estoy muy orgullosa de vosotros, sin duda los mejores padres que podía haber tenido con una trayectoria profesional impresionante, pero sobre todo con un cariño, amor y entrega a vuestros hijos infinita. No podemos ser más afortunados. Sois el motor de mi vida y os necesito a mi lado muchos años más. Os quiero papis.

A mi hermano. Por estar siempre pendiente de mí. Por cuidarme (por preocuparte incluso más de la cuenta muchas veces), apoyarme y valorarme tanto, realzando siempre mis cualidades y subiéndome la autoestima más que nadie. Por ser siempre mi modelo a seguir, y enseñarme tantas cosas desde pequeña. Siempre juntos, te quiero Luis. Gracias por darme a mi pequeño al que quiero con locura y que su prima lo quiere más que a nadie. Te quiero tete.

A mis yayas. Sé que desde el cielo nos cuidáis a todos y que estaríais muy orgullosas de verme terminar esta tesis. Os quiero mucho y os echo mucho de menos. Ojalá huberais podido conocer a Carla y Alejandra.

A Carlos, gracias por aparecer en mi camino y hacerme feliz cada día. Por tu cariño incondicional, por apoyarme siempre, por cuidarme y mimarme cuando más lo necesito y por estar siempre ahí en los momentos difíciles. Gracias por la familia que hemos formado juntos y por hacerme disfrutar de tantos momentos únicos. Te quiero mucho amor.

A mi pequeña. Por tu amor, tus risas, tus abrazos, tu mirada cómplice. Porque haces que saque energía de donde no la hay. Porque ya no imagino mi vida sin ti, y porque sé que serás una hermana mayor estupenda. Te quiero con locura Carla, gracias por hacernos tan felices.

Y por último a mi pequeña Alejandra, que desde la barriguita me has acompañado y me has dado fuerza (y muchas pataditas) en la recta final de esta Tesis. ¡Qué ganas de tenerte en mis brazos! Te quiero bebé.

A mi familia.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS Y SIGLAS	25
2. ÍNDICE DE FIGURAS	31
3. ÍNDICE DE TABLAS	39
4. INTRODUCCIÓN	43
4.1 La Infertilidad	43
4.2 Infertilidad masculina	44
4.3 Infertilidad femenina.....	44
4.4 Mejora de las Técnicas de Reproducción Asistida	47
4.5 Transferencia única.....	47
4.6 Tecnología Time-Lapse	48
4.7 Ciclo celular.....	49
4.8 Dispositivos con Time-Lapse	53
4.9 Ventajas de los sistemas Time-Lapse	56
4.10 Limitaciones del Time-Lapse	58
4.11 Seguridad de los incubadores con Time-Lapse	59
4.12 Marcadores Cinéticos de Viabilidad Embrionaria.....	61
4.13 Cultivo prolongado	70
4.14 Estudios utilizando el sistema automático Eeva®	72
5.OBJETIVOS.....	87
5.1 Objetivo Principal.....	87
5.2 Objetivos Secundarios	87
6.MATERIAL Y MÉTODOS	91
6.1 Diseño	91
6.2 Pacientes	91
6.3 Donantes. Estimulación Ovárica.....	92
6.4 Receptoras: Preparación Endometrial.....	92
6.5 Estimulación Ovárica en Pacientes.....	93
6.6 Punción Ovárica y Obtención de los Ovocitos	94
6.7 Muestra Seminal: Preparación	94
6.8 Examen microscópico.....	95
6.9 Movilidad.....	95

6.10 Concentración	96
6.11 Recuperación espermática	96
6.12 Decumulación de los Ovocitos	100
6.13 Inseminación: ICSI	100
6.14 Fecundación	101
6.15 Cultivo Embrionario	102
6.16 Embriones Sometidos a Diagnóstico Genético Preimplantacional.....	103
6.17 Evaluación Morfológica de los Embriones. Categorización según ASEBIR..	104
6.18 Transferencia Embrionaria	106
6.19 Descripción y Componentes del Sistema Eeva®.....	107
6.20 Descripción y Componentes del Sistema Geri®	108
6.21 Limitaciones.....	111
6.22 Software del Sistema Eeva® y Algoritmos	112
6.23 Análisis Estadístico.....	114
5. RESULTADOS.....	119
5.1 Algoritmo Eeva®.....	119
5.2 Algoritmo <i>Xtend</i> ®	135
6. DISCUSIÓN.....	153
7. CONCLUSIONES	167
7.1 Algoritmo Eeva®.....	167
7.2 Algoritmo <i>Xtend</i> ®	167
8. BIBLIOGRAFÍA.....	171

ABREVIATURAS Y SIGLAS

1. ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
ASRM	Sociedad Americana de Reproducción Asistida
AUC	Área bajo la curva
BC	Blastocisto Cavitado
BE	Blastocisto expandido
BT	Blastocisto temprano
BHi	Blastocisto iniciando eclosión (hatching)
β-hCG	Hormona gonadotrofina coriónica humana
cc2	Duración del segundo ciclo celular
CP	Corpúsculo polar
D3	Día 3 de desarrollo embrionario
D5	Día 5 de desarrollo embrionario
D6	Día 6 de desarrollo embrionario
E2	Estradiol
FIV	Fecundación in-vitro
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
hCG	Hormona gonadotropina coriónica
hMG	Menotropina
ICSI	Inyección intracitoplasmática
IC	Intervalo de Confianza
IVI	Instituto Valenciano de Infertilidad
KID	Datos de implantación conocida
MII	Metafase II
M	Mitosis

MCI	Masa celular interna
NGS	Next Generation Sequence
NR	Sin resultado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PN	Pronúcleo
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RNV	Recién nacido vivo
s2	Sincronía del segundo ciclo celular
s3	Sincronía del tercer ciclo celular
tBE	Tiempo en el que se alcanza el estadio de blastocisto expandido
TD3	Transferencia en día 3 de desarrollo
TD5	Transferencia en día 5 de desarrollo
TD6	Transferencia en día 5 de desarrollo
t2	Tiempo de división a 2 células
t3	Tiempo de división a 3 células
t4	Tiempo de división a 4 células
t5	Tiempo de división a 5 células
t7	Tiempo de división a 7 células
t8	Tiempo de división a 8 células
TE	Trofoectodermo
tM	Tiempo de formación de mórula
VE	Valerianato de estradiol

ÍNDICE DE FIGURAS

2. ÍNDICE DE FIGURAS

○ Introducción

Figura 1. Esquema fases del ciclo celular.

Figura 2. Proceso de replicación de ADN.

Figura 3. Esquema proceso de duplicación de ADN.

Figura 4. Fases de la mitosis.

Figura 5. Incubadores Time-Lapse.

Figura 6. Comparativa entre Embryoscope e incubador convencional.

Figura 7. Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Meseguer *et al.*, 2011).

Figura 8. Algoritmo de selección embrionaria (Meseguer *et al.*, 2011).

Figura 9. Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Hashimoto *et al.*, 2012).

Figura 10. Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Dal Canto 2012).

Figura 11. Tasa de blastocisto y de blastocisto óptimo en cada categoría.

Figura 12. Tasa de implantación y de gestación en el grupo de estudio y en el control.

Figura 13. Algoritmo de selección embrionaria (Basile *et al.*, 2012).

Figura 14. Variables más relevantes para la selección de blastocistos con mayor potencial de implantación (Motato *et al.*, 2015).

Figura 15. Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Wong *et al.*, 2010).

Figura 16. Fenómenos dinámicos atípicos asociados con menor potencial de llegada a blastocisto.

Figura 17. Comparativa entre tasa de implantación y gestación de transferencias utilizando el algoritmo de dos categorías.

Figura 18. Comparativa entre tasa de implantación y gestación de transferencias tras la introducción de una tercera categoría en el algoritmo.

Figura 19. Comparativa en los valores predictivos entre la selección basada en morfología o combinando morfología y Eeva® (Diamond *et al.*, 2015).

Figura 20. Análisis de OR entre la selección basada en morfología o combinando morfología y Eeva® separando embriones de buena calidad.

Figura 21. Tasa de gestación en cada categoría Eeva®.

Figura 22. Tasa de implantación y gestación al transferir al menos un embrión “*high*” o solamente embriones “*low*”.

Figura 23. Tasa de implantación distinguiendo la calidad morfológica de los embriones y su clasificación Eeva®.

Figura 24. Tasa de embriones euploides según categoría Eeva® en un grupo de pacientes de ovodon y en pacientes de propios.

Figura 25. Tasa de implantación y de gestación tras análisis cromosómico en función de la calidad morfológica y Eeva®.

○ **Material y Métodos**

Figura 26. Clasificación de los espermatozoides según su movilidad.

Figura 27. Procedimiento técnica swim-up.

Figura 28. Procedimiento técnica gradientes de densidad.

Figura 29. Esquema del proceso de decumulación.

Figura 30. Ovocito correctamente fecundado.

Figura 31: Posicionamiento correcto de la placa

Figura 32. Clasificación de los embriones en D3 según ASEBIR.

Figura 33. Clasificación de los blastocistos según ASEBIR.

Figura 34. Cámara que se introduce en el incubador para crear un ambiente con humedad.

Figura 36. Página del compartimento de incubación.

Figura 35. Pantalla de inicio del incubador Geri®.

Figura 37. Pantalla de los pocillos de la placa Geri®.

Figura 38. Tiempos que definen las diferentes categorías Eeva

Figura 39. Parámetros utilizados en el algoritmo Xtend® para la clasificación de los embriones.

○ Resultados

Figura 40. Distribución de los embriones en las diferentes categorías Eeva®.

Figura 41. Distribución de los embriones en las diferentes categorías ASEBIR.

Figura 42. Tasa de blastocisto en las diferentes categorías Eeva®.

Figura 43. Tasa de blastocisto en las diferentes categorías ASEBIR.

Figura 44. Tasa de blastocisto óptimo en las diferentes categorías Eeva®.

Figura 45. Tasa de blastocisto óptimo en las diferentes categorías ASEBIR.

Figura 46. En cada categoría Eeva®, porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto en D5 o en D6.

Figura 47. Porcentaje de blastocistos de calidad óptima en D5 o en D6 según categoría Eeva®.

Figura 48. Curva ROC modelo Eeva®.

Figura 49. Curva ROC. Modelo ASEBIR.

Figura 50. Distribución de los embriones KID según las diferentes categorías Eeva®.

Figura 51. Tasa de implantación en cada categoría Eeva® en función del día de la transferencia.

Figura 52. Distribución de embriones en cada categoría ASEBIR en función del día de la transferencia.

Figura 53. Tasa de implantación en cada categoría ASEBIR en función del día de la transferencia.

Figura 54. Curva ROC. Modelo ASEBIR-Eeva®.

Figura 55. Tasa de gestación en función de la clasificación de los embriones (D3+D5).

Figura 56. Tasa de gestación en función de la clasificación de los embriones transferidos en D3/D5.

Figura 57. Porcentaje de embriones en cada categoría Xtend®.

Figura 58. Tasa de llegada a blastocisto en cada categoría Xtend®.

Figura 59. Tasa de blastocisto de calidad óptima en cada categoría Xtend®.

Figura 60. Distribución de embriones óptimos por categoría Xtend agrupada.

Figura 61. Distribución de los blastocistos según su calidad en categorías Xtend® agrupadas.

Figura 62. Distribución embriones KID en cada categoría Xtend®.

Figura 63. Tasa de implantación de embriones frescos y congelados en cada categoría Xtend® (p=0.017).

Figura 64. Distribución de embriones KID en cada categoría Xtend® agrupada.

Figura 65. Tasa de implantación en las categorías Xtend® agrupadas (p=0.003).

Figura 66. Tasa de implantación en blastocistos KID de calidad A/B según su categoría Xtend® (p=.084).

Figura 67. Tasa de implantación en blastocistos KID que no eran de calidad A/B según su categoría Xtend® (p=0.687).

Figura 68. Tasa de implantación en blastocistos KID frescos según su categoría Xtend (p<0.05, ns).

Figura 69. Tasa de implantación en blastocistos KID desvitrificados según su categoría Xtend® (p=0.019).

Figura 70. Tasa de blastocistos biopsiables en cada categoría Xtend®.

Figura 71. Tasa de blastocistos euploides en cada categoría Xtend®.

ÍNDICE DE TABLAS

3. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudio de la correlación de diferentes parámetros morfocinéticos con la capacidad de implantación (Goodman *et al.*, 2016).

Tabla 2. Tasa de blastocisto. Modelo de regresión logística

Tabla 3. Tasa de Implantación. Modelo de regresión logística.

Tabla 4. Tasa de Gestación. Modelo de regresión logística.

Tabla 5. Probabilidad de llegada a blastocisto según categoría Xtend®. Modelo de regresión logística.

Tabla 6. Probabilidad de llegada a blastocisto de calidad óptima según categoría Xtend®. Modelo de regresión logística.

Tabla 7. Implantación según la calidad de los blastocistos y de la categoría Xtend®. Modelo de regresión logística.

Tabla 8. Modelo de regresión logística de la tasa de implantación considerando categorías ASEBIR, Xtend®, número de ovocitos, IMC y número de embriones congelados.

Tabla 9. Número de blastocistos incubados en ambiente húmedo o seco según su categoría Xtend®.

Tabla 10. Número de blastocistos incubados en ambiente húmedo o seco según su categoría Xtend® agrupada.

INTRODUCCIÓN

4. INTRODUCCIÓN

4.1 La Infertilidad

La Sociedad Americana de Reproducción Asistida (ASRM) definió recientemente la infertilidad como una enfermedad que implica la incapacidad de conseguir un embarazo a término tras 12 meses o más del mantenimiento de relaciones sexuales apropiadas, sin la utilización de métodos anticonceptivos.

Una evaluación o tratamiento más temprano de dicha enfermedad puede estar justificada por la historia médica de los pacientes y en mujeres mayores de 35 años cuando este periodo supera los 6 meses (1). Aproximadamente 1 de cada 6 parejas en edad fértil se verá afectada de esterilidad. Estos porcentajes conciernen a mujeres menores de 35 años, a partir de esa edad el potencial reproductivo disminuye y después de los 40 años, la posibilidad de embarazo por mes es menor de 10%.

La esterilidad es la incapacidad para concebir y la infertilidad la imposibilidad para finalizar la gestación con el nacimiento de un niño sano (1). La esterilidad hace referencia a parejas que no consiguen el embarazo tras un año y medio de mantener relaciones sin métodos anticonceptivos (esterilidad primaria) o cuando tras la consecución del primer hijo, no logra una nueva gestación en los dos o tres años siguientes de coitos sin anticonceptivos (esterilidad secundaria). Se habla de infertilidad primaria cuando ningún embarazo ha llegado a término satisfactoriamente y de infertilidad secundaria cuando sobrevienen los abortos después de haber logrado alguna gestación normal (2).

Los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de otras entidades del sector apuntan a que la infertilidad debe ser asumida como un problema de salud pública, afectando la tasa de natalidad en países que de por sí se caracterizan por un bajo número de nacimientos. Además, en muchas situaciones, implican también alteraciones en las condiciones emocionales y afectivas de las personas y sus tratamientos suponen costes adicionales para los sistemas de seguridad social (3).

En el 30-40% de los casos la causa de infertilidad se relaciona con la mujer, otro 40% es debido a factor masculino y el 20-30% restante se debe a la combinación de ambos factores. Existen algunos factores que afectan a la fertilidad de la pareja, influyendo en la

posibilidad de poder gestar de forma natural: frecuencia de relaciones sexuales, edad de la mujer, tabaco, ejercicio físico, peso de la mujer, medicación, infección pélvica, cirugía abdominal previa y factores psicológicos (4).

4.2 Infertilidad masculina

La infertilidad de origen masculino representa entre el 40% y el 60% de los casos de infertilidad (5) y para su diagnóstico el primer paso es el análisis de las características seminales, que pueden verse afectadas por diversos factores, tanto extrínsecos (medio ambientales) como intrínsecos (anatómicos, endocrinológicos o genéticos).

Adicionalmente, es necesaria una exploración física que incluye el estudio de antecedentes quirúrgicos (criptorquidia), trauma testicular o antecedentes de exposición a diversos fármacos como agentes quimioterapéuticos que alteran el epitelio germinal (6), uso de medicamentos como la tetraciclina o eritromicina que alteran la espermatogénesis (7) así como la exposición a metales pesados como el plomo y el mercurio (8).

También existe un porcentaje de casos en los que la etiología de la infertilidad masculina es desconocida aunque estudios epidemiológicos han encontrado que el estilo de vida así como los hábitos alimenticios pueden afectar los patrones de infertilidad (9).

La causa de infertilidad masculina más común es el varicocele. Un varicocele se forma cuando las válvulas dentro de las venas que hay a lo largo del cordón espermático impiden que la sangre circule apropiadamente. La sangre se acumula, lo que lleva a una hinchazón y dilatación de dichas venas.

4.3 Infertilidad femenina

La infertilidad por factor femenino es la responsable del 30 al 40% de los casos.

Existen diferentes causas de esterilidad femenina:

- **Factor tubo-peritoneal:** alrededor del 25% de los casos de esterilidad femenina se debe a algún tipo de lesión en las trompas de Falopio. El daño de las trompas parcial, debido a una adherencia, o completo, por obstrucción tubárica, impedirá

el encuentro entre el espermatozoide y el ovocito y como consecuencia no se producirá la fecundación (10).

El daño tubárico puede producirse por infecciones que ascienden desde el cuello uterino o útero hacia las trompas (Enfermedad Inflamatoria Pélvica, EIP) o bien por continuidad desde la cavidad abdominal (apendicitis). Los gérmenes más frecuentemente implicados en la EIP son Gonorrea y Chlamydia, entre otros (11).

Adherencias a nivel tubárico originadas por una cirugía pélvica previa, así como la endometriosis, podrían dar lugar también a daño tubárico.

El factor tubárico se relaciona, además, con el embarazo ectópico, ya que alteraciones en el diámetro y en la parte interna de la trompa impiden o dificultan el adecuado transporte del embrión hasta la cavidad uterina.

- **Endometriosis:** se manifiesta por la presencia de tejido uterino fuera del útero. Con una prevalencia entre el 6 y el 10% en las mujeres en edad reproductiva (12), es una enfermedad ginecológica benigna multifactorial de la cual se conoce poco acerca de su distribución y factores de riesgo en la población. La infertilidad relacionada con la endometriosis puede derivar de los cambios que ocurren en la anatomía pélvica de estas pacientes durante los ciclos menstruales. Puede provocar obstrucción de las trompas o formación de quistes ováricos endometriósicos que en ocasiones precisan cirugía, con la consecuente pérdida de tejido ovárico y disminución de la fertilidad.
- **Causa mecánica:** hay casos en los que existe alguna dificultad para depositar el eyaculado en el tracto genital femenino, puede presentar un origen congénito, como la ausencia o alteración irreversible de órganos genitales femeninos internos, o un origen adquirido, como las secuelas de enfermedades de transmisión sexual (13).
- **Factor uterino:** este caso es mucho más frecuente que cause infertilidad, y no esterilidad. Fundamentalmente son alteraciones de la anatomía interna del útero que pueden ser congénitas (duplicación parcial o completa del útero, septos) o

adquiridas (pólipo, miomas, sinequias, endometritis) y que pueden provocar abortos repetidos (14).

- **Factor cervical:** en este caso, la causa proviene de alteraciones anatómicas y/o funcionales del cuello del útero que interfieren con la correcta migración de los espermatozoides hacia el útero y las trompas de Falopio en su intento de aproximación al óvulo: impermeabilidad del cuello del útero (pólipos, quistes) o cirugía previa (conización) (15).

- **Causas endocrinas:** hay casos en los que existe una alteración de la función del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Como ejemplo se encuentran la anovulación y los ovarios poliquísticos con una prevalencia del 15-25% y 11% de los casos respectivamente.

Las mujeres con el Síndrome de ovarios poliquísticos presentan ciclos menstruales irregulares e incluso ausencia de menstruación. Por este motivo, muchas de ellas tendrán problemas para quedarse embarazadas por la falta de ovulación, desencadenando problemas de fertilidad y la necesidad de acudir a un centro especializado en medicina reproductiva (16).

- **Otras causas:** la frecuencia de relaciones sexuales, así como los estilos de vida, pueden ejercer un efecto significativo en el tiempo para concebir. El tabaquismo y la obesidad entre las mujeres y los hombres son un ejemplo de ello (9,17,18).

Los miomas, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer, enfermedad de tiroides, asma o depresión también son considerados factores de riesgo.

Sin duda, el factor más importante en la infertilidad femenina es la edad de la mujer (16). Con el paso del tiempo se produce una reducción cualitativa y cuantitativa de los ovocitos, descenso que no puede ser controlado ni modificado y que se pone de manifiesto también, por un aumento de la tasa de abortos, principalmente ocasionados por el incremento de aneuploidías o cromosomopatías y un descenso de la probabilidad de éxito de los tratamientos de reproducción asistida (19).

4.4 Mejora de las Técnicas de Reproducción Asistida

El éxito de las técnicas de reproducción asistida se podría lograr mediante la mejora de varios procesos:

- Mejora en los protocolos de estimulación ovárica, obteniendo de este modo una mejor calidad de los ovocitos recuperados (20,21).

- Mejora en la selección y recuperación espermática (22,23).

- Mejora en la calidad embrionaria con un sistema óptimo de cultivo (24,25).

- Mejora en los métodos de selección de embriones, lo que nos permitirá seleccionar con mayor seguridad el embrión con mayor potencial de implantación (26-29).

4.5 Transferencia única

Con el objetivo de aumentar la probabilidad de gestación, una de las prácticas más comunes en la clínica diaria hasta ahora es la transferencia de más de un embrión, aumentando la probabilidad de embarazos múltiples, con todas las implicaciones que ello conlleva.

El elevado porcentaje de gestaciones gemelares supone un aumento de ciertos riesgos para la salud tanto de la madre como de los fetos, incluyendo embarazo prematuro, bajo peso del recién nacido, retraso en el crecimiento intrauterino, hipertensión y otras complicaciones obstétricas (30). Además, también se ha descrito una incidencia 6 veces superior de riesgo de mortalidad perinatal y morbilidad, y 4 veces superior de riesgo de parálisis cerebral (31) en los embarazos gemelares comparados con los embarazos únicos.

La transferencia selectiva de un único embrión, denominado eSET (en inglés, *elective single embryo transfer*) es la mejor estrategia para evitar estas gestaciones múltiples, pero podría suponer una disminución de la tasa de gestación si no hacemos una buena selección embrionaria.

Aunque inicialmente la transferencia electiva de un solo embrión se llevaba a cabo en pacientes de buen pronóstico: edad menor de 36 años, primer o segundo ciclo de FIV y con cohortes embrionarias de buena calidad, cada día esta práctica se lleva a cabo en más pacientes. La necesidad de esta mejora ha promovido que se trabaje e investigue más exhaustivamente tanto a nivel médico como tecnológico para ser capaces de distinguir, con la mayor precisión posible, embriones que van a tener éxito de los que no. Por ello, el compromiso de mejorar la tasa de embarazo a través de técnicas de fecundación in vitro debería encaminarse a la búsqueda de nuevos marcadores de calidad embrionaria para la identificación de mejores embriones que den lugar a descendencia sana.

4.6 Tecnología Time-Lapse

Es importante destacar que conseguir un embarazo a término es nuestro objetivo principal como profesionales en el campo de la reproducción asistida. En la mayoría de los casos, los pacientes no son conscientes del riesgo que conlleva una gestación múltiple y por ello se muestran reacios a aceptar una transferencia única.

Por ello, actualmente existen muchos grupos de investigación buscando marcadores de viabilidad embrionaria capaces de suplementar los criterios de selección embrionaria actuales con el fin de aumentar, o al menos mantener la tasa de gestación con transferencias embrionarias electivas y únicas, minimizando los embarazos múltiples.

La tecnología time-lapse consiste en incorporar al incubador un sistema de captura de imágenes con el objetivo de poder estudiar los tiempos exactos en los que se producen los diferentes eventos del desarrollo embrionario. De este modo, la combinación de parámetros morfocinéticos utilizando la tecnología de time-lapse, y los parámetros morfológicos utilizados convencionalmente, podría ser considerada como un nuevo marcador de viabilidad embrionaria, siendo de gran utilidad en la mejora de la selección embrionaria desde un punto de vista dinámico.

La base de esta nueva tecnología está basada en los tiempos exactos de las divisiones celulares y duración de los ciclos celulares.

4.7 Ciclo celular

El ciclo celular (cc) comprende una serie de eventos que conducen al crecimiento de la célula y finalmente la generación de dos células hijas garantizando con ello la continuidad de la información hereditaria (32). Dentro del ciclo celular se distinguen dos grandes períodos:

- **Interfase:** periodo de no división durante la cual la célula crece y se produce la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN).
- **Mitosis (M):** periodo de división durante el cual se produce el reparto o segregación idéntica del material antes duplicado (*Figura 1*).

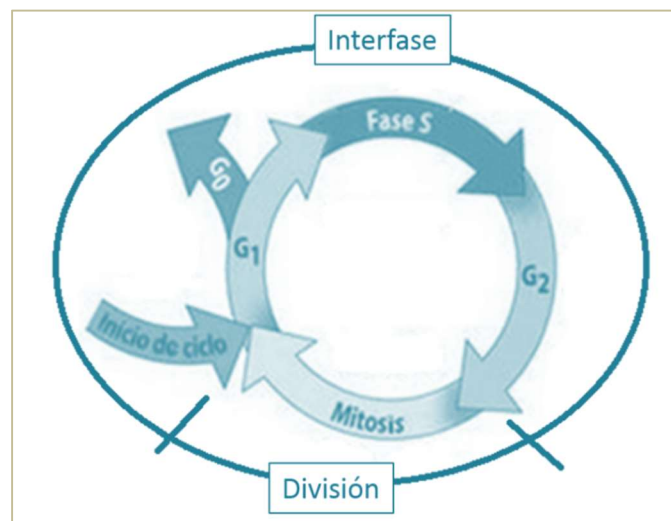


Figura 1: Esquema fases del ciclo celular (Alberts et al., 2006).

4.7. Fases del ciclo celular

INTERFASE

Es la fase más larga, transcurre entre dos mitosis. La célula se encuentra en un estado basal de funcionamiento. Durante esta fase se llevan a cabo tanto la replicación del ADN como la duplicación de los orgánulos que permitirá tener una copia de todo antes de su división, razón por lo cual los cromosomas se observan dobles. Esta fase se encuentra conformada por las siguientes etapas:

Fase G_1 (del inglés *Growth* o *Gap 1*): desde que se termina la fase M hasta que comienza la fase S. Tiene una duración de entre 6 y 12 horas y es la fase en la cual la célula comprueba las condiciones internas para “decidir” si continuar o no con el ciclo celular. Si las señales son propicias la célula crecerá en tamaño y se preparará para entrar en la fase S. En esta etapa la célula crece físicamente, copia los orgánulos y genera componentes moleculares que necesitará en etapas posteriores.

Fase S (del inglés *Synthesis*): En esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas. Es la segunda fase del ciclo y en la que se producen dos sucesos importantes: la replicación del ADN y la duplicación de los centrosomas que es necesaria para la organización del huso mitótico.

Replicación del ADN

Proceso por medio del cual se sintetiza una molécula de ADN utilizando como molde el propio ADN celular. Para la duplicación del ADN es necesario, en primer lugar, separar las dos cadenas de ADN rompiendo los puentes de hidrógeno mediante acción de la helicasa y en segundo lugar copiarlas simultáneamente a partir de diferentes puntos de la cadena llamados orígenes de replicación. Luego, la RNA primasa ubica el RNA cebador (fragmentos de Okazaki) que proporciona extremo libre 3' al que se enlaza la DNA polimerasa III que se encarga de situar los nucleótidos complementarios. Finalmente, DNA polimerasa I reemplaza el cebador de ácido ribonucleico (RNA) por DNA y una ligasa sella la unión de los fragmentos de DNA. Este proceso continúa en ambas direcciones hasta que la molécula de ADN ha sido totalmente replicada (*Figura 2*).

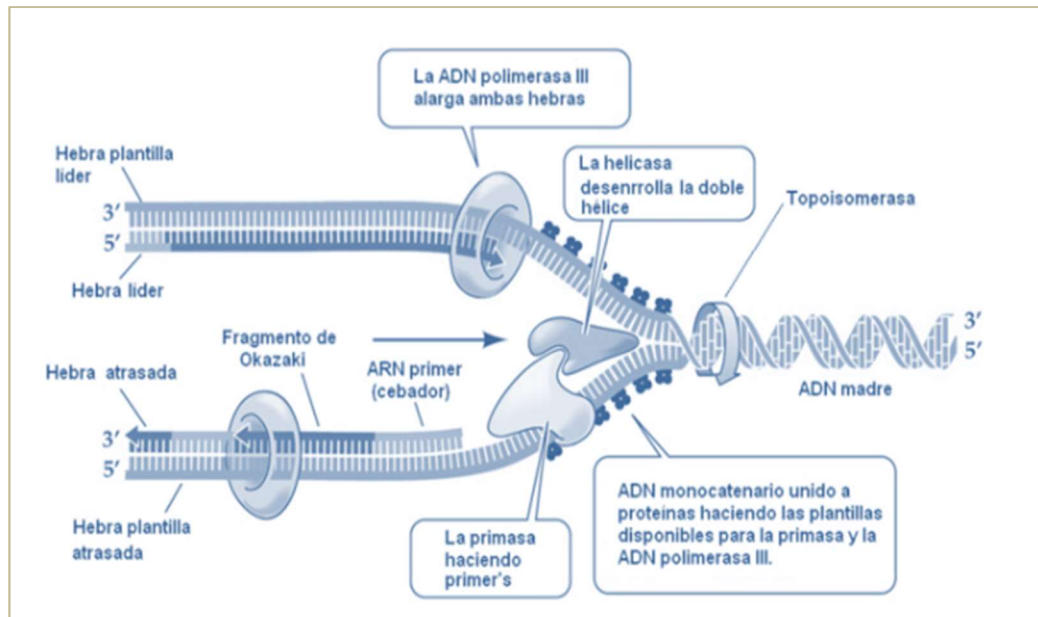


Figura 2: Proceso de Replicación de ADN (Alberts et al., 2006).

Como resultado, cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. Con la duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio. Tiene una duración de unas 10-12 horas (Figura 3).

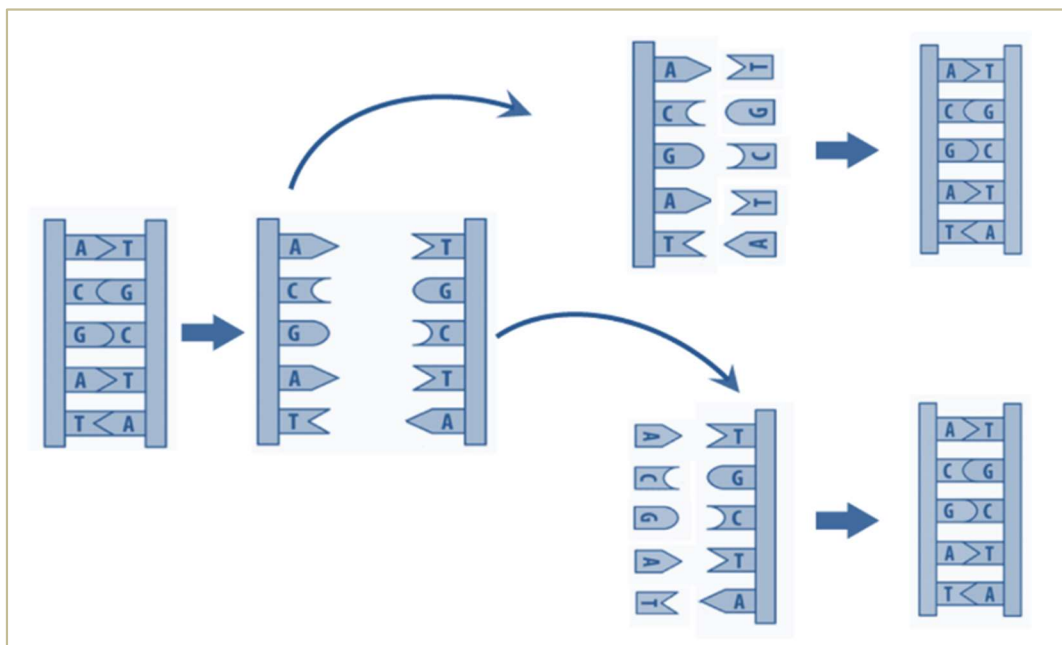


Figura 3: Esquema proceso de duplicación de ADN (Bioquímica. Conceptos esenciales. 2010. Feduchi, Blasco, Romero, Yáñez. Editorial Médica Panamericana).

Fase G₂ (del inglés *Growth* o *Gap 2*): en esta fase continúa la síntesis de proteínas y RNA y se acumulan progresivamente las moléculas que serán necesarias durante la fase M. Además, el CdK tipo 1 y la ciclina B1 entre otras proteínas quinasas y fosfatasas, comprobarán si ha habido errores o duplicación incompleta del ADN. Durante la fase G₂ las células también aumentan en tamaño y los centrosomas, duplicados durante la fase S, se dirigen a sitios opuestos en la célula para formar posteriormente el huso mitótico. Tiene una duración entre 3 y 4 horas y termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis. La carga genética de humanos se ha duplicado, teniendo ahora dos cromátidas cada uno (2n 4c). La fase G₂ termina cuando la mitosis comienza.

MITOSIS

Durante la fase mitótica (M), la célula divide su ADN duplicado y su citoplasma para hacer dos nuevas células. La fase M implica dos procesos distintos relacionados con la división: mitosis y citocinesis.

En la mitosis, el ADN nuclear de la célula se condensa en cromosomas visibles y es separado por el huso mitótico, una estructura especializada formada por microtúbulos. La mitosis ocurre en cuatro etapas: profase (que a veces se divide en profase temprana y prometafase), metafase, anafase y telofase. La citocinesis es el proceso de división del citoplasma en dos partes por estrangulamiento celular, dando como resultado dos células independientes (*Figura 4*).

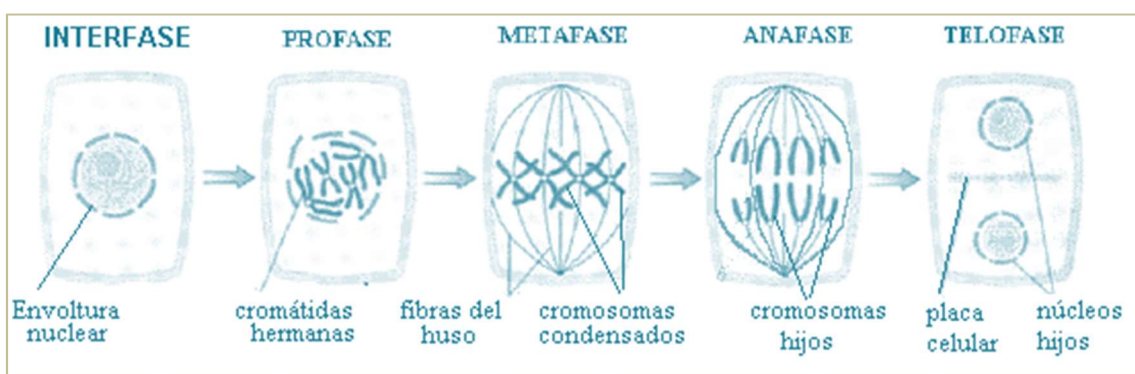


Figura 4: Fases de la mitosis (www.biologia.edu.ar/botanica).

4.7.2 Ciclo celular en embriones humanos

En los seres humanos la duración media del ciclo celular es entre 10 y 12 horas (33), tiempo que debe ser el suficiente para la replicación del ADN y la citocinesis. Así, ciclos celulares extremadamente cortos (1.8 horas) (34) darán lugar a una replicación incompleta del ADN, que podría asociarse con una distribución desigual de ADN en las blastómeras.

El primer ciclo celular en los embriones está comprendido entre la extrusión del segundo corpúsculo polar hasta la desaparición de los pronúcleos y se caracteriza por su duración prolongada (10-12 horas) (35). Una explicación para esta extensión puede ser el hecho que en esta etapa se deben llevar a cabo una serie de funciones especializadas que posteriormente sustentarán el desarrollo embrionario entre las que se encuentran: la culminación de la segunda división meiótica, acompañada por la extrusión del segundo cuerpo polar en el ovocito, así como la remodelación de la cromatina proveniente del espermatozoide, seguido de la ruptura de la envoltura nuclear y la subsecuente descondensación de la cromatina para el reemplazo de las protaminas por histonas; una vez realizado el recambio es cubierta por la envoltura nuclear para la formación del pronúcleo masculino. Seguidamente se lleva a cabo la replicación del ADN previa descondensación de las cromatinas masculina y femenina (36) para así dar paso a la primera división mitótica. El inicio de la primera división mitótica se define como una división celular que genera un embrión de dos blastómeras entre las 25 y 27 horas después de ICSI (37) y tienen una duración de alrededor de 30 minutos. Después del primer ciclo celular mitótico se lleva a cabo una serie de ciclos de división celular en cada una de las células hermanas.

4.8 Dispositivos con Time-Lapse

En 1997, Payne y colaboradores (38) diseñaron el primer sistema de grabación de video por medio de time-lapse, incorporado a un microscopio. En este sistema, el microscopio invertido estaba completamente cubierto por una cámara grande y el espacio entre el cuerpo del microscopio y los bordes de la cámara estaban sellados. La cámara se mantenía a 37° con una concentración de CO₂ del 5%. Utilizando este sistema, realizaron

fotogramas seriados de un ovocito durante 17-20 horas tras el ICSI. Se trató de instaurar este sistema en otros laboratorios, encontrándose como dificultad principal la posibilidad de mantener unas condiciones de cultivo estables.

En los últimos años, con el avance de las tecnologías se han ido superando dificultades y se han desarrollado diferentes dispositivos capaces de incorporar la tecnología time-lapse (39).

Es importante tener en cuenta que, a la hora de diseñar incubadores con time-lapse, los requisitos y exigencias de un incubador van a depender de si van a ser diseñados con fines de investigación o para la práctica clínica diaria.

El objetivo en investigación es obtener la mayor cantidad de información posible, con softwares sofisticados para interpretación y análisis de datos. En cambio, para uso clínico, los sistemas utilizados deben de ser más fácilmente interpretables y de manejo más sencillo, lo que conocemos como “*user-friendly*”. En la actualidad, los incubadores diseñados han tenido que buscar un equilibrio entre ese punto de obtención de información y manejo asequible y rápido para el uso clínico diario.

Actualmente existen 3 alternativas diferentes (40):

- Incubadores acoplados a microscopios convencionales.

Un ejemplo de ello es el Tokai-hit Ltd (Japan). La elevada calidad de imagen y 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 utilizarlo para uso clínico.

- Microscopio insertado dentro de un incubador convencional.

El sistema Primo Vision (Cryo Innovations, Hungary), por ejemplo, es menos flexible, pero proporciona unas condiciones de cultivo óptimas y estables.

Otro ejemplo es el “Embryo early viability assessment” (Eeva[®], Merck), que ha sido diseñado para insertarse dentro de la mayoría de incubadores convencionales proporcionando una captura de imágenes automática con campo oscuro con el fin de analizar de forma cuantitativa el desarrollo del embrión.

- Un dispositivo con ambas aplicaciones integradas. En esta sección nos centraremos en tres sistemas diferentes:

EMBRYOSCOPE®

Embryoscope® (Unisense Fertilitech, Denmark), es un incubador diseñado para uso clínico, el cual permite incubar 6 pacientes en placas de 12 embriones cada una. Además, este incubador utiliza un software de análisis de imagen en el cual los eventos y tiempos de divisiones celulares pueden ser interpretados de manera sencilla. Una versión mejorada de este sistema se encuentra ahora en el mercado bajo el nombre Embryoscope+®. Como novedad más relevante, además de una mejora en la calidad de la imagen proporcionada, presenta una mayor capacidad, con placas capaces de incubar 16 embriones y posibilidad de procesar simultáneamente hasta 15 pacientes.

GERI®

Otro de los incubadores que lideran el mercado en la actualidad es el sistema Geri® (Genea Biomedx), el cual permite incubar 6 pacientes en placas de 16 embriones cada una. En este caso, cada compartimento es individualizado y mantiene su temperatura, pH y entorno en perfectas condiciones de modo que el cultivo de los embriones de una paciente no se verá alterado por la apertura del resto de cámaras. Este sistema presenta diferentes sistemas de análisis. El software Eeva® permite la detección automática de las primeras divisiones celulares y clasifica los embriones según su potencial de llegada a blastocisto utilizando su propio algoritmo. El recién incorporado, software DANA detecta automáticamente todas las divisiones embrionarias además de otros eventos relevantes en el desarrollo embrionario. También te permite obtener una clasificación de los embriones según el algoritmo que cada usuario crea conveniente.

MIRI®

El sistema Miri® permite incubar 6 pacientes en placas de 14 embriones cada una. Este sistema también presenta un sistema de análisis avanzado y compartimientos individualizados para cada una de las placas.

Cada uno de ellos presenta también placas especialmente diseñadas. Como hemos nombrado anteriormente, la capacidad y el diseño de las mismas varía entre ellos (Figura 5).

	ESD+	PRIMO VISION	EEVA	GERI	MIRI
					
PLACAS					
Óptica	Campo claro	Campo claro	Campo oscuro	Campo claro	Campo claro

Figura 5: Incubadores Time-Lapse

4.9 Ventajas de los sistemas Time-Lapse

Actualmente, la selección embrionaria de manera rutinaria se basa en criterios morfológicos subjetivos obtenidos a partir de la evaluación de los mismos mediante microscopio óptico teniendo en cuenta parámetros importantes como el número de células, simetría, fragmentación y compactación celular, en unos tiempos determinados preestablecidos.

Este método de evaluación presenta como limitaciones, no sólo la subjetividad del embriólogo sino también el propio sistema de evaluación, que concibe el desarrollo embrionario desde un punto de vista estático.

Debido a la importancia de mantener a los embriones fuera del incubador el menor tiempo posible, por los efectos que tienen en los mismos los cambios en las condiciones de cultivo, las evaluaciones morfológicas se han limitado a tiempos concretos. La evaluación puntual del embrión, por tanto, se traduce en una enorme pérdida de información de todo lo que ocurre antes y después del momento analizado. Además, la rapidez con que se producen los cambios en la morfología celular puede implicar la pérdida completa de algunos procesos efímeros que se hacen evidentes cuando se visualiza todo el desarrollo embrionario. La solución a esta limitación implica la obtención de nuevas técnicas como la tecnología de time-lapse, capaz de registrar todo el desarrollo embrionario como un proceso dinámico (39).

Esta tecnología puede mejorar los resultados de un ciclo de fecundación in vitro aumentando la capacidad para identificar y seleccionar embriones con un mayor potencial de implantación. Esto nos permitiría no solamente aumentar la tasa de implantación sino también realizar transferencias electivas de un solo embrión, reduciendo con ello los embarazos múltiples, uno de los grandes objetivos de la reproducción asistida.

Ventajas principales:

- Los embriones son analizados sin necesidad de sacarlos de su incubador.
- Información objetiva y precisa, cualitativa y cuantitativa.

Ventajas secundarias:

- Ahorro de tiempo ya que no es necesario trasladar los embriones desde el incubador hasta el microscopio para su evaluación.
- Disminución de los costes (medios de cultivo, placas, aceite mineral y CO₂).
- Ahorro de espacio, los incubadores que incorporan la tecnología time-lapse ocupan menos espacio físico en el laboratorio.
- Introducción de nuevos parámetros, no solo morfológicos sino también dinámicos para la evaluación embrionaria.

- Obtención de una gran cantidad de imágenes que son una fuente de información para futuros estudios retrospectivos.
- Identificación de determinados fenómenos que sólo pueden detectarse a través de time-lapse, como por ejemplo la reabsorción de fragmentos.

Un estudio llevado a cabo por Wong *et al.* utilizando un sistema time-lapse determinó varios tipos de divisiones aberrantes tales como citocinesis más largas de lo normal que originan una ligera fragmentación tras la división, comportamientos morfológicos raros varias horas antes de dividirse así como embriones que realizan varios intentos de división antes de dividirse completamente (41).

Otro parámetro que también puede cambiar con el tiempo es la simetría de las blastómeras (33). Además, con la ayuda del time-lapse pueden excluirse embriones con patrones de división aberrantes que no podrían detectarse con evaluaciones en tiempos puntuales.

El análisis de imágenes utilizando time-lapse también ha sido de gran utilidad para definir la duración de los primeros ciclos celulares, así como los tiempos entre dos divisiones consecutivas. Ciclos celulares extremadamente cortos pueden implicar una distribución anormal de ADN en las blastómeras o errores en la replicación (34).

4.10 Limitaciones del Time-Lapse

Los sistemas de time-lapse todavía presentan algunas limitaciones que deben superarse con la mejora de los incubadores actualmente disponibles.

El movimiento de los embriones en el interior del pocillo podría ocasionar, en casos puntuales, la pérdida de la imagen y con ello perder algún evento importante. Esto podría ser ocasionado también por la aparición de burbujas en el medio de cultivo (42).

Otro reto de los sistemas de time-lapse hace referencia a la información cualitativa, especialmente en embriones en estadios avanzados, en los cuales contar el número de células puede resultar más complicado a pesar de proporcionar imágenes desde diferentes planos. Otro problema que podemos encontrarnos es la dificultad que supone contar y evaluar divisiones embrionarias de embriones con elevada fragmentación. A

medida que el embrión tiene más células también resulta más complicado evaluar la multinucleación de las blastómeras.

Debemos destacar que el tiempo definido como punto de partida es una media de todos los ovocitos de la cohorte, por lo que hay un pequeño desfase entre el primer ovocito microinyectado y el último. Esta limitación puede subsanarse teniendo en cuenta duración de ciclos celulares en lugar de tiempos de división exactos de un determinado parámetro, tal y como se está haciendo ya en algunos de los sistemas.

4.11 Seguridad de los incubadores con Time-Lapse

El efecto negativo de la luz sobre los embriones ha sido objeto de estudio por parte de diferentes grupos y por tanto es un tema a tener en cuenta. Ottosen y colaboradores (43) observaron un retraso en las divisiones celulares en embriones de conejo y ratón sometidos a exposiciones de luz durante procedimientos en el laboratorio de fecundación *in vitro*.

Conscientes de los efectos adversos de la manipulación embrionaria, la frecuencia de las observaciones bajo microscopio es limitado. Esto no parece ser un problema para los embriones cultivados en un incubador con tecnología time-lapse, donde la manipulación es mucho menor. Sin embargo, en este caso, los embriones se exponen de manera periódica a la luz cada vez que se adquieren las imágenes que luego analizamos en forma de video.

Mio y colaboradores no encontraron ninguna diferencia en la tasa de embarazo al comparar los embriones cultivados en un incubador convencional con el incubador de time-lapse. A pesar de que no compararon calidad ni morfología entre grupos, sus resultados mostraron que esta exposición periódica a la luz no perjudicaba la calidad embrionaria (44).

El grupo de Nakahara obtuvo resultados similares en un estudio prospectivo en el que comparaban tasa de fecundación, divisiones y morfología de embriones cultivados en un incubador con un microscopio óptico integrado (SANYO *In vitro* Live Cell Imaging Incubation System, Japan) y embriones evaluados puntualmente cultivados en un incubador convencional. En este estudio no se vieron diferencias significativas entre los

grupos en ninguno de los parámetros analizados, concluyendo que no existe un efecto negativo en los embriones sometidos a un sistema-time-lapse y confirmando de este modo su utilidad como herramienta de trabajo segura en el laboratorio de fecundación in vitro para la clínica diaria (45).

En este punto merece la pena resaltar el estudio realizado por Cruz *et al.* (46) para valorar la seguridad de los sistemas con tecnología time-lapse incorporada, en el cual utilizaron su programa de ovodonación para minimizar las posibles variaciones debidas a calidad ovocitaria. El objetivo de este estudio era evaluar si el Embryoscope[®], proporcionaba unas condiciones de cultivo iguales o mejores que el incubador convencional. A pesar de que no hay datos disponibles en cuanto a recién nacidos vivos, no se vieron diferencias entre incubadores al comparar tasa de llegada a blastocisto, porcentajes de embriones vitrificados, transferidos y no viables.

Es importante tener en cuenta que en ese estudio la selección embrionaria se basó en la evaluación morfológica de los embriones en los mismos tiempos, tanto en los embriones cultivados en Embryoscope[®] como en el incubador convencional, por lo que la información extra proporcionada por el sistema time-lapse no se tuvo en cuenta a la hora de seleccionar los embriones para la transferencia (46).

En cuanto a la tasa de gestación, no aparecieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, por lo que de esta forma quedaba validado el Embryoscope[®] para su uso clínico. De hecho, a pesar de que la selección de los embriones se basó en los mismos criterios en ambos casos, tanto la tasa de gestación clínica (HCG positiva) como la tasa de gestación evolutiva (sacos gestacionales), tuvieron valores ligeramente superiores en el caso del ESD, seguramente por la ventaja que supone no manipular los embriones (*Figura 6*).

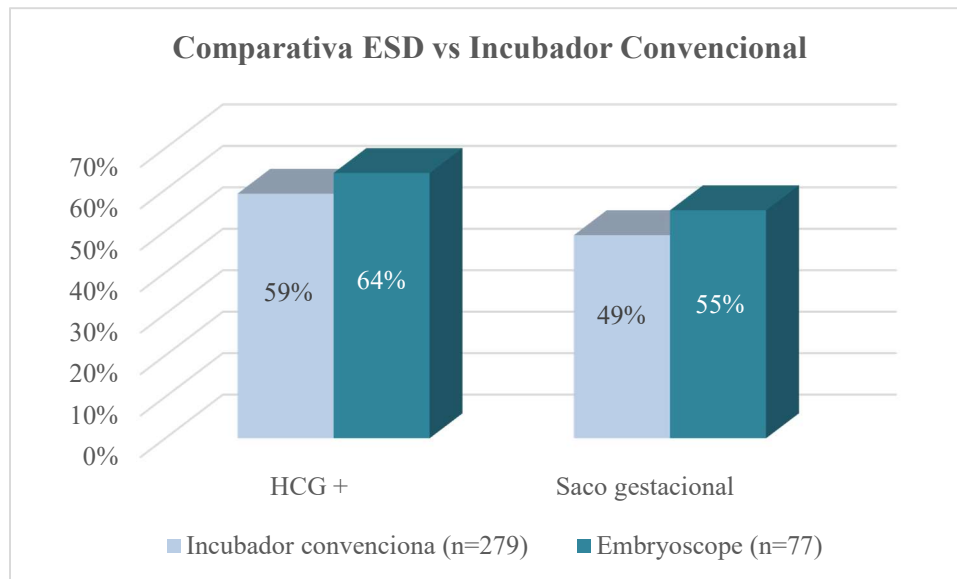


Figura 6: Comparativa entre Embryoscope e incubador convencional (Cruz et al., 2012).

Por tanto, estos resultados confirman que el Embryoscope® proporciona unas condiciones de cultivo estables y controladas, además de ofrecer información más detallada y precisa del desarrollo embrionario desde un punto de vista dinámico.

4.12 Marcadores Cinéticos de Viabilidad Embrionaria

ESTUDIOS SOBRE CINÉTICA EMBRIONARIA

En la última década, numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de marcadores morfocinéticos para la evaluación y selección embrionaria utilizando time-lapse.

Actualmente, ya no debemos hablar del time-lapse como una tecnología nueva. Prueba de eso son las innumerables publicaciones que existen a día de hoy de diferentes grupos, analizando diferentes parámetros, utilizando diferentes dispositivos y con objetivos diferentes. Algunos de ellos han utilizado la tasa de llegada a blastocisto como resultado final para hacer diferentes comparativas (47-51), mientras que otros han basado sus resultados en tasa de implantación e incluso de gestación (52-56).

Sin duda el time-lapse se ha convertido en los últimos años en una tecnología prometedora que ha despertado el interés de muchos investigadores. Además, es

importante señalar que no sólo se trata de una tecnología con una gran cantidad de estudios previos sino también que se trata de una tecnología en auge que despierta el interés de muchos grupos diferentes distribuidos en todo el mundo y en cuyo campo no dejan de aparecer nuevas publicaciones y pequeños avances y aportaciones cada día (57-60).

Por ello, no podemos mencionar todos los estudios y publicaciones desarrolladas en este campo y vamos a centrarnos en las más relevantes, especialmente en aquellas que se han centrado en el desarrollo o posterior validación de algoritmos con un tamaño muestral considerable.

- **Meseguer *et al.* (2011)**

En 2011, Meseguer y colaboradores (61) presentaron gran cantidad de datos respecto a embriones transferidos utilizando análisis con time-lapse, pudiendo correlacionar parámetros morfocinéticos con tasa de implantación y gestación.

En este estudio identificaron los tiempos precisos de numerosos parámetros morfocinéticos, definiendo el tiempo de división como el tiempo exacto en el que las nuevas blastómeras se separan completamente por membranas claramente definidas. De este modo analizaron la primera división como t_2 , la segunda división a 3 células como t_3 , la tercera como t_4 y la cuarta como t_5 . Además, evaluaron parámetros relacionados con la duración de los ciclos celulares, definiendo el segundo ciclo celular (cc_2) como el tiempo que el embrión permanece en 2 células (t_3-t_2) y la segunda sincronía (s_2) como el tiempo que transcurre de 3 a 4 células (t_4-t_3).

Para el análisis de los tiempos se trabajó con cuartiles para tener de cada variable 4 rangos de tiempo representados por el mismo número de embriones, comparando tasa de implantación entre cuartiles y estableciendo rangos óptimos teniendo en cuenta los dos cuartiles con mayor probabilidad de implantación.

En este estudio se identificaron tres fenómenos relacionados con un menor potencial de implantación del embrión, considerándose como criterios de exclusión a la hora de ser seleccionados para transferencias. El primero de ellos, y que solamente se

puede detectar gracias a la tecnología del time-lapse, es la división abrupta de 1 a 3 células (34). El segundo se refiere al tamaño de las blastómeras tras la primera división. Sus resultados mostraron que la asimetría de las células en un embrión de 2 células, refiriéndose como tal a una diferencia de tamaño mayor del 25% entre ambas, tiene un efecto negativo en su capacidad de implantación. Y por último hacen referencia a la multinucleación cuando el embrión tiene 4 células. La presencia de una sola blastómera multinucleada tiene efectos importantes en cuanto a la tasa de implantación del embrión analizado, por lo que se considera también un criterio de exclusión (62).

A partir de los resultados obtenidos en sus estudios, el grupo de Meseguer (61) se planteó como siguiente objetivo el diseño de un modelo multivariable para predecir la implantación basado en el análisis de la morfocinética por time-lapse. El modelo definió 3 variables; t5 seguido por cc2 y s2 como aquellas variables más relevantes relacionadas con la implantación (*Figura 7*).

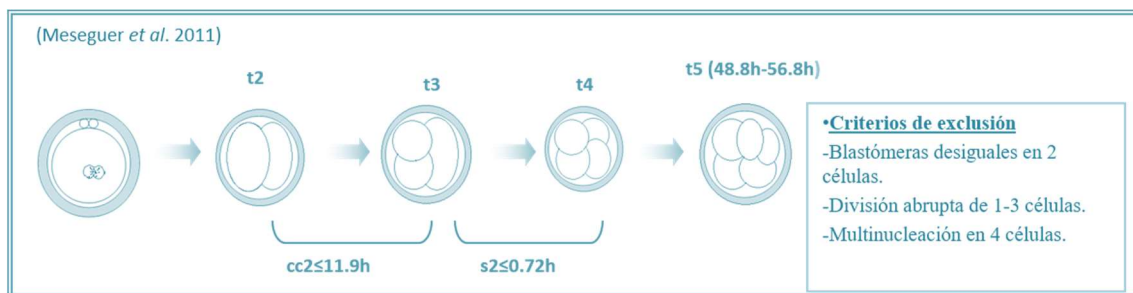


Figura 7: Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Meseguer et al., 2011).

Por lo tanto, con los criterios de exclusión definidos previamente y las variables más relevantes en cuanto al potencial de implantación, publicaron el primer algoritmo de morfocinética (*Figura 8*).

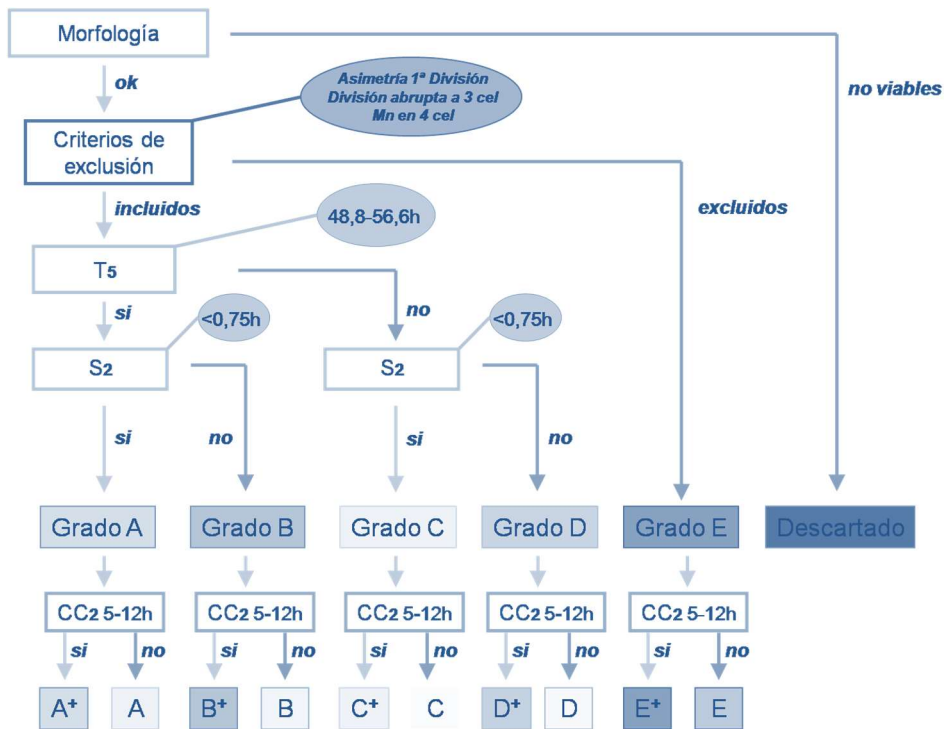


Figura 8: Algoritmo de selección embrionaria (Meseguer et al., 2011).

o **Meseguer et al. (2012)**

Meseguer et al. (63) llevaron a cabo uno de los mayores estudios retrospectivos, comparando tasa de embarazo entre incubador convencional y un incubador con time-lapse (Embryoscope®). Los resultados obtenidos, tras aplicar los factores de confusión que fueron relevantes, mostraron una mejora relativa del 20% en la tasa de embarazo en el incubador con time-lapse frente al convencional. La tasa de embarazo por ciclo iniciado era de un 44.9%, por lo que una mejora relativa de un 20% implica que si esos ciclos hubiesen sido cultivados en el incubador con time-lapse sería de un 53,9%, es decir, una mejora absoluta de un 9%.

o **Hashimoto et al. (2012)**

El grupo de Hashimoto (64) llevó a cabo un estudio en el cual se tomaban 6 imágenes de los embriones por hora durante cinco días utilizando el Biostation CT® (Nikon Corporation, Japan) o un incubador con sistema time-lapse (MCOK-5M [RC]; Sanyo Electric Co., Ltd. Japan). Sus resultados muestran que aquellos embriones capaces de

completar la segunda y tercera división más rápido tenían un desarrollo mejor que embriones con patrones de división más lentos (*Figura 9*).

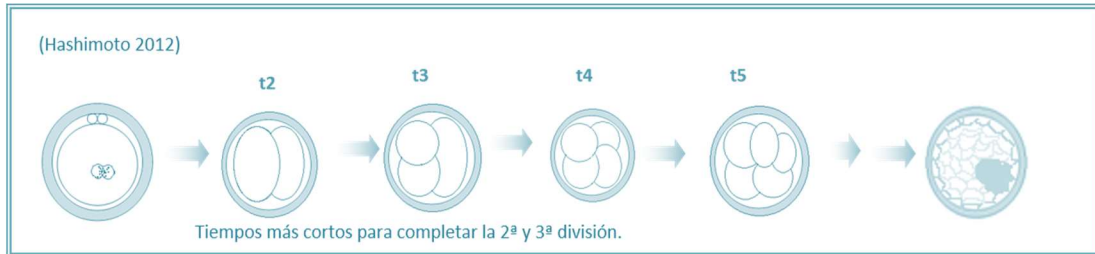


Figura 9: Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Hashimoto et al., 2012).

○ **Dal Canto et al. (2012)**

Dal Canto y colaboradores (65) también vieron que las divisiones celulares tempranas podían relacionarse con la capacidad de un embrión de evolucionar a blastocisto e implantar. Observaron patrones de división similares hasta 6 células en embriones capaces de evolucionar hasta blastocisto y destacaron la importancia de los tiempos en los cuales los embriones alcanzaban estadios de 7 y de 8 células. Al analizar el potencial de implantación, vieron que aquellos embriones que implantaban alcanzaban las 8 células antes que aquellos que no implantaban. Con estos resultados, concluyeron que las divisiones de dos a ocho células ocurren antes en embriones con capacidad de desarrollarse a blastocisto y de implantar correctamente (*Figura 10*). Una vez más, este estudio confirma que la evaluación embrionaria en día 2-3 de desarrollo es crucial para realizar una evaluación precisa y acertada.



Figura 10: Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Dal Canto 2012).

○ **Cruz et al. (2012)**

Utilizando el algoritmo desarrollado por Meseguer (53), que se basa también en los tiempos exactos de fenómenos que ocurren en los estadios tempranos, Cruz et al. (47) llevaron a cabo el mayor análisis de blastocistos utilizando time-lapse para demostrar asociaciones entre algunos parámetros cinéticos en estadios tempranos y la capacidad de los embriones de llegar hasta estadio de blastocisto. En este estudio se comparó la tasa de llegada a blastocisto y la calidad morfológica de embriones que habían sido clasificados basándose en el algoritmo morfocinético (Figura 11). Con los resultados obtenidos concluyeron que los tiempos exactos de determinados parámetros de estadios tempranos son una herramienta que permite predecir la formación de los blastocistos y su calidad.

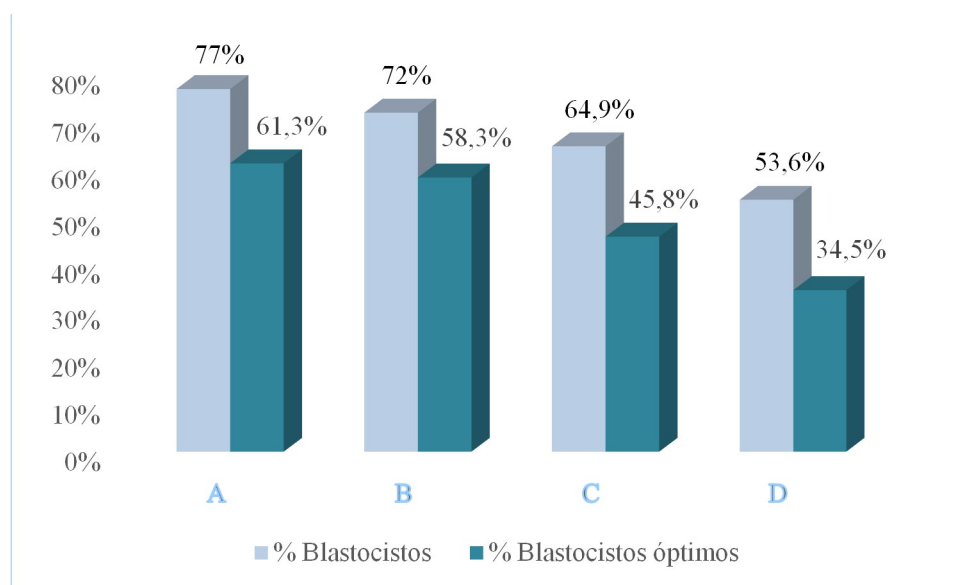


Figura 11: Tasa de blastocisto y de blastocisto óptimo en cada categoría (Cruz et al., 2012).

○ **Rubio et al. (2014)**

Los resultados publicados por Meseguer (53) se confirmaron posteriormente con un estudio prospectivo publicado por Rubio et al. (66). En este estudio, 405 pacientes fueron incluidas en el grupo control en el cual la selección embrionaria se basó únicamente en

morfología y 438 pacientes en el grupo estudio en el cual la selección se basó en el algoritmo (53).

La tasa de implantación y de gestación fueron más elevadas en el grupo de estudio que en el control (*Figura 12*). Los autores concluyeron que las variables morfocinéticas incluidas en el algoritmo nos permiten detectar aquellos embriones con mayores probabilidades de implantación (66).

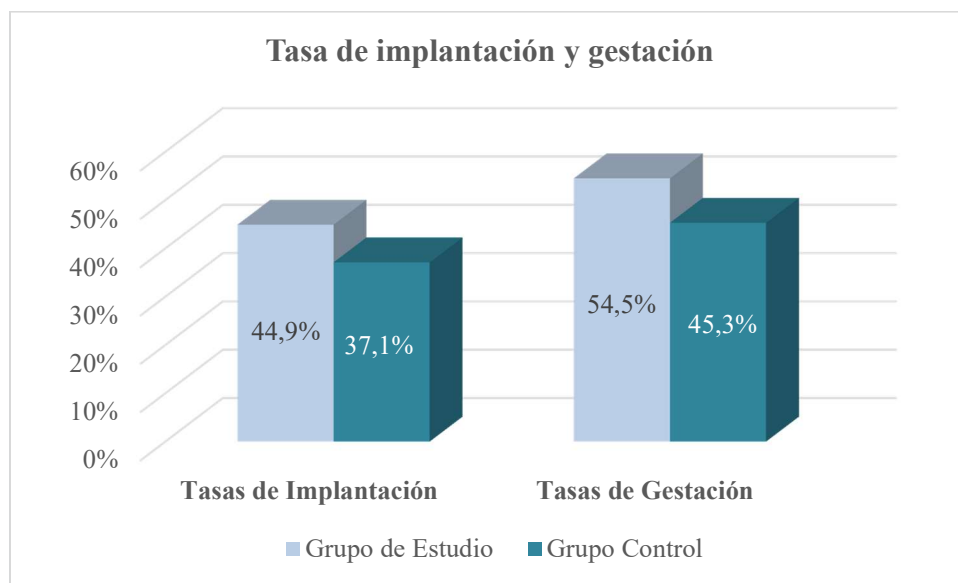


Figura 12: Tasa de implantación y de gestación en el grupo de estudio y en el control (Rubio *et al.*, 2014).

○ **Basile *et al.* (2015)**

Basile y colaboradores (52) continuaron el estudio de Meseguer y publicaron una versión mejorada del algoritmo, analizando una base de datos con un incremento en el número de embriones, procedentes de 4 clínicas diferentes. El estudio se dividió en dos fases. La primera fase consistió en la elaboración del algoritmo, teniendo en cuenta datos morfocinéticos de 754 embriones de implantación conocida que habían sido seleccionados para transferir basándose solamente en criterios morfológicos.

El nuevo algoritmo incluía las variables t3, cc2 y t5 en combinación con la morfología y los criterios de exclusión definidos por Meseguer (53) para clasificar los embriones en base a su potencial de implantación (*Figura 13*).

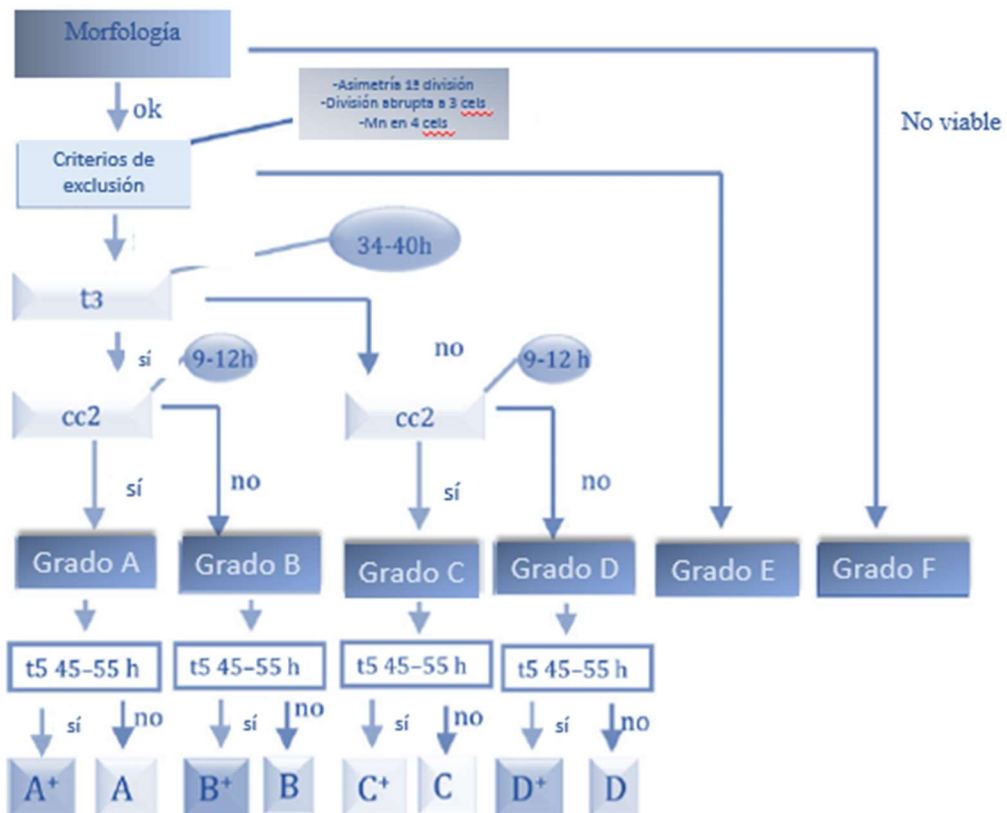


Figura 13: Algoritmo de selección embrionaria (Basile et al., 2015)

Durante la segunda fase del estudio, se aplicó este algoritmo en embriones de un grupo diferente de pacientes. Teniendo en cuenta solamente los ciclos con implantación conocida (n=1137), se observó un descenso significativo en la tasa de implantación a medida que disminuían las categorías desde la A a la E (“A”: 32 %, “B”: 28%, “C”: 26,25%, “D”: 20,19% y “E”: 17%).

○ **Motato et al. (2015)**

Motato y colaboradores (67) llevaron a cabo un estudio con el objetivo de identificar, mediante la morfocinética los eventos más determinantes dentro del desarrollo embrionario que permitan predecir la formación del blastocisto.

En un primer momento definieron el tiempo de formación de mórula (tM) y s3 (t8-t5) como las variables más predictivas para alcanzar este estadio. Sin embargo, no observaron

que estas variables tuvieran una capacidad de predicción significativa al centrarse en la tasa de implantación.

En una segunda fase del estudio, debido a la falta de relación entre las variables anteriormente descritas con el potencial de implantación, se identificaron nuevos parámetros mediante la comparación de los blastocistos transferidos que implantaron con los que no implantaron (KID = 832).

Se observó una diferencia significativa en los embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto expandido (tBE) con un tiempo óptimo $<112,9$ horas y un tiempo de s3 (t8-t5) $\leq 5,67$ horas. Por tanto y utilizando estos datos, propusieron un nuevo modelo jerárquico de clasificación que subdivide los blastocistos transferidos en cuatro categorías de la A a la D (Figura 14) en función de la tasa de implantación, siendo A los que más implantan.

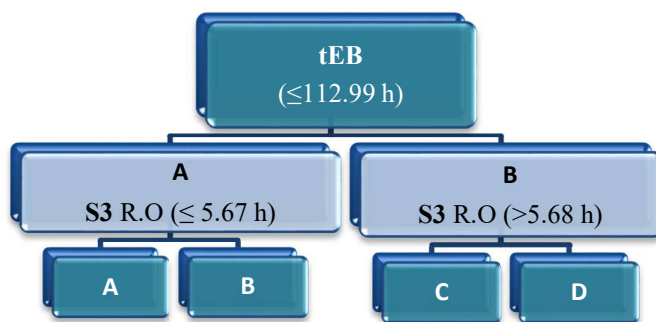


Figura 14: Variables más relevantes para la selección de blastocistos con mayor potencial de implantación (Motato et al., 2015).

○ **Goodman et al. (2016)**

Otro estudio randomizado relevante fue publicado por el grupo de Goodman mostrando resultados similares, a pesar de que las diferencias obtenidas no fueron estadísticamente significativas (68). Uno de los puntos fuertes de este estudio fue que, a diferencia del estudio de Rubio (66) en el que los dos grupos de estudio fueron cultivados en condiciones diferentes (incubador convencional vs time-lapse), en este caso las condiciones de cultivo fueron las mismas. El objetivo en este caso fue demostrar si los parámetros morfocinéticos mejoraban los resultados finales comparando los casos en los que los embriones se evaluaban en un único momento y solamente basándose en la

morfología con los casos en los que la selección embrionaria se hacía con ayuda de la morfocinética.

Como hemos mencionado anteriormente, las diferencias obtenidas no fueron significativas, sin embargo, sí que se observó un aumento en la tasa de gestación y de implantación utilizando la morfocinética para complementar a la morfología. Además, mostraron algunos parámetros que fueron relevantes en cuanto a la selección de embriones con un mayor potencial de implantación (Tabla 1). Por ello, los autores concluyeron que en este campo deben ampliarse los estudios para confirmar sus resultados.

	Implantación (n=140)	No Implantación (n=156)	p
Multinucleación	22,90%	35,30%	0,02
División directa asimétrica	4,30%	5,70%	<0,01
Divisiones irregulares	8,60%	14,70%	0,11
cc2<5h	96%	88,80%	0,05
t5 (45.8-57h)	73,40%	68,10%	0,35
s2 (0-1h)	80,70%	66,40%	0,02
s3 (1,4-7h)	62,10%	62,30%	0,98
tSB < 100h	75,70%	53,80%	<0,01

Tabla 1: Estudio de la correlación de diferentes parámetros morfocinéticos con la capacidad de implantación (Goodman et al., 2016).

4.13 Cultivo prolongado

El cultivo prolongado de los embriones hasta el estadio de blastocisto surgió como una posible estrategia para realizar transferencias electivas de un solo embrión, ya que a priori se mejora la selección del embrión porque tiene mayor capacidad evolutiva y, por tanto, un potencial de implantación más elevado. En una revisión publicada recientemente por Blake y colaboradores (69) concluyeron que existían diferencias significativas en cuanto a tasa de recién nacido a favor de las transferencias en blastocisto. Uno de los motivos de estos resultados es que existe una mejor selección de los embriones para

transferir con el cultivo prolongado ya que la mayor parte de los embriones anormales no son capaces de desarrollarse hasta estadios más avanzados. Además, no podemos olvidarnos que la transferencia embrionaria en D5-6 de desarrollo se parece más a la ventana fisiológica natural ya que sería el estadio en el que el embrión llegaría al útero en un ciclo natural.

En una revisión reciente del grupo de Glujovsky (70) señalaron que hay una pequeña diferencia significativa en cuanto a tasa de gestación a favor de transferencias en estadio de blastocito frente a estadios en células. Sin embargo, la tasa de gestación clínica acumulada es mayor en estadio de células. La explicación más evidente de estos resultados es que el número de transferencias canceladas son menores en ciclos con transferencias en día 2-3 de desarrollo, congelándose mayor número de embriones en día 2-3, teniendo, por tanto, mayor número de ciclos de transferencias congeladas, permitiendo más oportunidades.

A pesar de que la tasa de implantación en la mayoría de los laboratorios de fecundación in vitro son mayores cuando las transferencias se realizan en blastocisto, hay que tener en cuenta también los posibles inconvenientes del cultivo prolongado como un mayor coste económico implicado, el riesgo de cancelaciones de ciclos y los posibles efectos asociados a cualquier tratamiento de fecundación in vitro debido a la exposición a condiciones in vitro a la que se ven sometidas los embriones pudiendo aparecer problemas epigenéticos.

La búsqueda de marcadores tempranos capaces de predecir la capacidad de formación de blastocisto puede ayudar a compensar la información obtenida, optimizando los criterios de selección.

Muchos de los estudios mencionados en el apartado anterior coinciden en que la selección embrionaria puede realizarse en día 3 de desarrollo utilizando marcadores capaces de predecir la capacidad de dichos embriones de alcanzar el estadio de blastocisto y reduciendo los problemas asociados al cultivo prolongado.

Existe creciente interés por analizar la gran cantidad de información que nos proporcionan los nuevos sistemas con la tecnología time-lapse. A pesar de que el time-lapse representa un gran avance en el campo de la reproducción asistida en cuanto al conocimiento del desarrollo embrionario, lo cierto es que el análisis de toda esta información es muy complejo y requiere de un equipo altamente cualificado capaz de

interpretar y sacarle utilidad a la información proporcionada. Además, el tiempo requerido por los embriólogos para analizar toda esta información proporcionada en el limitado tiempo al que nos vemos sometidos en el trabajo clínico diario, resulta en ocasiones excesivo teniendo en cuenta la carga de trabajo del día a día (71).

Teniendo en cuenta estos argumentos, se desarrolló la primera plataforma automática de análisis de imágenes obtenidas a través de time-lapse: Eeva[®] (Early Embryo Viability Assessment). Esta tecnología resuelve muchos de estos problemas con la introducción de la automatización en la evaluación embrionaria.

4.14 Estudios utilizando el sistema automático Eeva[®]

- **Wong *et al.* (2010)**

Wong y colaboradores (72) presentaron el primer estudio utilizando el sistema Eeva[®]. Se trata de un estudio en el que el material de partida eran cigotos que habían sido vitrificados a las 12-18h post-inseminación. Se realizó un análisis de la morfocinética de dichos embriones y se estudió también la expresión génica.

Los embriones que alcanzaron el estadio de blastocistos fueron clasificados como normales, mientras que aquellos que se bloquearon en estadios previos fueron considerados anormales.

En el estudio se incluyeron 242 embriones. Cien de ellos se dejaron en cultivo hasta estadio de blastocisto y los otros 142 se destinaron a análisis genético en diferentes estadios.

Se estudiaron diferentes parámetros de estos embriones, entre ellos: tamaño de las blastómeras, grosor de la zona pelúcida, porcentaje de fragmentación y duración de los primeros ciclos celulares. De estos parámetros estudiados, tres de ellos mostraron una correlación con la llegada a blastocisto: duración de la primera citocinesis (último paso de la mitosis en el que se separan las dos blastómeras), intervalo entre el final de la primera mitosis y el principio de la segunda y el intervalo entre la segunda y tercera mitosis. Los embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto podían predecirse con una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93%, con unos valores de 0-33min

(primera mitosis), 7.8-14.3h (tiempo entre primera y segunda mitosis) y 0-5.8h (tiempo entre segunda y tercera mitosis) (Figura 15).

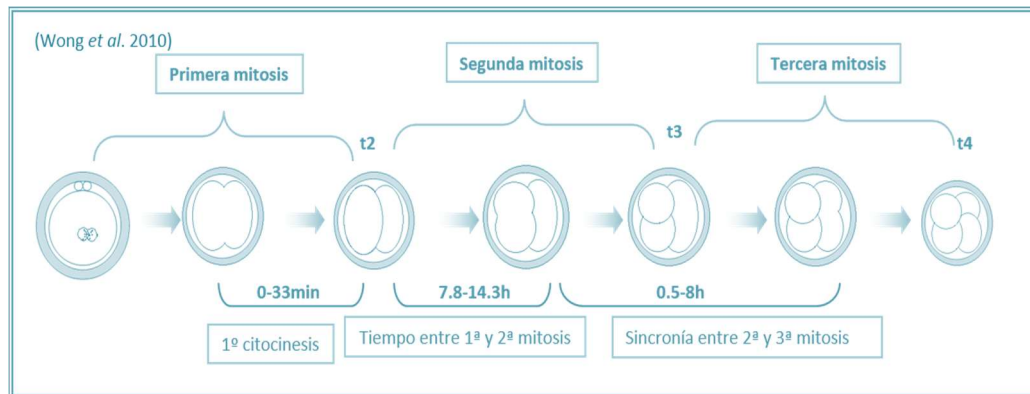


Figura 15: Variables más relevantes para la selección de embriones con mayor potencial de implantación (Wong et al., 2010).

Con el fin de validar este método de predicción de blastocisto, desarrollaron un algoritmo para la detección automática de las primeras divisiones celulares hasta estadio de 4 células basado en un sistema de análisis de imagen. Para comprobar el correcto funcionamiento de este modelo automático compararon las anotaciones automáticas con las manuales de 14 embriones observando valores prácticamente iguales en ambos casos.

En este mismo estudio, correlacionaron los patrones de citocinesis con los perfiles de expresión génica, observando que las divisiones aberrantes iban acompañadas por la reducción en la expresión de genes claves en la citocinesis.

También vieron que la reabsorción de fragmentos en estadio de dos células, raramente se producía en embriones anormales mientras que sí que tenía lugar en muchos embriones normales. Todas estas conclusiones fueron obtenidas a partir de embriones que finalmente no se transfirieron por lo que, aunque el trabajo aporte gran cantidad de información, no presentan datos acerca de la tasa de implantación.

- **Conaghan et al. (2013)**

Conaghan y colaboradores (73) llevaron a cabo un estudio prospectivo en cinco clínicas de Estados Unidos. El objetivo de este grupo fue evaluar el sistema automatizado

del Eeva[®] y determinar la utilidad de esta nueva plataforma automática para los embriólogos.

En el análisis final contaron solamente con pacientes que tenían embriones en D5, con resultados conocidos y con información de imágenes que consistían en una fase de desarrollo con 45 pacientes (292 embriones) y una fase de “test” con 74 pacientes (941 embriones).

En la fase de desarrollo, tres embriólogos revisaron los videos anotando los tiempos de las primeras divisiones celulares. Se construyó un árbol de clasificación para determinar los rangos óptimos de P1 (duración de la primera citocinesis) , P2 (t3-t2) y P3 (t4-t3) como parámetros más relevantes para la predicción de blastocisto. En esta fase vieron que los embriones cuyos valores de P2 se encontraban entre 9.33-11.45h, y aquellos con valores de P3 entre 0-1.75h tenían una probabilidad más elevada de alcanzar el estadio de blastocisto.

Con los resultados obtenidos concluyeron que la combinación de morfología y la clasificación aportada por Eeva[®] mejoraba la selección embrionaria, permitiendo a los embriólogos discriminar mejor aquellos embriones con menos posibilidades de alcanzar el estadio de blastocisto y destacan especialmente la utilidad a la hora de seleccionar embriones dentro de una cohorte con buena morfología. En este estudio se vio que utilizando la clasificación de Eeva[®], los embriólogos eran capaces de mejorar su capacidad para identificar embriones no viables.

Otro punto importante es que la clasificación de Eeva[®] permitía aumentar la consistencia entre embriólogos y la selección de embriones para transferencia. Por lo tanto, los resultados obtenidos y presentados en este estudio constituyeron un paso importante en la validación del algoritmo del Eeva[®].

- **Kelly *et al.* (2014)**

Kelly y colaboradores (74) también utilizaron el sistema Eeva[®]. En este caso no se centraron en la clasificación automática proporcionada por el software, sino que basaron su estudio en la detección gracias a este sistema de time-lapse, de fenómenos anormales en el desarrollo embrionario.

Analizaron retrospectivamente 651 videos de embriones incubados en el sistema Eeva® e identificaron y caracterizaron cuatro fenómenos dinámicos atípicos que asociaron con un menor potencial de llegada a blastocisto (*Figura 16*).

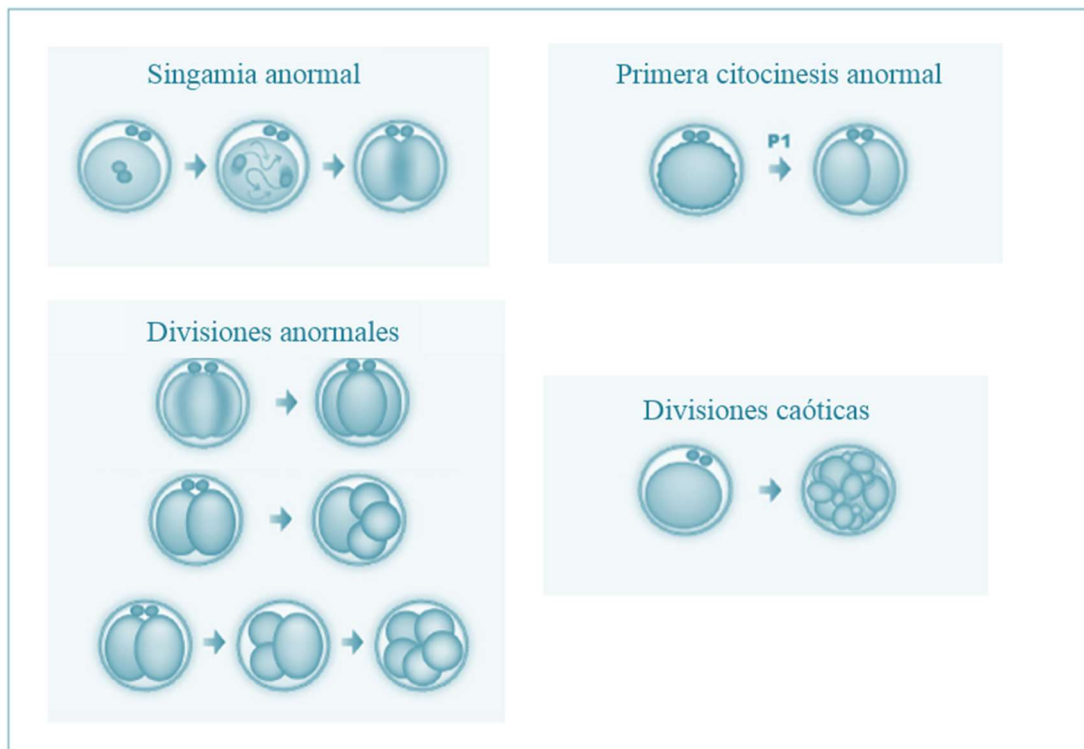


Figura 16: Fenómenos dinámicos atípicos asociados con menor potencial de llegada a blastocisto (*Kelly et al., 2014*).

- Singamia anormal: este fenotipo se define por la presencia de desórdenes en el movimiento de los PN dentro del citoplasma, con movimientos irregulares antes de su desaparición.
- Primera citocinesis anormal: se caracteriza por movimientos irregulares en la membrana de la blastómera antes y durante su división.
- Divisiones anormales: este fenotipo se define como la división de una blastómera en dos o más células.
- Divisiones caóticas: este fenotipo se define como un comportamiento irregular de las blastómeras así como aparición de muchas blastómeras irregulares y un elevado porcentaje de fragmentos.

- **VerMilyea et al. (2014)**

En el estudio de VerMilyea y colaboradores (75) estudiaron en primer lugar la tasa de implantación y de gestación en 331 embriones de implantación conocida analizados con un primer algoritmo que clasificaba los embriones en dos categorías: “high” y “low”. Observaron una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a tasa de implantación y de gestación entre ambos grupos. (Figura 17).

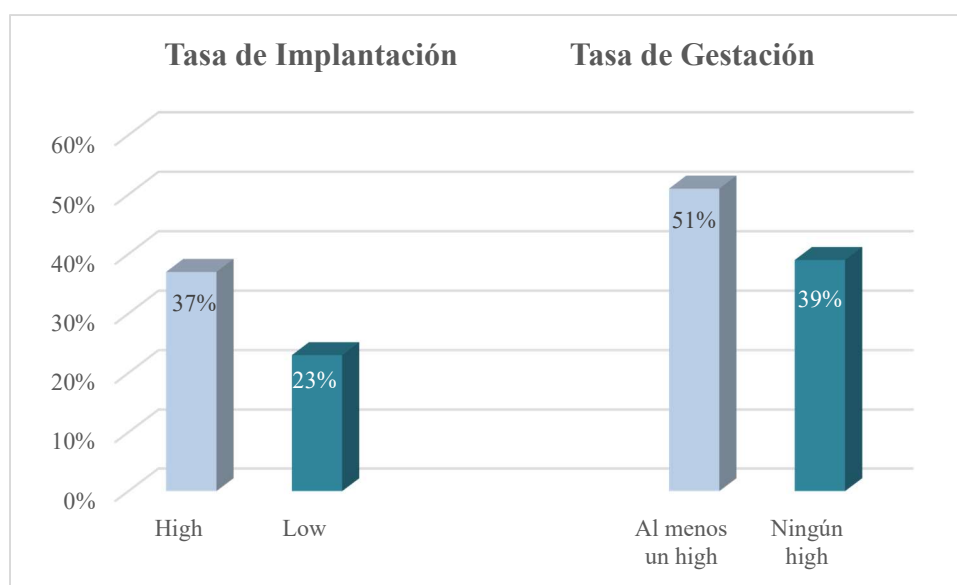


Figura 17: Comparativa entre tasa de implantación y gestación de transferencias utilizando el algoritmo de dos categorías (VerMilyea et al., 2014).

Debido a que, con la utilización de este primer algoritmo, el 24% de los pacientes solamente tenían embriones clasificados como “low” propusieron un segundo algoritmo ofrecido por el sistema Eeva[®] que introduce una categoría intermedia (“medium”). De esta manera el porcentaje de embriones que solamente tenían embriones “low” disminuyó de un 24 a un 9%. La tasa de implantación y de gestación fueron estudiadas en las diferentes categorías observando mayores diferencias entre la tasa de gestación de embriones “high” y “low” al introducir la categoría intermedia (Figura 18).

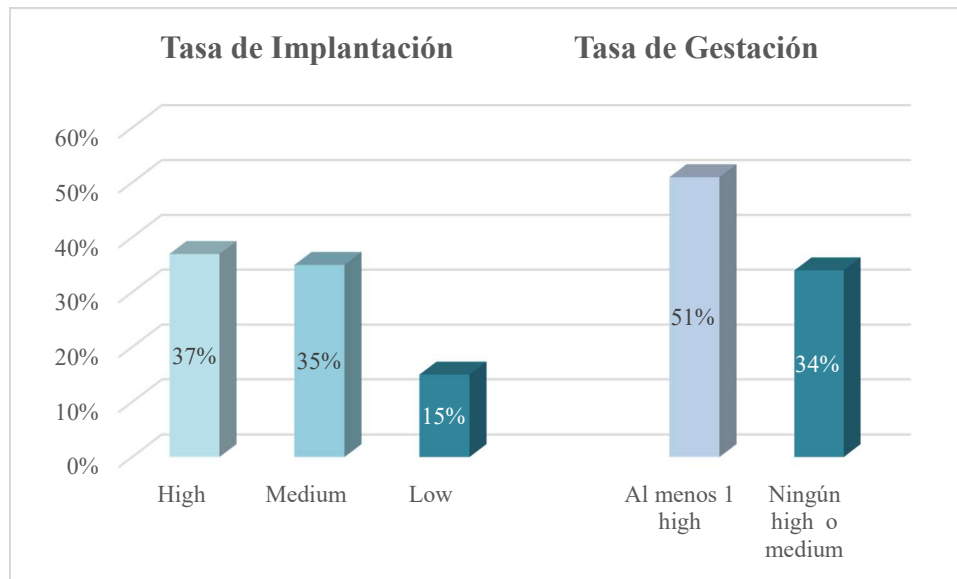


Figura 18: Comparativa entre tasa de implantación y gestación de transferencias tras la introducción de una tercera categoría en el algoritmo (VerMilyea et al., 2014).

○ **Diamond et al. (2015)**

Diamond y colaboradores (76) también se centraron en el algoritmo del Eeva[®], en este caso comparando la predicción de llegada a blastocisto de cinco embriólogos diferentes basándose solamente en morfología y después suplementando esa información morfológica con los datos obtenidos por el sistema Eeva[®]. Observaron una mejora en cuanto a especificidad y valores de predicción positivos. Debido a que el Eeva[®] ayuda a distinguir falsos positivos, es decir embriones con buena morfología que luego no implantan, también contribuyó a disminuir la sensibilidad (Figura 19).

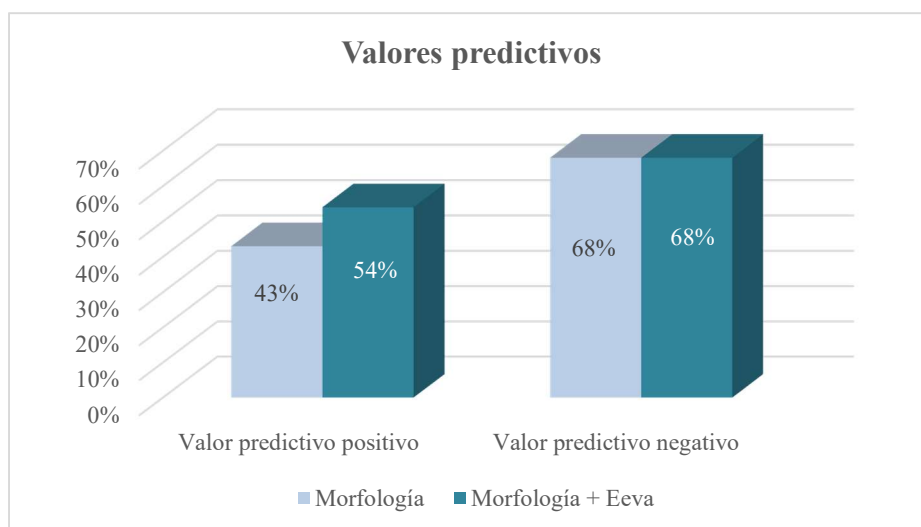


Figura 19: Comparativa en los valores predictivos entre la selección basada en morfología o combinando morfología y Eeva® (Diamond et al., 2015).

Además, los valores de Odds Ratio (OR) eran mayores al combinar la morfología y la clasificación Eeva® en la selección embrionaria, justificando por tanto la utilidad de este software. En un análisis posterior se centraron solamente en aquellos embriones con una buena morfología con el objetivo de ayudar a discriminar mejor entre este tipo de embriones. En este subgrupo también se vio un valor mayor de OR (Figura 20).

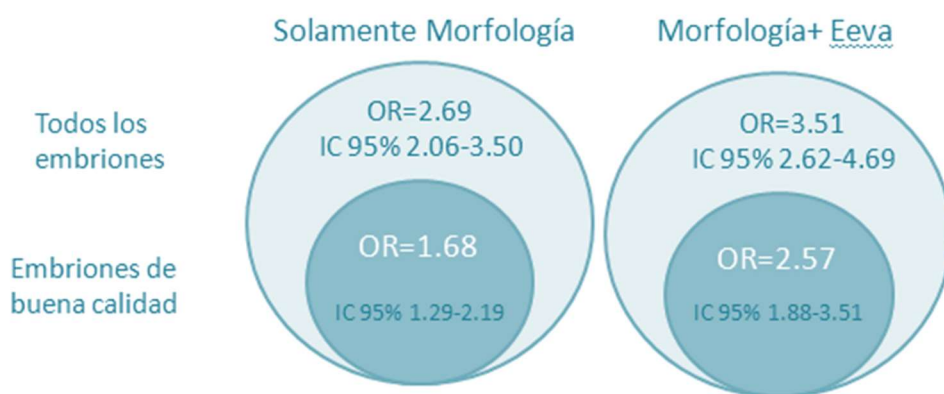


Figura 20: Análisis de OR entre la selección basada en morfología o combinando morfología y Eeva® separando embriones de buena calidad (Diamond et al., 2015).

- **Kieslinger *et al.* (2016)**

Kieslinger y colaboradores (77) llevaron a cabo un estudio prospectivo incluyendo pacientes de dos centros diferentes con el objetivo de comparar la tasa de gestación entre embriones cultivados en un incubador con el sistema Eeva® acoplado y otro grupo de embriones cultivados en un incubador convencional. No observaron diferencias significativas en cuanto a tasa de gestación entre grupos. Sin embargo, sí que observaron un aumento en la tasa de gestación en aquellos pacientes a los que se les transfirió al menos un embrión “*high*” o “*medium*” respecto a pacientes con transferencias de embriones clasificados como “*low*”. ($p=0.0043$ “*high*” vs “*low*”, $p=0.018$ “*medium*” vs “*low*”) (Figura 21).

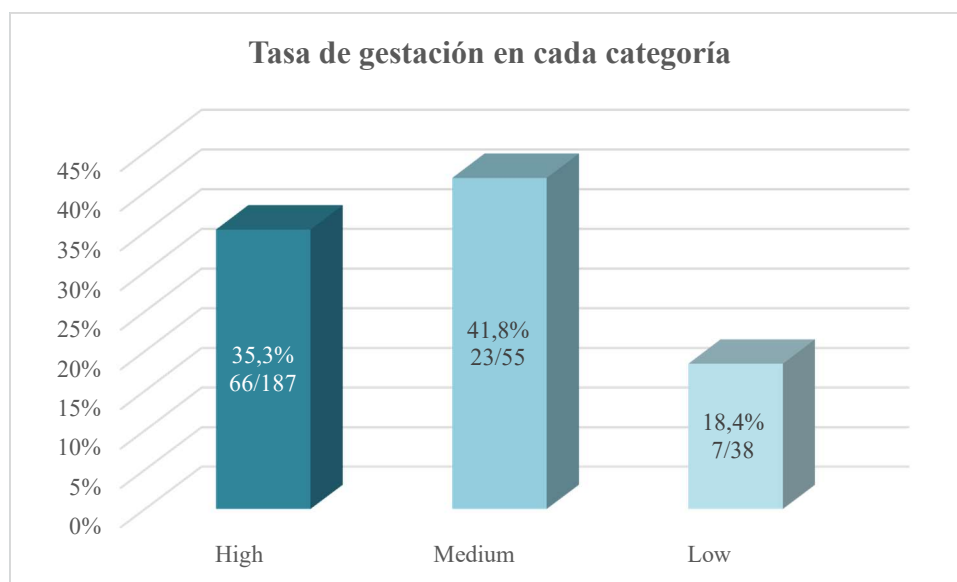


Figura 21: Tasa de gestación en cada categoría Eeva® (Kieslinger *et al.*, 2016).

- **Adamson *et al.* (2015)**

Adamson y colaboradores (55) estudiaron también ciclos en los que el algoritmo proporcionado por el sistema Eeva® se combinó con la evaluación morfológica obteniendo mayor tasa de implantación y de gestación que en los ciclos en los que solamente se utilizó la morfología como criterio de selección.

Se compararon dos grupos de pacientes: uno de ellos incluía pacientes en los que se realizó la transferencia en día 3 utilizando tanto la evaluación morfológica como la

clasificación Eeva[®] para la selección (grupo estudio), y un grupo control en el que la selección embrionaria se basó solamente en morfología.

En el grupo de estudio, los pacientes a los que se les transfirió al menos un embrión clasificado como “*high*” tenían una tasa de implantación y de gestación más elevada que pacientes que solo transfirieron embriones “*low*” (Figura 22).

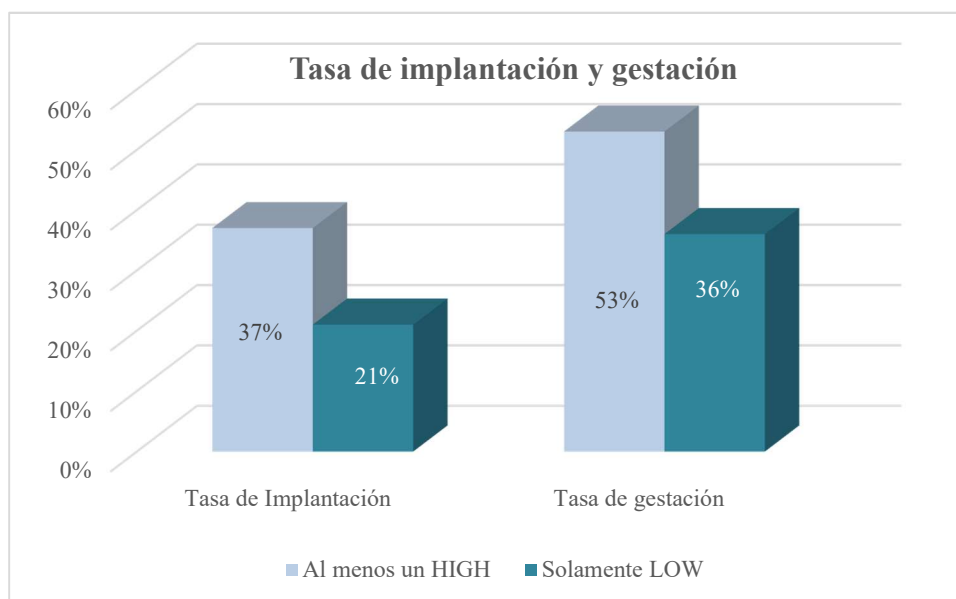


Figura 22: Tasa de implantación y gestación al transferir al menos un embrión “*high*” o solamente embriones “*low*” (Adamson et al., 2015).

Además, observaron que los embriones clasificados como “*high*” comparados con los “*low*” tenían una tasa de implantación significativamente más elevada. En cuanto a los embriones de buena morfología y los que clasificaron como “*mejores*” (embriones A, de 8 células con simetría perfecta) los embriones clasificados como “*high*” también tenían una mayor probabilidad de implantación que los clasificados como “*low*” (Figura 23).

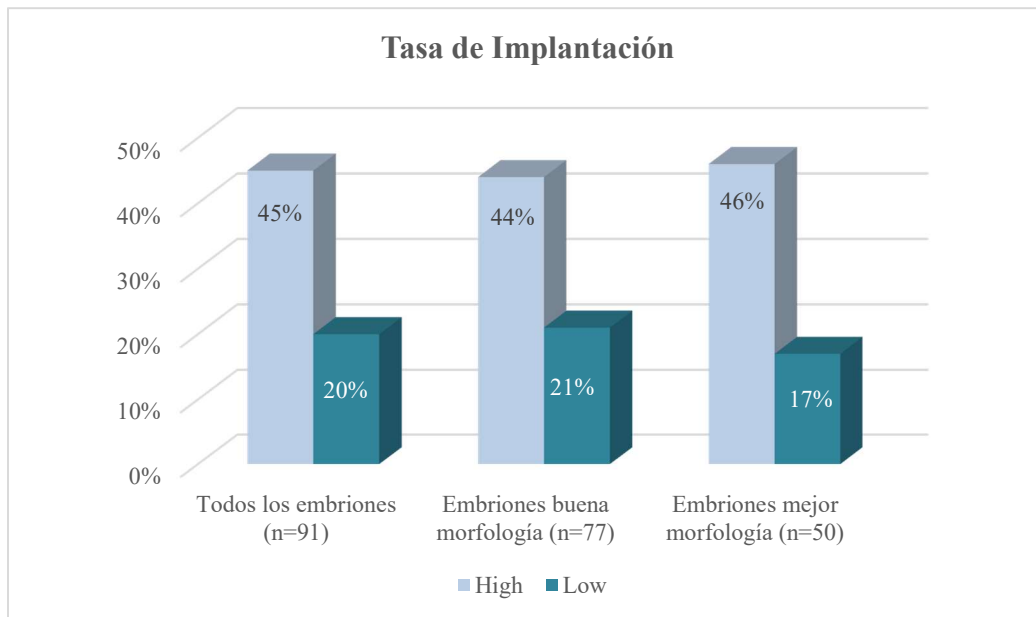


Figura 23: Tasa de implantación distinguiendo la calidad morfológica de los embriones y su clasificación Eeva® (Adamson et al., 2016).

Con estos resultados concluyeron que la combinación de ambos sistemas de evaluación, es decir la evaluación morfológica apoyada con la clasificación morfocinética automática permitía mejorar los resultados finales y poder seguir la línea de la transferencia única con mayores garantías debido a una mejora en la selección del mejor embrión.

○ **Rocafort et al. (2018)**

Rocafort y colaboradores (57) fueron el primer grupo en utilizar el algoritmo del Eeva® en embriones que fueron analizados cromosómicamente. En su estudio distinguieron dos grupos, el grupo control incluía embriones analizados cromosómicamente, seleccionando para transferir embriones euploides evaluados morfológicamente. En el grupo de estudio, los embriones seleccionados para transferir eran embriones euploides que habían sido incubados en un incubador con el sistema Eeva® y por los tanto seleccionados a partir de la clasificación proporcionada por el algoritmo.

Los resultados obtenidos mostraron que las categorías “high” y “medium” podían correlacionarse con unos porcentajes de embriones euploides mayores (Figura 24).

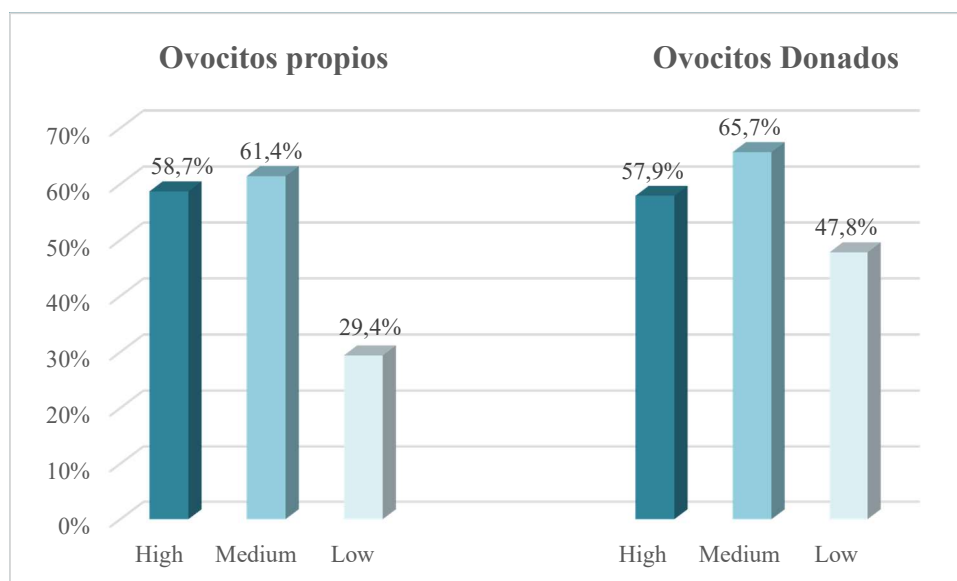


Figura 24: Tasa de embriones euploides según categoría Eeva® en un grupo de pacientes de ovodon and en pacientes de propios (Rocafort et al., 2018).

Realizaron además un análisis muy interesante, calculando tasa de implantación y de gestación en ambos grupos mencionados anteriormente, pero distinguiendo también transferencias en las que los blastocistos habían sido clasificados morfológicamente como buena calidad. En este caso observaron que los mejores resultados se obtenían en el grupo en el que los embriones euploides, además de tener una buena calidad morfológica, tenían una buena clasificación Eeva® (Figura 25).

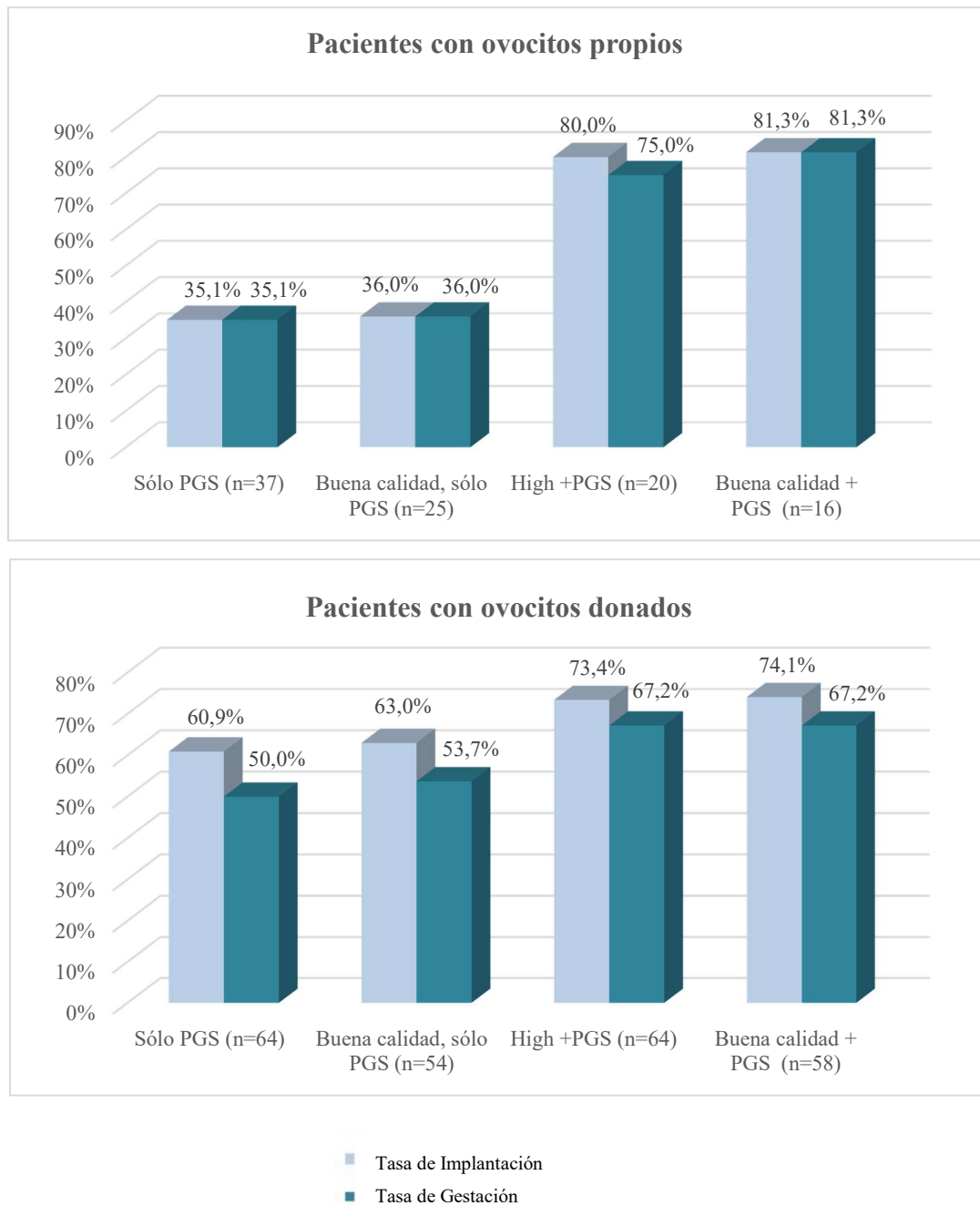


Figura 25: Tasa de implantación y de gestación tras análisis cromosómico en función de la calidad morfológica y Eeva® (Rocafort et al., 2018).

OBJETIVOS

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo Principal

- Validación de los algoritmos Eeva® y Xtend®, determinando si la categorización proporcionada se correlaciona con embriones con mayor potencial y nos pueden servir como criterio de selección embrionaria.

5.2 Objetivos Secundarios

- Correlacionar cada uno de los algoritmos con:
 - Tasa de llegada a blastocisto
 - Tasa de llegada a blastocisto óptimo
 - Tasa de implantación
- Comparar si el cultivo en condiciones de humedad influye en el resultado final del ciclo respecto al cultivo seco.
- Estudiar si existe una correlación entre las categorías del algoritmo Xtend® con el porcentaje de embriones biopsiables y con la probabilidad de los embriones de ser cromosómicamente normales.

MATERIAL Y MÉTODOS



6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño

Este proyecto cumple las leyes gubernamentales españolas de tecnología de Reproducción asistida (14/2006) y cuenta con la aprobación del comité ético de investigación clínica del IVI.

Este trabajo retrospectivo consta de dos partes diferenciadas. La primera de ellas se llevó a cabo en dos clínicas del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI): IVI Valencia y en IVI Madrid y la segunda exclusivamente en IVI Valencia.

La población sujeta a estudio en la primera parte incluye un total de 3002 embriones procedentes de ciclos de donación de ovocitos que tuvieron lugar desde octubre de 2013 hasta enero de 2016.

En la segunda parte del estudio, la población analizada incluye 3001 embriones procedentes de ciclos de donación que tuvieron lugar desde mayo de 2016 hasta agosto de 2019 (dentro de los cuales 1016 fueron estudiados en función del cultivo en humedad o medio seco)

Esta segunda parte también incluye el análisis de 1174 embriones incluidos en el programa de diagnóstico genético preimplantacional.

6.2 Pacientes

Criterios de Exclusión

Independientemente de la calidad embrionaria existen otros parámetros que condicionan la adhesión del embrión al epitelio uterino afectando directa o indirectamente a la receptividad endometrial. Por ello, para la valoración de los resultados clínicos como tasa de implantación, aborto y gestación se establecieron una serie de criterios de exclusión:

- Patología uterina (miomas, adenomiosis, malformaciones uterinas adquiridas o congénitas).

- Endometriosis.
- Hidrosalpinx.
- Historia previa de enfermedades sistémicas o trastornos endocrinos o metabólicos significativos.
- Pérdida gestacional recurrente.
- Administración de medicación concomitante que pueda interferir con los objetivos del estudio.
- Factor masculino severo (< 1 millón de espermatozoides móviles progresivos en el eyaculado) y aquellos que requirieran cirugía para la obtención de espermatozoides.

6.3 Donantes. Estimulación Ovárica

La estimulación ovárica se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y niveles moderados de gonadotrofinas desde el primer día de estimulación, sin ningún tratamiento adyuvante. Se administró una dosis diaria de antagonistas de GnRH (0.25mg) cuando el folículo dominante tenía un diámetro de 13-14mm. Cuando al menos uno de los folículos tenía un diámetro de 17mm, se desencadenaba la ovulación con 0.1mg de triptorelina (Decapeptyl Mensual®, Ipsen Pharma, Barcelona; España) administrado de manera subcutánea.

6.4 Receptoras: Preparación Endometrial

Para la preparación del endometrio en las receptoras de gametos se utilizó terapia hormonal sustitutiva, consistente en la administración de estrógenos (valerianato de estradiol, VE) desde el primer día de ciclo menstrual.

El VE se administró indistintamente por vía oral (6 mg/día) o transdérmica (2 parches de 75 mg/48 horas). Tras 7-10 días de tratamiento estrogénico se llevó a cabo una ecografía transvaginal con el objetivo de medir el grosor endometrial a unos 1,5-2 cm del fondo uterino en un corte longitudinal del mismo y corroborar que se encontraba en fase proliferativa con el aspecto claramente trilaminar y con un grosor superior a 6mm para

poder llevar a cabo la donación (78,79). El mismo día de la donación, por la noche, se añadió el tratamiento con progesterona vaginal micronizada (Progeffik, Laboratories Effik S.A., Madrid, España) a dosis de 400mg/12 horas, continuando con esta dosis al menos hasta el resultado del embarazo (80).

En caso de que la receptora tuviera ciclos ováricos menstruales, fue necesario suprimir la función ovárica para tener el control del ciclo evitando una ovulación prematura. La supresión de la función ovárica se consigue con la inyección de una dosis única de 3,75 mg de acetato de triptorelina, un agonista de la GnRH de liberación prolongada (Decapeptyl Mensual®, Ipsen Pharma, Barcelona; España), en la fase lútea media del ciclo previo, sobre el día 18-22 de ciclo.

En caso de sangrado durante la fase estrogénica se canceló el ciclo de la receptora por disminuir las posibilidades de implantación y se reinició posteriormente un nuevo ciclo de terapia hormonal sustitutiva.

Cuando el test de embarazo fue positivo, la administración de valerianato de E₂ y de progesterona micronizada continuó hasta 80 días después del test de embarazo.

6.5 Estimulación Ovárica en Pacientes

La estimulación ovárica se llevó a cabo bajo un protocolo de antagonistas de la GnRH (ganirelix o cetrorelix, a dosis de 0,25mg/día), con dosis convencionales de hormona folículo estimulante (FSH) con o sin menotropina (hMG) asociada (150-225 UI de FSH +/- 75 UI de hMG) desde el primer día de la estimulación.

En el ciclo menstrual previo a la estimulación se llevó a cabo una preparación del ovario con Valerianato de Estradiol (VE), 4mg/día por vía oral, desde la fase lútea media hasta el día de inicio de la estimulación ovárica. Cuando 3 o más folículos alcanzaron un tamaño de 17mm, se desencadenó la ovulación con 0.2 mg de triptorelina o 6500 UI de hCG.

6.6 Punción Ovárica y Obtención de los Ovocitos

La punción folicular se llevó a cabo 36 horas después de administrar Decapeptyl para completar la maduración ovocitaria. Se realizó bajo sedación, mediante ecografía guiada, y en un quirófano contiguo al laboratorio de FIV, con el fin de que el traslado de los tubos al laboratorio fuera lo más rápido posible. Los tubos con el líquido folicular se mantuvieron a 37^a C mediante bloques térmicos calefactados. Una vez en el laboratorio se siguieron los siguientes pasos:

- Verter el líquido folicular sobre placas petri precalentadas.
- Buscar los ovocitos mediante inspección directa del líquido de la punción, utilizando el objetivo de menor aumento, con el fin de obtener un mayor campo visual.
- Una vez localizado el ovocito, aspirar un poco de medio tamponado con una pipeta Pasteur, recoger el ovocito y depositarlo en una placa de lavado.
- Si el ovocito presenta un cúmulo muy grande, con zonas oscuras o sangre se elimina con la ayuda de agujas.
- Una vez lavados y limpios los cúmulos se pasan a una placa definitiva de cultivo donde permanecerán en el incubador hasta el momento de su decumulación.

6.7 Muestra Seminal: Preparación

La muestra seminal utilizada para el ICSI procedía de eyaculado, recogido el mismo día del procedimiento o bien congelado previamente.

En ambas situaciones se analizó según los parámetros establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (81)(82).

6.8 Examen microscópico

Durante el estudio microscópico inicial de la muestra de semen se estima la concentración, movilidad y aglutinación, así como la presencia de otros elementos celulares como leucocitos o células germinales inmaduras para lo cual se deposita una gota de 10 μl de la muestra sobre una cámara Makler (SefiLaboratories, Tel Aviv, Israel) cubierta con un cubre objeto de cristal. La preparación es examinada a un aumento de 20x.

6.9 Movilidad

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

- Movilidad **tipo A**: movilidad progresiva, rápida y rectilínea.
- Movilidad **tipo B**: movimiento progresivo, pero lento o con movimientos circulares.
- Movilidad **tipo C**: movilidad lenta y sin desplazamiento. No se observa progresión, sino que se mueven sobre la misma posición.
- Movilidad **tipo D**: espermatozoides estáticos o inmóviles, tanto vivos como muertos.

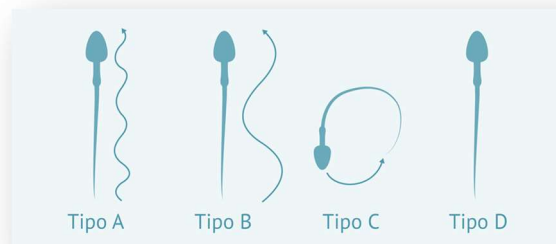


Figura 26: Clasificación de los espermatozoides según su movilidad. (*Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Laboratorio de Reproducción Asistida*).

6.10 Concentración

La determinación exacta de la concentración de espermatozoides (millones de espermatozoides por mililitro de semen) y su cantidad total (millones de espermatozoides por eyaculado) son de gran importancia para evaluar la calidad de una muestra seminal. Su valor de referencia se encuentra por encima de 15 millones/mL (83).

Una vez determinados los parámetros anteriores se realizó la capacitación espermática.

6.11 Recuperación espermática

Mediante la recuperación espermática (o capacitación), se elimina el plasma seminal del eyaculado y se seleccionan los espermatozoides con mejor movilidad. En este estudio realizamos la selección espermática mediante la técnica swim-up o gradientes de densidad según se consideró oportuno en cada caso.

6.11.1 Técnica de “SWIM-UP”

Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los espermatozoides con movilidad progresiva de avanzar en un medio de cultivo adecuado. Las principales ventajas de esta

técnica de capacitación son que es fácil de realizar, bajo coste y la fracción resultante es muy limpia.

A pesar de que el swim-up es una técnica que presenta múltiples ventajas, generalmente no se considera la técnica de elección en la preparación de muestras de semen de baja calidad ya que su rendimiento es inferior al obtenido por la técnica de separación por gradientes de densidad.

La técnica de swim-up evita la excesiva manipulación de la muestra reduciendo el riesgo de contaminación externa (84) así como también reduce la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables de provocar daños en la membrana celular de los espermatozoides (85) y disminuir la función espermática.

Procedimiento:

- En primer lugar, se coloca el eyaculado en un tubo Falcon® (Becton Dickinson, USA) de 13 mL y se añade medio HTF/HSA enriquecido con un 5% de proteína (37°C, 5% CO₂) en proporción 1:2 o 1:3; se centrifuga 10 minutos a 600g y se decanta con cuidado.
- Una vez decantado, se le añade al pellet o sedimento entre 0,5-1 mL de medio, dejándolo resbalar cuidadosamente por las paredes para evitar la formación de burbujas.
- A continuación, se coloca el tubo en el incubador con 45° de inclinación durante 45 minutos a 37°C; tiempo durante el cual los espermatozoides móviles migran desde el pellet hacia la parte superior del medio de cultivo.

- Por último, se aspira cuidadosamente 0.3-0.5 mL del sobrenadante que contiene los espermatozoides móviles que han ascendido (*Figura 27*).

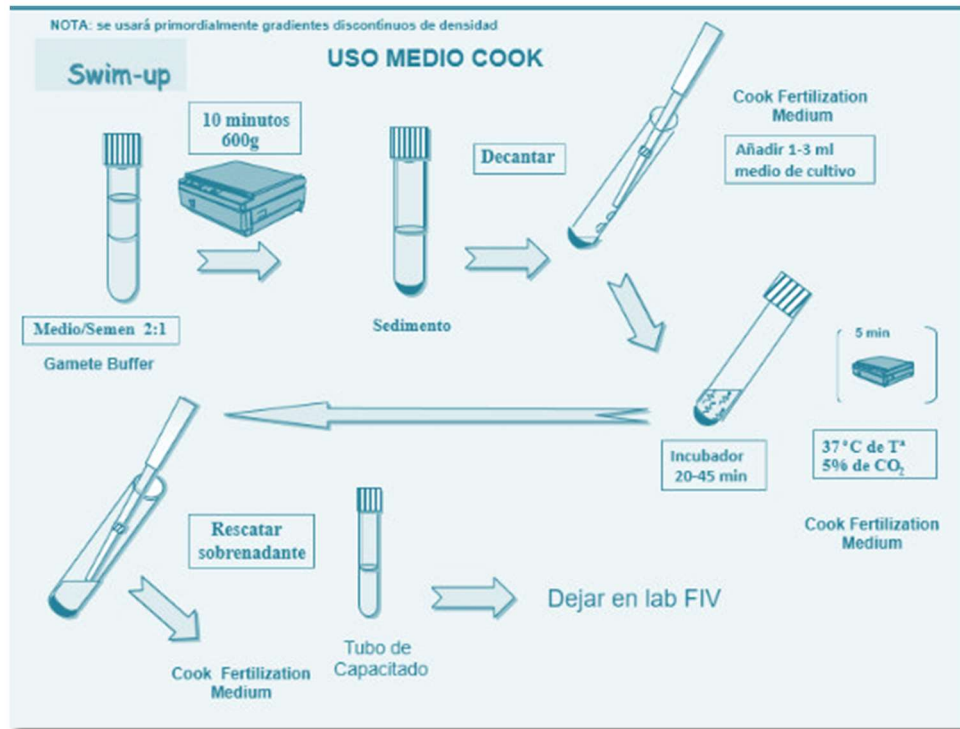


Figura 27: Procedimiento técnica swim-up (*Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Laboratorio de Reproducción Asistida*).

6.11.2 Técnica de Gradientes de Densidad

Su fundamento se halla en la selección de espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad de 90% y 45% (Nidacon International AB, Goteborg, Sweden) y llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro para el plasma seminal, células redondas y aquellos espermatozoides inmóviles o con movilidad no progresiva (86).

Esta técnica permite una mejor recuperación de espermatozoides móviles en muestras oligozoospermicas, astenozoospermicas y con abundantes células.

Procedimiento:

- En primer lugar, se hace deslizar un volumen determinado de medio de gradiente al 90% impregnando las paredes hasta el fondo de un tubo cónico.
- A continuación, se deposita el mismo volumen determinado de gradiente al 45%, el cual se deja caer de la misma manera que el anterior para evitar que se mezclen y se rompa la interfase entre ellos (el volumen de los gradientes dependerá de la concentración y la movilidad de la muestra seminal, pudiendo variar desde 0.5-1.5 mL).
- Una vez tenemos los gradientes, se deposita el mismo volumen de semen haciéndolo también deslizar sobre la pared del tubo.
- Centrifugar a 300g durante 20 minutos y posteriormente, con una pipeta Pasteur se recupera el sedimento, que se lava en otro tubo con medio de cultivo (0.5-1 mL de medio de cultivo G-Sperm plus / G-Fert plus) a 400g durante 5 minutos.
- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón con un volumen de 0.3-0.5 mL de medio (*Figura 28*).

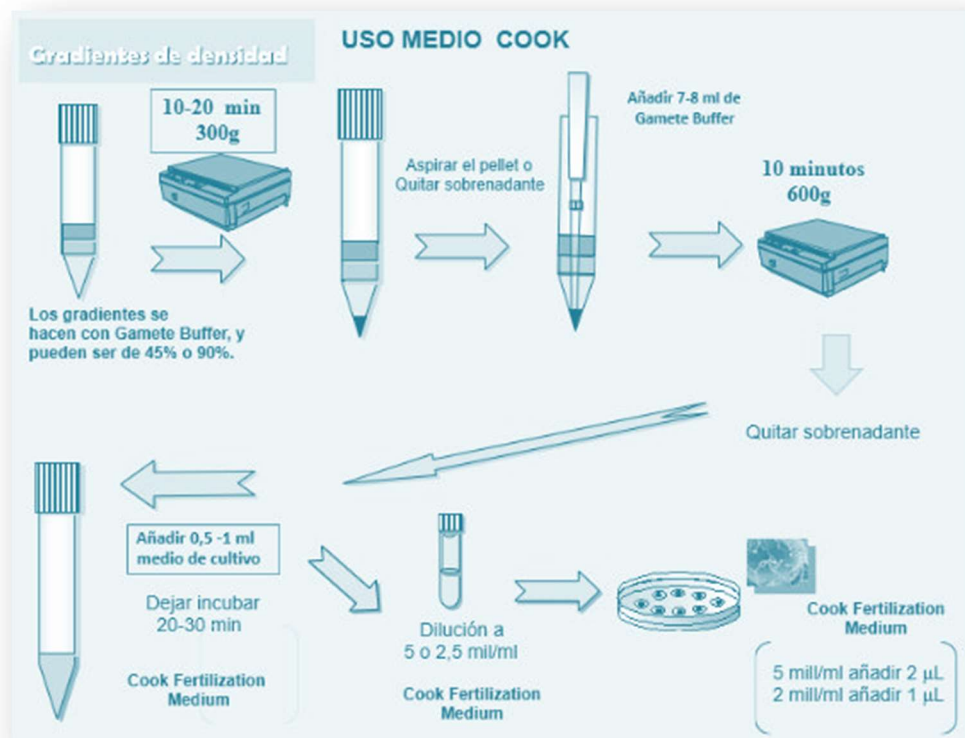


Figura 28: Procedimiento técnica gradientes de densidad. (*Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Laboratorio de Reproducción Asistida*).

La muestra una vez capacitada está ya preparada para llevar a cabo la inseminación de los ovocitos obtenidos, manteniéndose en el incubador a 37°C y 5.5% de CO₂ hasta el momento justo de la inseminación.

6.12 Decumulación de los Ovocitos

Una vez obtenidos los ovocitos tras la aspiración folicular, los complejos corona-cúmulo-ovocito fueron lavados en medio FERTM (COOK®, Sydney, Australia). Después del lavado, los ovocitos rodeados de las células de la granulosa, fueron cultivados en medio FERTM (COOK®, Sydney, Australia) al 5.5% CO₂ y 37°C durante 3-4 horas, antes del proceso de decumulación. La decumulación de las células de la granulosa consiste en la eliminación de las células de alrededor del ovocito mediante acción tanto mecánica como enzimática. Ésta fue llevada a cabo mediante pipeteando con capilares con un diámetro cada vez menor con la enzima hialuronidasa 40IU/mL (COOK®, Sydney, Australia) (Figura 29).

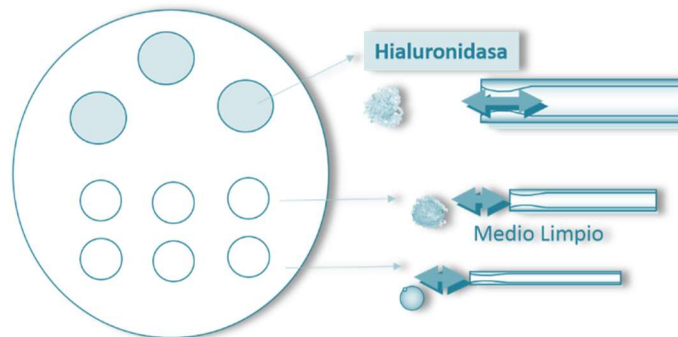


Figura 29: Esquema del proceso de decumulación.

6.13 Inseminación: ICSI

La inseminación de los ovocitos se llevó a cabo mediante la técnica de inyección intracitoplasmática (ICSI) (87), que consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado.

Para el ICSI se utilizaron placas de microinyección con microgotas de medio de cultivo tamponado (Gamete Medium, COOK™, Sydney, Australia) y gotas de Polivinil-pirrolidona (PVP) cubiertos con aceite mineral testado para embriones. El PVP se utiliza para disminuir la movilidad espermática facilitando su manipulación y captura, ayuda al control del fluido en la aguja de inyección y evita que los espermatozoides se queden adheridos a la pipeta. Posteriormente se añadieron unos microlitros del capacitado espermático a la gota de PVP.

Para el proceso de microinyección se empleó un microscopio invertido con óptica Hoffman (IX7 Olympus) a 400x aumentos con platina calefactada y un equipo de micromanipulación; con la pipeta de sujeción (Precision Holding Pipette COOK™, Sydney, Australia), se mantiene fijo al ovocito mientras que con la pipeta de inyección (Precision Microinjection Pipette COOK™, Sydney, Australia) se aspira el espermatozoide morfológicamente normal que será microinyectado tras su inmovilización.

6.14 Fecundación

La fecundación de los ovocitos viene determinada por una correcta activación ovocitaria, produciéndose una serie de eventos necesarios para el correcto desarrollo embrionario: incremento en los niveles de calcio intracelular, la exocitosis de los gránulos corticales para prevenir la polispermia, extrusión del segundo corpúsculo polar (culminándose la 2ª meiosis) y la aparición de los pronúcleos (paterno y materno), con la consecuente replicación del ADN y la primera división mitótica. La valoración de la fecundación tuvo lugar entre 17-20h post ICSI (presencia de 2 pronúcleos (PN) y dos corpúsculos polares (CP)). (Figura 30).



Figura 30: Ovocito correctamente fecundado.

6.15 Cultivo Embrionario

○ PRIMERA PARTE

Los embriones fueron cultivados en un incubador convencional con un sistema Eeva® integrado que incluye placas especiales con 12 micropocillos.

Las placas se prepararon la tarde anterior y se dejaron en un incubador convencional para pre-equilibrarse a 37°C y con un 5% de CO₂. Estas placas se rellenaron con medio de cultivo (Cleavage, COOK™, Sydney, Australia) tanto el pocillo central, que contiene los 12 micropocillos, como los 3 pocillos de lavado, y se cubrieron con 4 mL de aceite mineral para evitar la evaporación. Tras este pre-equilibrado, las burbujas de aire fueron retiradas de forma meticulosa antes de colocar los ovocitos.

Una vez evaluada la fecundación, los cigotos se colocaron en la placa en un plazo de ≤20 horas post inseminación para evitar que comenzasen las primeras divisiones embrionarias, lo cual podría impedir el correcto análisis de las imágenes.

En la siguiente imagen se muestra el modo correcto de colocación de la placa en el sistema que permite realizar el análisis de imágenes adecuadamente (*Figura 31*).

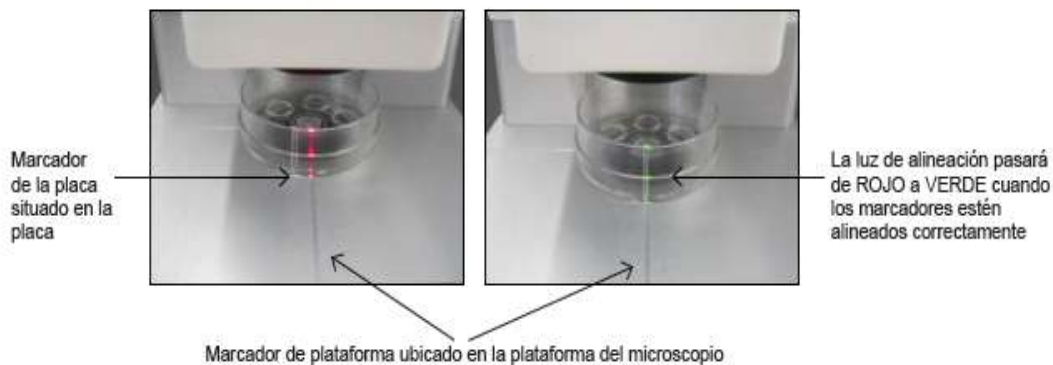


Figura 31: Posicionamiento correcto de la placa.

La evaluación morfológica de los embriones en día 2 de desarrollo se realizó analizando las imágenes proporcionadas por el sistema, sin sacar los embriones del incubador. En día 3, se sacaron los embriones del incubador y se evaluaron bajo microscopio para su evaluación morfológica. Si la transferencia estaba programada para D5/6, a partir de D3 los embriones continuaron su cultivo en un incubador convencional

en placas de cultivo convencionales (medio CCM, Vitrolife, Gotemburgo, Suecia). La selección de los embriones para transferencia se basó en una combinación de la información proporcionada por el sistema Eeva® y la evaluación morfológica convencional.

○ SEGUNDA PARTE

Los embriones fueron cultivados en el incubador Geri+® (esta versión “plus” es la única que lleva incorporado el sistema de selección Eeva) que incluye placas especiales con 16 micropocillos.

Se rellenaron con medio Gems (Genea Biomedx®, Sydney, Australia) tanto el pocillo central, que contiene los 16 micropocillos, como los 3 pocillos de lavado, y se cubrieron con 4 mL de aceite mineral para evitar la evaporación. Tras la microinyección, los ovocitos se colocaron directamente en la placa del Geri® y dentro de este incubador.

La mitad de las cámaras del incubador se encontraban en condiciones de humedad mientras que la otra mitad proporcionaban un cultivo en ambiente seco.

La evaluación morfológica de los embriones se realizó en D2 y D3 de desarrollo utilizando las imágenes proporcionadas por el sistema sin sacar en ningún momento los embriones del incubador. En estadio de blastocisto se combinó la información proporcionada por el sistema Eeva® junto con la evaluación morfológica convencional para realizar la selección embrionaria.

6.16 Embriones Sometidos a Diagnóstico Genético Preimplantacional

En los embriones en los que posteriormente se iba a proceder a la realización de un análisis genético, en D3 de desarrollo realizamos un orificio (“*hatching*”) en su zona pelúcida con el sistema de láser, para facilitar su eclosión el día de la biopsia. Una vez realizado el orificio, los embriones se devolvieron al incubador y fueron cultivados hasta el estadio de blastocisto en día 5-6. El mejor momento para realizar la biopsia del blastocisto es cuando está eclosionando. También puede realizarse si el embrión ha eclosionado completamente.

A la hora de realizar la biopsia, el blastocisto se colocó de forma que la masa celular interna se encuentre perfectamente localizada. Aspiramos suavemente unas pocas células del trofoectodermo bajo objetivo Hoffman de 40 aumentos. A continuación, pasamos al objetivo del láser, dando unos pulsos de laser (OCTAX) de forma tangencial a la porción de trofoectodermo a biopsiar. Con un movimiento rápido a modo de cizalla entre la pipeta holding y la de aspiración se consigue cortar la porción a biopsiar del resto del blastocisto. Para ello ambas pipetas han de estar perfectamente paralelas.

Concluida la biopsia, liberamos el trofoectodermo biopsiado de la pipeta de aspiración en la gota, retirando el blastocisto bajo lupa binocular y lo dejamos en cultivo para proceder a la vitrificación a la espera del diagnóstico. El fragmento biopsiado se enviaba a analizar a un laboratorio externo por “Next Generation Sequence” (NGS) o arrays.

6.17 Evaluación Morfológica de los Embriones. Categorización según ASEBIR

Para la evaluación morfológica de los embriones seguimos la clasificación definida por ASEBIR (88,89) que clasifica los embriones en 4 categorías según su potencial de implantación (*Figura 32*):

Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.

Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.

Categoría C: Embrión regular con una probabilidad de implantación media.

Categoría D: Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja.

La asignación de una categoría a un embrión dependerá de las variables morfológicas evaluadas.

Parámetros utilizados para la selección embrionaria en el estadio D2 y D3:

- Número de células y ritmo de división de D2 a D3
- Simetría
- Aspecto del citoplasma
- Contacto intercelular y compactación
- Zona pélcida

- Multinucleación
- Fragmentación (porcentaje y distribución)

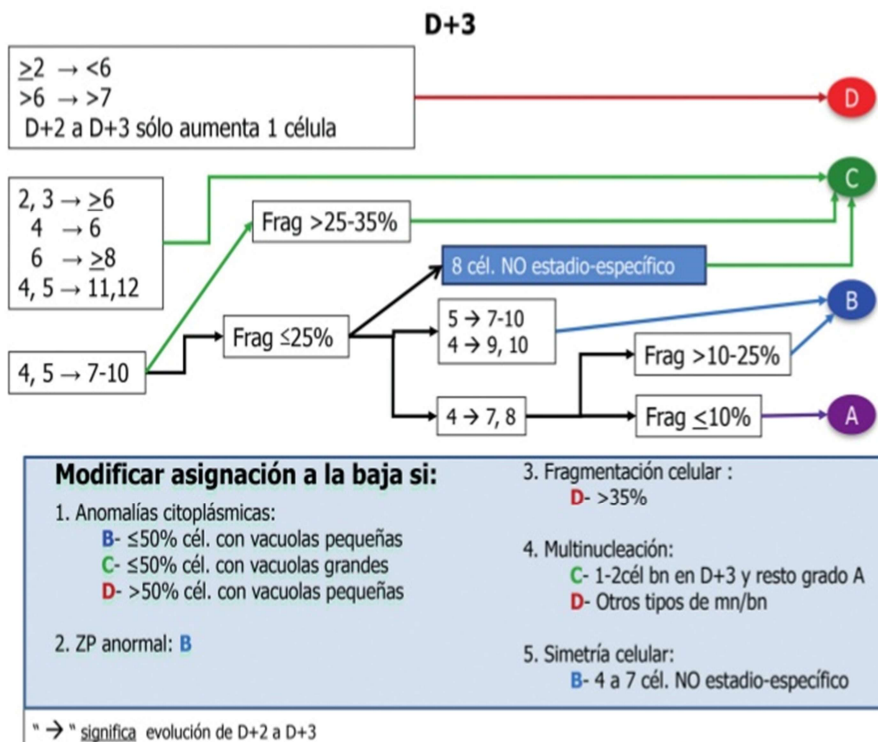
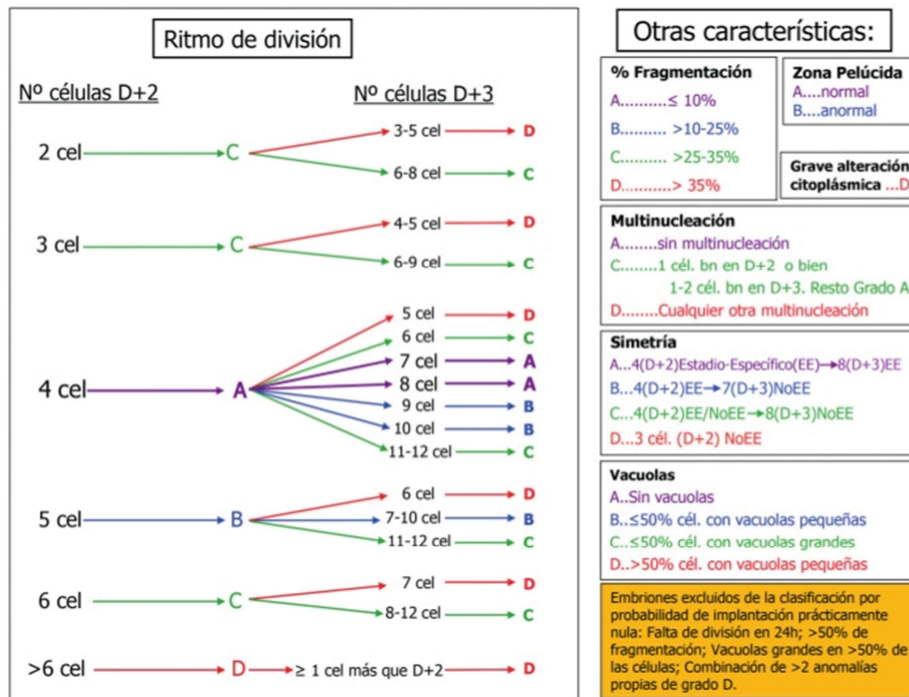


Figura 32: Clasificación de los embriones en D3 según ASEBIR

En D5, después de la compactación celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele y se produce la diferenciación celular. Esta nueva morfología del embrión recibe el nombre de blastocisto en el cual podemos distinguir también diferentes grados de expansión (temprano, cavitado, expandido, en eclosión y eclosionado). Se diferencian dos partes esenciales, la masa celular interna y el trofoectodermo. En nuestro estudio definimos como blastocistos morfológicamente óptimos aquellos con un trofoectodermo A o B (trofoectodermos homogéneos formados por un gran número de células) (*Figura 33*).

D+4	D+5				D+5	D+6			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR		Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión"	A	A	A	Desde: "Iniciando la expansión"	A	A	B	
			B	B			B	C	
			C	C			C	D	
			D	D			D	D	
Mórula compacta	Hasta: "Eclosionando"	B	A	A	Hasta: "Eclosionando"	B	A	B	
			B	B			B	C	
			C	C			C	D	
			D	D			D	D	
Mórula compacta	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	C	A	A	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	C	A	B	
			B	B			B	C	
			C	C			C	D	
			D	D			D	D	
Mórula no compacta	Mórula		A,B,C o D	D	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)		A,B,C o D	D	
Mórula no compacta	Mórula				Mórula		Excluidos		

Figura 33: Clasificación de los blastocistos según ASEBIR

6.18 Transferencia Embrionaria

Todos los pacientes incluidos en este estudio tenían asignado el día en el que se iba a realizar la transferencia embrionaria (día 3 vs día 5) basado en criterio médico.

El número de embriones transferidos varió entre 1 o 2 embriones según calidad embrionaria, deseos de la paciente o indicación médica.

El tipo de cánula utilizada varió según la necesidad de cada paciente, utilizándose en la mayoría de los casos cánulas blandas.

Los embriones viables de buena morfología que no fueron seleccionados para transferir fueron crioconservados utilizando la técnica de vitrificación que usamos habitualmente en el laboratorio (90).

La determinación de la β -hCG se realizó 13 días después de la transferencia embrionaria en los casos de TD3 u 11 días después en los casos de TD5. El embarazo se confirmó en semanas posteriores al determinar la presencia de saco gestacional y latido cardiaco.

6.19 Descripción y Componentes del Sistema Eeva®

El sistema Eeva® consta de los siguientes componentes:

- **Microcopio**

Microscopio especialmente diseñado para su inserción en el interior de un incubador convencional. Tiene una plataforma que permite la colocación correcta de la placa para la captura de imágenes.

- **Retén**

Proporciona un orificio para pasar los cables desde el microcopio en el interior del incubador hasta la caja de control situada fuera del incubador conservando el entorno óptimo de incubación dentro del incubador.

- **Caja de control**

Suministra alimentación a los microscopios y supervisa de manera continua el consumo energético del microscopio. La caja de control informa al ordenador cuando se producen errores y se avisa al usuario mediante mensajes en la pantalla del microscopio y de la estación.

- **Pantalla del microscopio**

Un monitor con pantalla táctil instalado en la puerta del incubador permite al usuario introducir datos de pacientes, gestionar la sesión y revisar las imágenes capturadas.

- **Ordenador**

Controla el funcionamiento de los microscopios, las pantallas de los microscopios y la estación. Tiene un software acoplado que marca automáticamente los tiempos de división y clasifica los embriones según su propio algoritmo. El ordenador tiene un

monitor de pantalla táctil (estación) desde el cual el usuario puede controlar el estado de los microscopios, gestionar los datos de las pacientes, revisar y descargar imágenes y videos, generar informes.

- **Fuente de alimentación ininterrumpida**

Fuente de alimentación ininterrumpida que protege contra las subidas de tensión y proporciona alimentación de reserva al sistema Eeva®.

6.20 Descripción y Componentes del Sistema Geri®

El sistema Geri® está formado por seis compartimentos de incubación independientes, cada uno de ellos con su propia cámara. Como componentes del incubador podemos destacar:

- **Cámara**

Cámara CMOs monocromo, que captura imágenes cada 5 minutos en 11 planos focales. Tanto la posición de la cámara como el enfoque son ajustables y presentan una iluminación LED naranja y un zoom digital que permite acercar o alejar la imagen.

- **Filtro**

Filtra el gas cuando entra en la cámara de incubación.

- **Botellas de agua**

Proporcionan unas condiciones de humedad dentro de la cámara en la que se considere. El incubador Geri dispone de unas “botellas” (*Figura 36*) con el fin de crear un ambiente húmedo que pueda reducir la evaporación y proporcionar unas condiciones de cultivo más estables a pesar del recubrimiento de las placas con aceite.

Los pacientes se incubaron de forma randomizada en cámaras con o sin humedad.

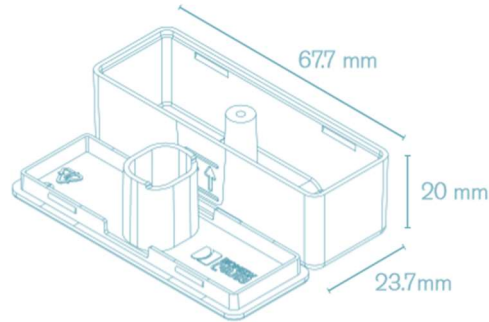


Figura 34: Cámara que se introduce en el incubador para crear un ambiente con humedad.

○ **Pantalla LED por cada compartimento**

Contiene los datos fundamentales del paciente (nombre y número de historia) así como la temperatura del compartimento calculada a partir del promedio de cuatro sensores independientes.

○ **Página de Inicio**

Contiene información general de todos los compartimentos incluidos (*Figura 35*).

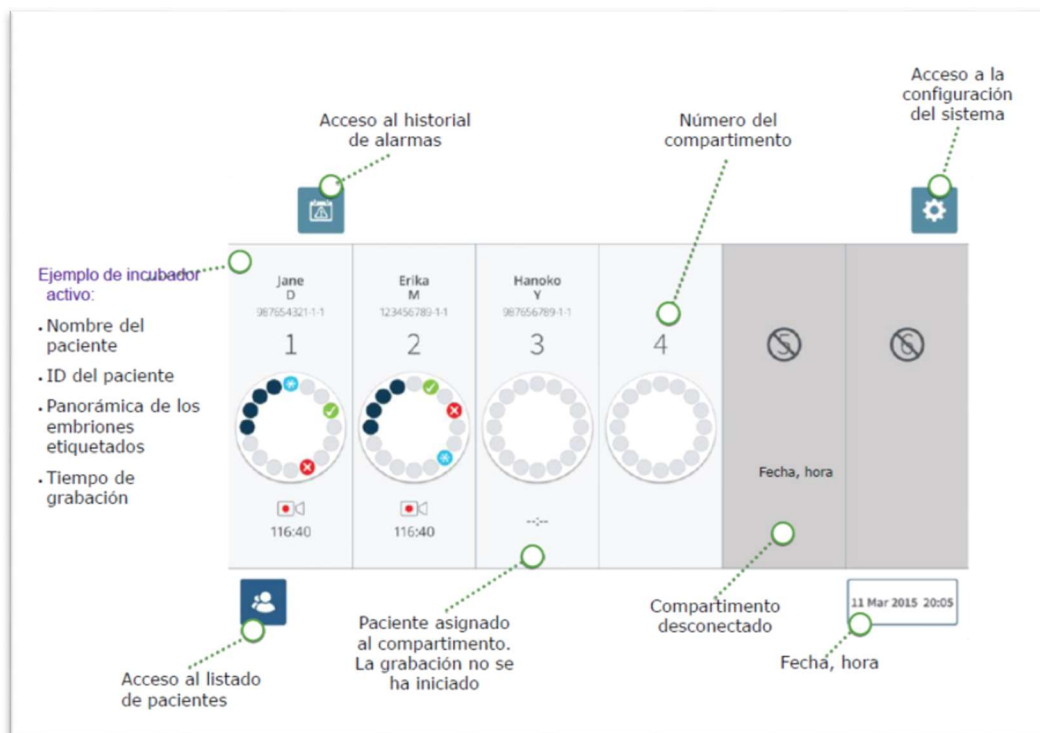


Figura 35: Pantalla de inicio del incubador Geri®

○ **Página del compartimento de incubación**

Información general de los embriones de cada paciente que incluye información del paciente, etiquetado de los embriones, tiempo de grabación así como última imagen de los embriones (*Figura 36*).

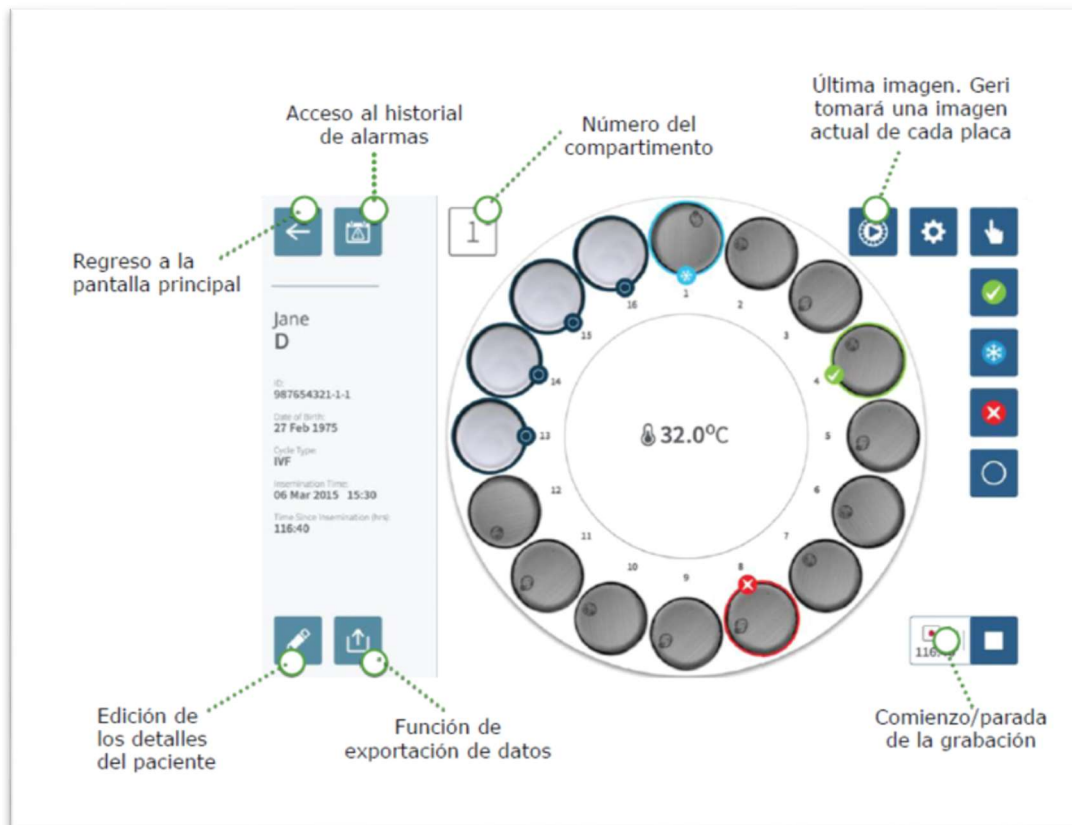


Figura 36: *Página del compartimento de incubación.*

○ **Pantalla de los pocillos de la placa**

Visión individual del embrión por pocillo que permite revisar el video del desarrollo embrionario en sus diferentes planos focales y seleccionar el destino del embrión (*Figura 37*).



Figura 37: Pantalla de los pocillos de la placa Geri®.

6.21 Limitaciones

- Desplazamiento del embrión o de la placa.

Cuando un embrión se desplaza de su micropocillo original mientras el análisis Eeva® está en curso, el sistema Eeva® no completará el análisis para el embrión desplazado y dará el resultado NR (sin resultado). Algunas de las posibles causas del desplazamiento de los embriones fuera de su pocillo podrían ser el manejo inadecuado de la placa, o movimientos o vibraciones del incubador.

En algunos casos, un embrión podría desplazarse a otro micropocillo contiguo, en estos casos el sistema tampoco nos proporcionaría resultado. Los embriones no sufren ningún daño por compartir el mismo micropocillo; no obstante, el sistema Eeva® probablemente no proporcione resultado (NR) para todos los embriones que ocupen el mismo pocillo.

- No obtención de resultado a pesar de que el embrión esté correctamente situado.

Esto podría ser ocasionado, cuando en la primeras 42h de la sesión tiene lugar alguna de las siguientes situaciones:

- Detención de la captura de imágenes.
- Vista del microscopio obstruida.

- El embrión no se desarrolla.
- La imagen tiene poca calidad debido a formación de burbujas o a evaporación en la placa.
- Embrión multifragmentado.
- División celular caótica.
- Elevada cantidad de células del cúmulo que impiden tener una imagen nítida de las blastómeras.

En estos casos realizamos únicamente una valoración tradicional de morfología ya que no tenemos información proporcionada por el sistema.

6.22 Software del Sistema Eeva® y Algoritmos

En día 3 de desarrollo, Eeva® calcula de forma automática los tiempos de las primeras divisiones, y utiliza su propio algoritmo para predecir la probabilidad de los embriones de alcanzar el estadio de blastocisto.

La necesidad del uso de campo oscuro se debe a que el algoritmo detecta píxeles blancos sobre negros. De esta forma, la membrana plasmática queda destacada como un círculo blanco y por lo tanto cuando solo hay una célula esta línea no tiene intersecciones, cuando hay dos células tendrá 1 o dos puntos de intersección y así progresivamente.

Además, Eeva® realiza fotos cada 5 minutos, y compara la última imagen con su anterior, basándose en el principio de que si dichos píxeles coinciden no se han producido cambios en el embrión mientras que en caso de que no haya coincidencia se debe a que puede haberse producido una división. El segundo parámetro que estudia para aumentar la precisión en la detección de divisiones son los cambios en la relación área-perímetro de los círculos, que son las blastómeras cuya ratio varía tras producirse una división.

De esta forma, el sistema registra los tiempos exactos en los que se producen las primeras divisiones: t_2 , t_3 y t_4 , calculando de forma automática los valores de P2 (t_3-t_2) y P3 (t_4-t_3). Por tanto, los tiempos utilizados para la clasificación son intervalos que no dependen de la hora en la que se ha realizado la microinyección, evitando el sesgo que implica utilizar ese punto de partida ya que no podríamos definir con precisión la hora exacta en la que se ha producido la microinyección de cada ovocito.

Esta clasificación se basa en el estudio desarrollado por Wong en 2010 (41) en el que el tiempo entre la primera y segunda citocinesis (P2 (t3-t2)) y el tiempo entre la segunda y tercera citoquinesis (P3 (t4-t3)) destacaron en su modelo de predicción como parámetros más relevantes.

En este estudio hemos utilizado dos algoritmos del sistema Eeva®.

Tras varias versiones previas de mejora empezamos nuestro estudio utilizando la versión 2.2 y posteriormente la Xtend®.

Versión 2.2

Los embriones se clasifican en tres categorías según su probabilidad de llegada a blastocisto.: HIGH (alto), MEDIUM (medio) y LOW (bajo) en función de los tiempos de P2 y P3.

-Eeva® “High” ($9.20 \leq P2 \leq 11.28$ h; $0 \leq P3 \leq 1.44$ h).

-Eeva® “Medium” ($9.20 \leq P2 \leq 12.39$ h; $0 \leq P3 \leq 4$ h).

-Eeva® “Low” (P2, P3, o ambos, fuera del rango óptimo de Eeva® “High” y “Medium”).

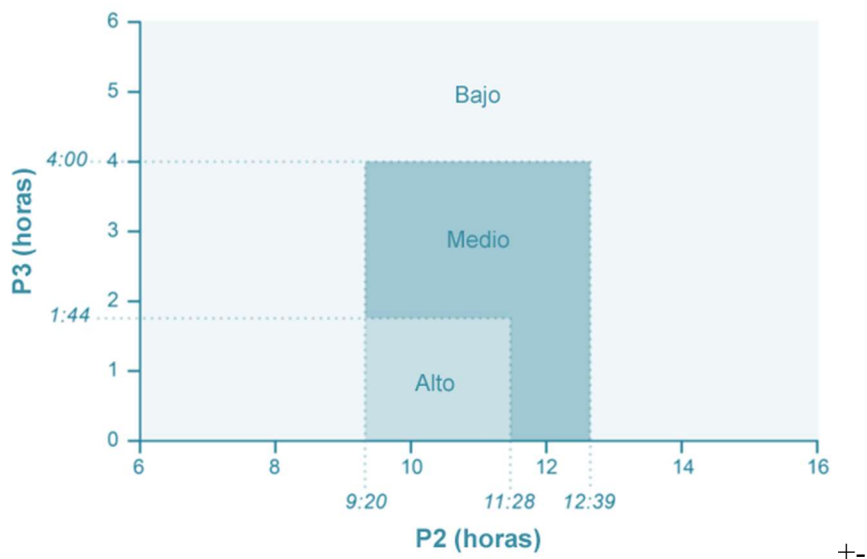


Figura 38: Tiempos que definen las diferentes categorías Eeva.

Algoritmo Xtend®

Para la elaboración de este nuevo algoritmo se llevó a cabo un riguroso proceso en el que se investigaron más de 1000 combinaciones con nuevos parámetros.

De todos los parámetros analizados, destacaron 5 como más relevantes:

- Edad del ovocito
- P2 (t3-t2) y P3 (t4-t3)
- Un análisis post-P3. Dicho análisis está relacionado con la textura o fragmentación del embrión (mide de forma cuantitativa cambios tenues en la uniformidad de la superficie del embrión).
- Número de células en día 3 de desarrollo.



Figura 39: Parámetros utilizados en el algoritmo Xtend® para la clasificación de los embriones.

En función de los valores de estas variables consideradas más relevantes, el sistema clasifica los embriones del 1-5, siendo 1 los embriones con más posibilidades de alcanzar el estadio de blastocisto.

6.23 Análisis Estadístico

Los embriones analizados se dividieron en dos grupos en función de si llegaron o no hasta estadio de blastocisto. Se utilizó un análisis Chi cuadrado para comparar datos categóricos. El análisis incluía blastocistos en día 5 de desarrollo, transferidos o vitrificados y embriones no viables que no alcanzaron el estadio de blastocisto o eran de calidad subóptima.

El modelo estadístico elegido fue una regresión logística y se utilizó con variables definidas. Los parámetros binarios utilizados fueron 1 para la formación de blastocisto y 0 para ausencia de blastocisto.

En un segundo análisis definimos como parámetro binario la presencia de saco gestacional: 1 para embriones que implantaron y 0 en ausencia de saco gestacional.

En un tercer análisis definimos como parámetro binario la presencia de gestación evolutiva: 1 (positiva) y 0 (negativa).

En el análisis de regresión logística determinamos la combinación de las variables y su relación con tasa de llegada a blastocisto, potencial de implantación y gestación evolutiva.

La OR del efecto que todas las variables generaban en la formación de blastocistos o implantación se expresó en términos de intervalo de confianza 95% (IC) y significancia.

Se utilizaron curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para estudiar el valor predictivo de todas las variables incluidas en la regresión relacionadas con la llegada a blastocisto y la implantación. Los análisis de las curvas ROC proporcionaron valores de área bajo la curva (AUC) entre 0.5 y 1 que se interpretaron como medida de la capacidad de clasificación del modelo. El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences 22*).



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 ALGORITMO EEVA®

5.1.1 Distribución de embriones por categorías Eeva®

5.1.2 Distribución de embriones por categorías ASEBIR

5.1.3 Tasa de Blastocisto

5.1.3.1 Tasa de blastocisto por categoría Eeva®

5.1.3.2 Tasa de blastocisto por categoría ASEBIR

5.1.3.3 Tasa de blastocisto óptimo por categoría Eeva®

5.1.3.4 Tasa de blastocisto óptimo por categoría ASEBIR

5.1.3.5 Porcentaje de blastocistos en D5 o D6 por categoría Eeva®

5.1.3.6 Porcentaje de blastocistos óptimos en D5 o D6 por categoría Eeva®

5.1.3.7 Regresión logística tasa de blastocisto

5.1.4 Tasa de Implantación

5.1.4.1 Distribución de embriones KID por categoría Eeva®

5.1.4.2 Tasa de implantación por categoría Eeva (TD3 y TD5)

5.1.4.3 Distribución de embriones KID por categoría ASEBIR

5.1.4.4 Tasa de implantación por categoría ASEBIR (TD3 y TD5)

5.1.4.5 Regresión logística tasa de implantación

5.1.5 Tasa de Gestación

5.1.5.1 Tasa de gestación (TD3+TD5)

5.1.5.2 Tasa de gestación TD3 y TD5 por separado

5.1.5.3 Regresión logística tasa de gestación

5.1.1 Distribución de embriones por categorías Eeva®

En este primer estudio el número de embriones analizados fue 3002. Estos embriones fueron clasificados automáticamente por el sistema Eeva® en función de los valores de P2 y P3.

A continuación, se muestra la distribución de los embriones en las diferentes categorías Eeva® (Figura 40).

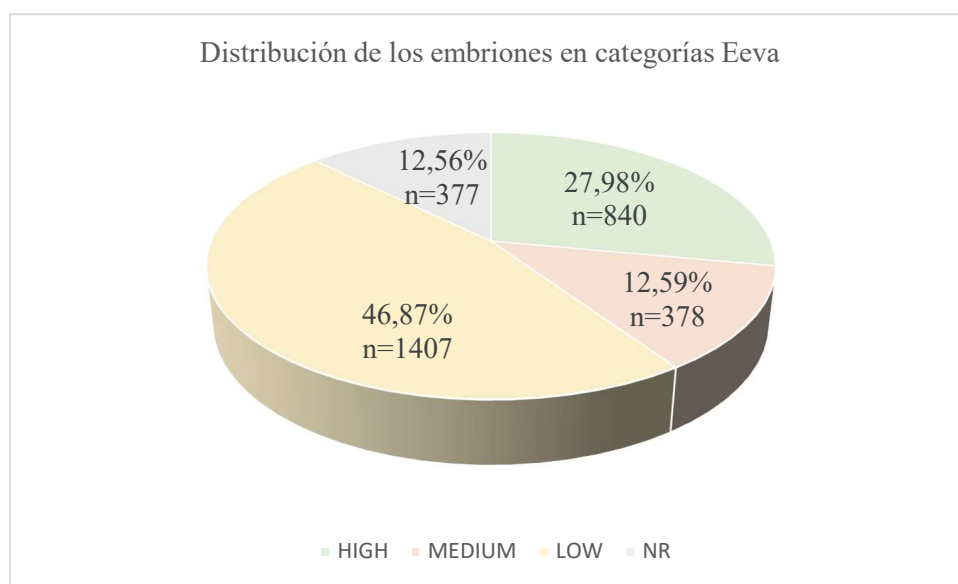


Figura 40: Distribución de los embriones en las diferentes categorías Eeva®.

5.1.2 Distribución de embriones por categorías ASEBIR

Estos mismos embriones también se clasificaron utilizando la clasificación morfológica de ASEBIR en D3 (Figura 41).

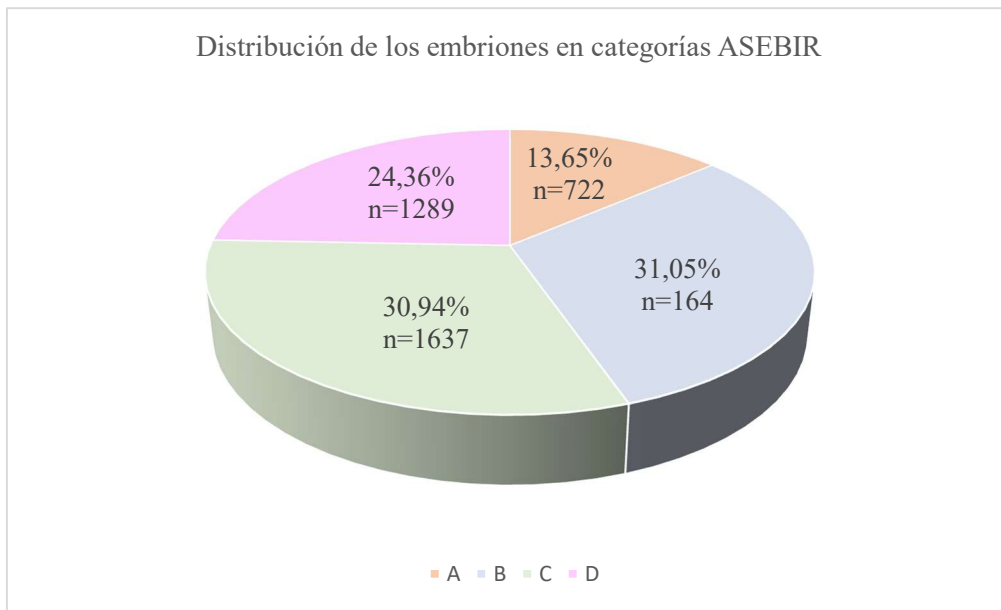


Figura 41: Distribución de los embriones en las diferentes categorías ASEBIR

5.1.3 Tasa de Blastocisto

5.1.3.1 Tasa de blastocisto por categoría Eeva®

Se correlacionaron la tasa de formación de blastocisto en función de la categoría Eeva® ($p < 0.001$). (Figura 42).

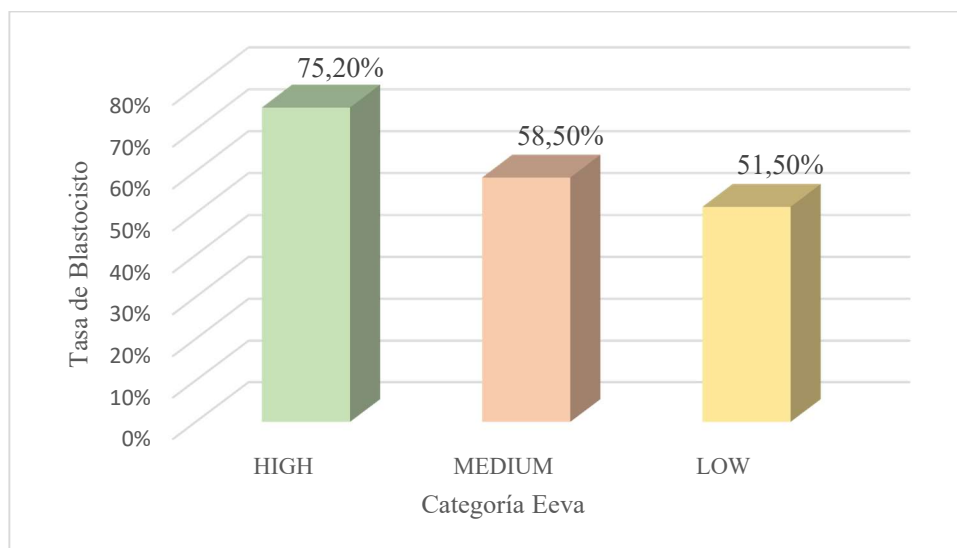


Figura 42: Tasa de blastocisto en las diferentes categorías Eeva®

5.1.3.2 Tasa de blastocisto por categoría ASEBIR

Este mismo análisis se realizó en función de las categorías ASEBIR ($p < 0.001$).
(Figura 43).

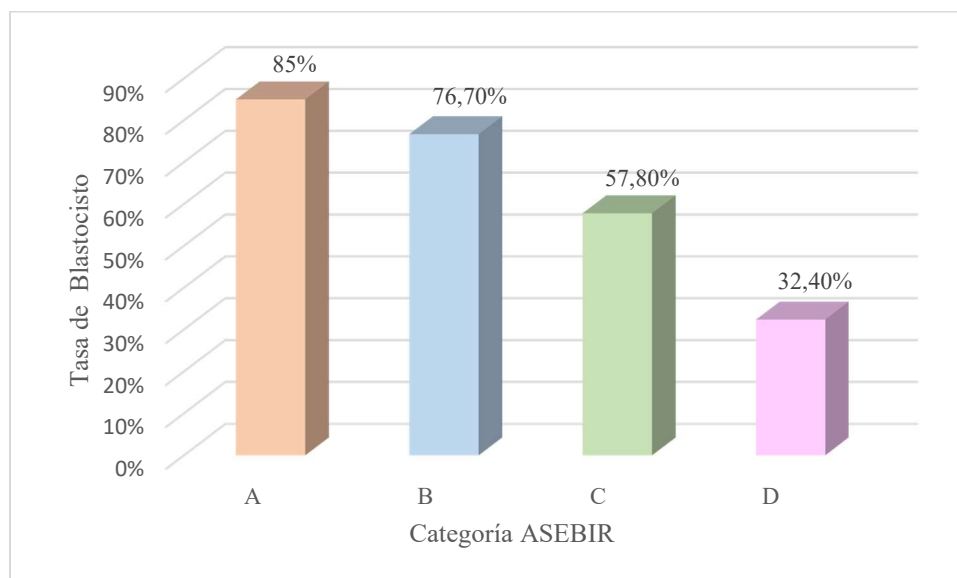


Figura 43: Tasa de blastocisto en las diferentes categorías ASEBIR

En ambos casos observamos diferencias estadísticamente significativas con una notable mejora en cuanto a la tasa de llegada a blastocisto en las categorías superiores de ambas clasificaciones.

5.1.3.3 Tasa de blastocisto óptimo por categoría Eeva®

Con el objetivo de ver si estas diferencias se mantenían cuando nos centrábamos sólo en los blastocistos de buena calidad, estudiamos la tasa de blastocisto de calidad A/B según Eeva® ($p < 0.001$) (Figura 44).

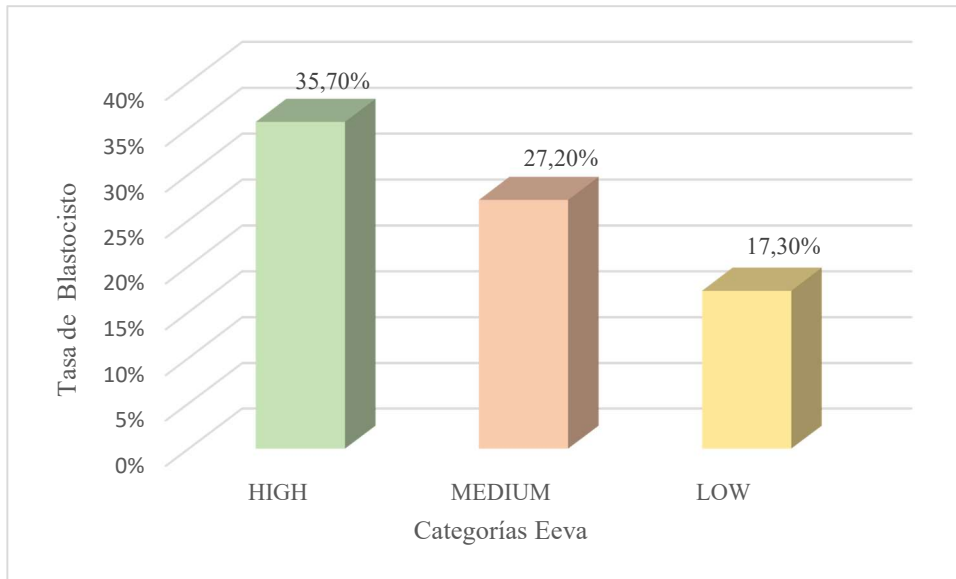


Figura 44: Tasa de blastocisto óptimo en las diferentes categorías Eeva®

5.1.3.4 Tasa de blastocisto óptimo por categoría ASEBIR

Realizamos este mismo análisis de blastocistos óptimos según ASEBIR (en función de las categorías asignadas en D3 por ASEBIR ($p < 0.001$)) (Figura 45).

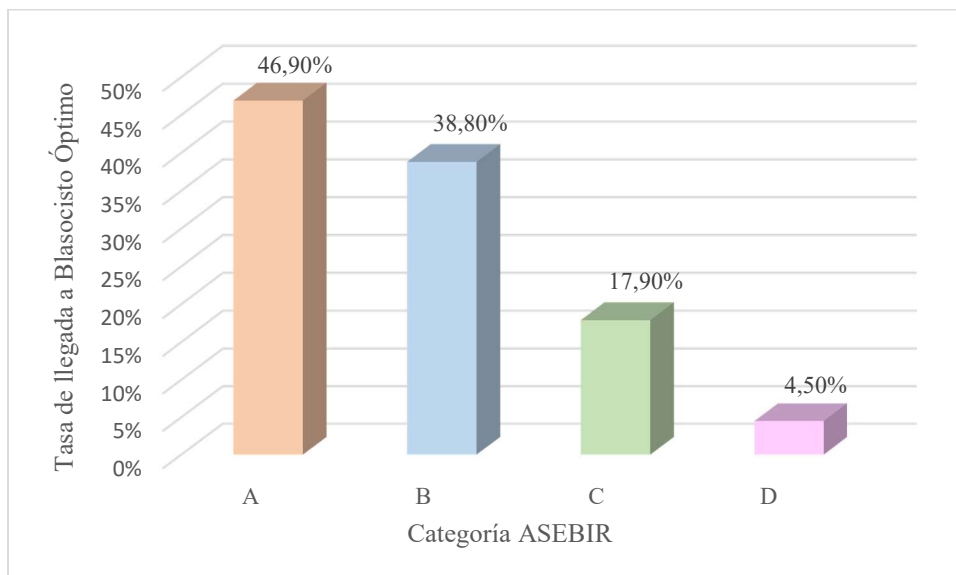


Figura 45: Tasa de llegada a blastocisto óptimo en las diferentes categorías ASEBIR

Por tanto, vimos que la tasa de blastocisto óptimo se ve incrementada en las categorías superiores tanto de la clasificación Eeva® como la de ASEBIR

5.1.3.5 Porcentaje de blastocistos en D5 o D6 por categoría Eeva®

Por otra parte, analizamos, dentro de cada categoría Eeva®, si los embriones que alcanzaban el estadio de blastocisto lo hacían en D5 o en D6 de desarrollo (*Figura 46*)

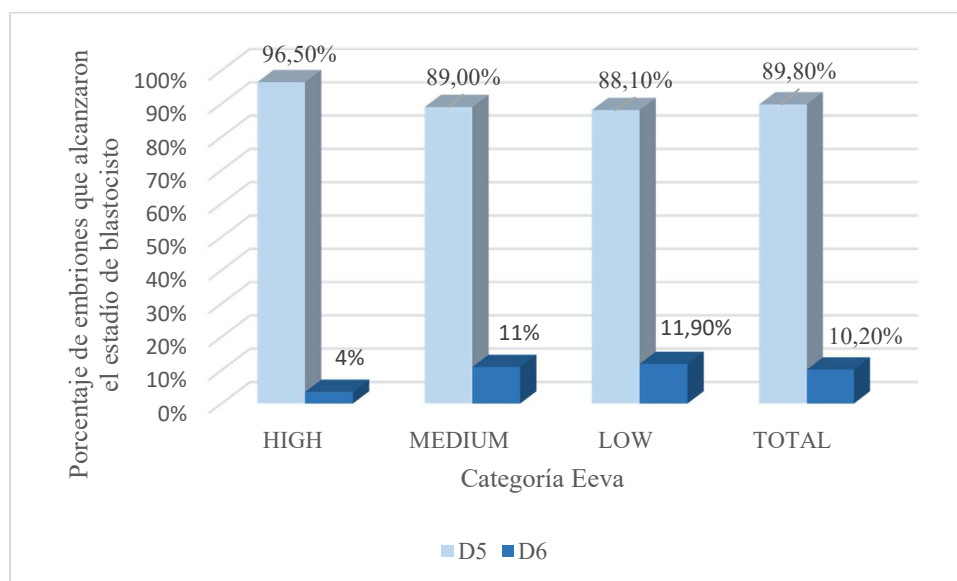


Figura 46: En cada categoría Eeva®, porcentaje de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto en D5 o en D6.

Observamos que independientemente de la categoría, la mayor parte de los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto lo hacen en día 5 de desarrollo.

5.1.3.6 Porcentaje de blastocistos óptimos en D5 o D6 por categoría Eeva®

Dentro de los blastocistos viables, se analizaron cuántos fueron de calidad óptima (A o B) en cada categoría y día de desarrollo (*Figura 47*).

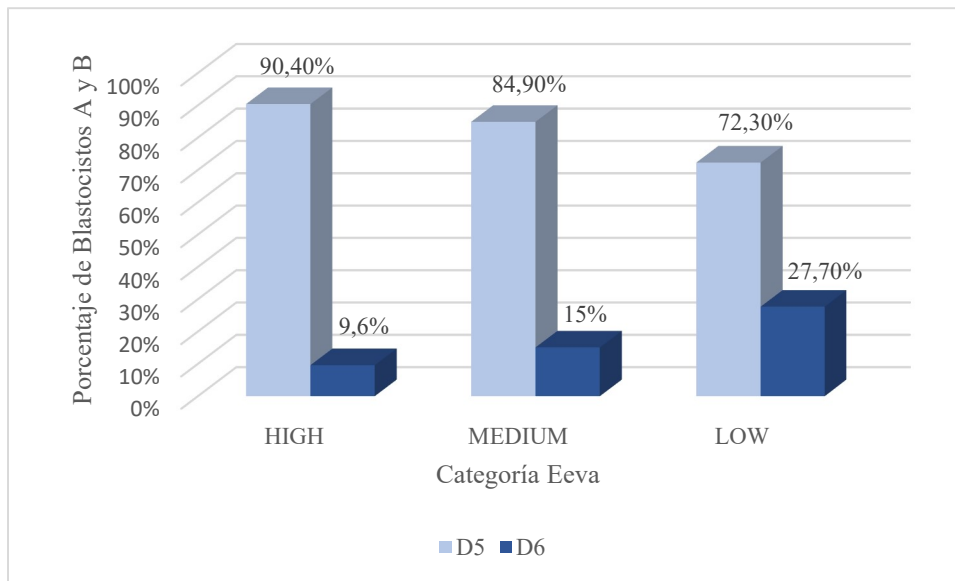


Figura 47: Porcentaje de blastocistos de calidad óptima en D5 o en D6 según categoría Eeva®.

En blastocistos de calidad óptima volvemos a encontrarnos con los mismos resultados: mayor porcentaje de blastocistos de calidad óptima en día 5 en todas las categorías, y mayor porcentaje de blastocistos de calidad óptima en día 6 clasificados como “low” que blastocistos de calidad óptima en día 6 clasificados como “high”.

5.1.3.7 Regresión logística tasa de blastocisto

Teniendo en cuenta los posibles factores de confusión, que pudiesen enmascarar o modificar los resultados y conclusiones obtenidas, llevamos a cabo un análisis de regresión logística.

Como factores de confusión incluimos la edad de la donante y la clasificación embrionaria morfológica. (Tabla 2).

Tasa de Blastocisto				
	OR	IC 95%	p	
Medium vs Low	1,312	0,997-1,728	0,053	ns
<i>High vs Low</i>	2,014	1,632-2,486	<0,05	sig
A vs D	8,687	6,153-12,265	<0,05	sig
B vs D	5,843	4,562-7,485	<0,05	sig
C vs D	2,932	2,308-3,725	<0,05	sig
Edad	1	0,979-1,021	0,987	ns

Tabla 2: Tasa de blastocisto. Modelo de regresión logística

El área bajo la curva (Receiver operating characteristic (ROC)), representa el poder diagnóstico del modelo Eeva® para predecir la capacidad de llegada a blastocisto. El valor obtenido fue 0,728, con un intervalo de confianza (IC)95% de (0.707-0.749) (Figura 48).

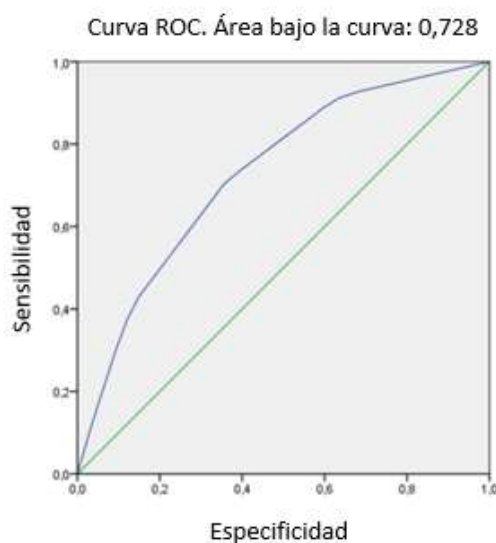


Figura 48: Curva ROC modelo Eeva®

Al calcular el área bajo la curva ROC para la predicción de blastocisto, teniendo en cuenta la clasificación de ASEBIR, el valor obtenido fue 0.717 con un IC95% (0.703-0.732) (*Figura 49*).

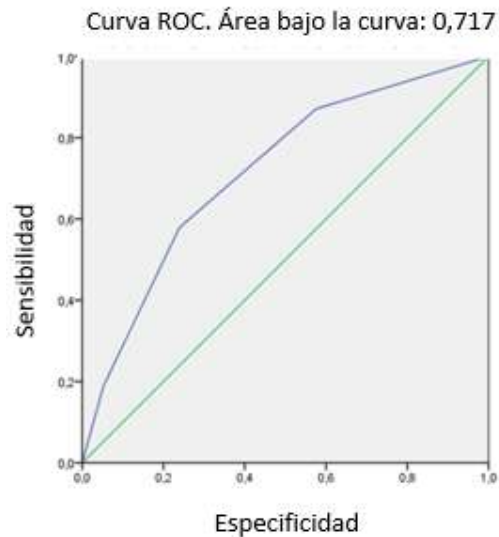


Figura 49: *Curva ROC. Modelo ASEBIR*

5.1.4 Tasa de Implantación

5.1.4.1 Distribución de embriones KID por categoría Eeva®

Todos los embriones con implantación conocida (KID) fueron seleccionados para realizar un posterior análisis retrospectivo (n= 521).

Analizamos la distribución de embriones KID en función de las categorías Eeva® (*Figura 50*).

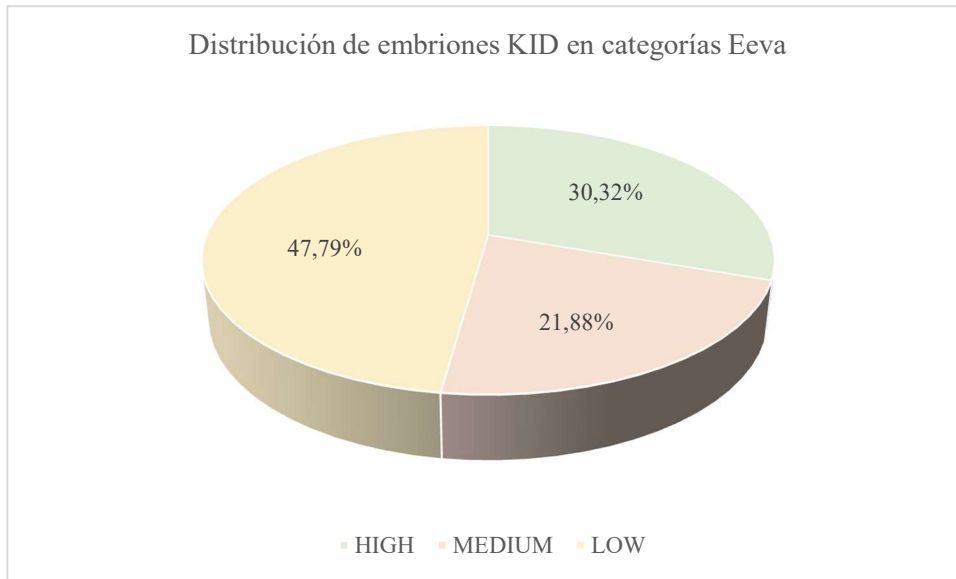


Figura 50: Distribución de los embriones KID según las diferentes categorías Eeva®.

5.1.4.2 Tasa de implantación por categoría Eeva (TD3 y TD5)

Se analizó la tasa de implantación en cada una de las categorías en función del día de la transferencia (*Figura 51*).

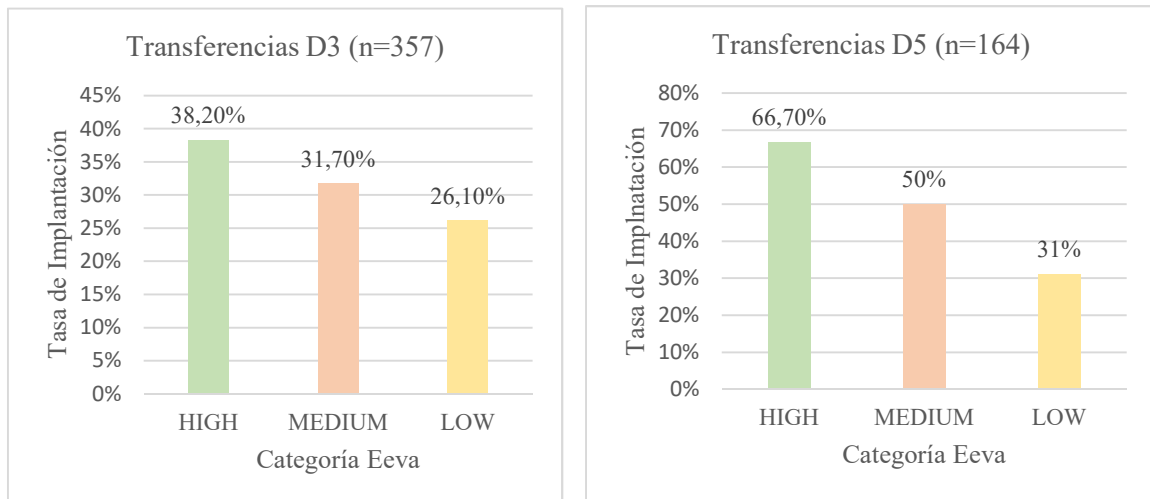


Figura 51: Tasa de implantación en cada categoría Eeva® en función del día de la transferencia.

5.1.4.3 Distribución de embriones KID por categoría ASEBIR

Estos embriones también se clasificaron utilizando la clasificación morfológica de ASEBIR (*Figura 52*).

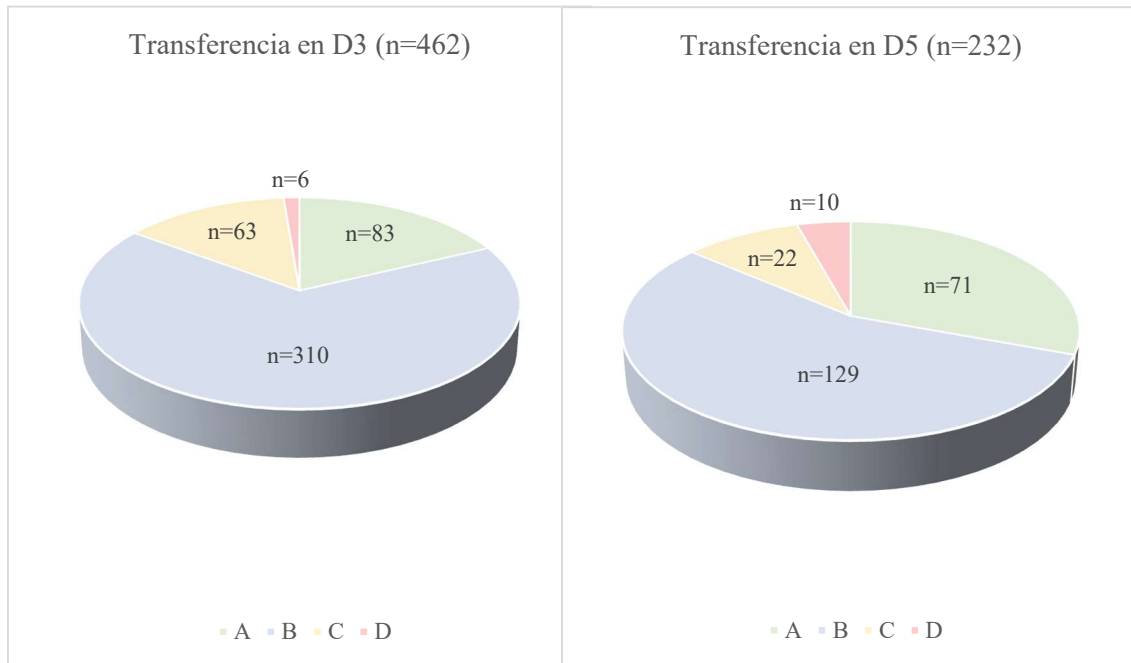


Figura 52: Distribución de embriones en cada categoría ASEBIR en función del día de la transferencia.

5.1.4.4 Tasa de implantación por categoría ASEBIR (TD3 y TD5)

La tasa de implantación según las categorías ASEBIR y distinguiendo el día de la transferencia se muestran a continuación (*Figura 53*).

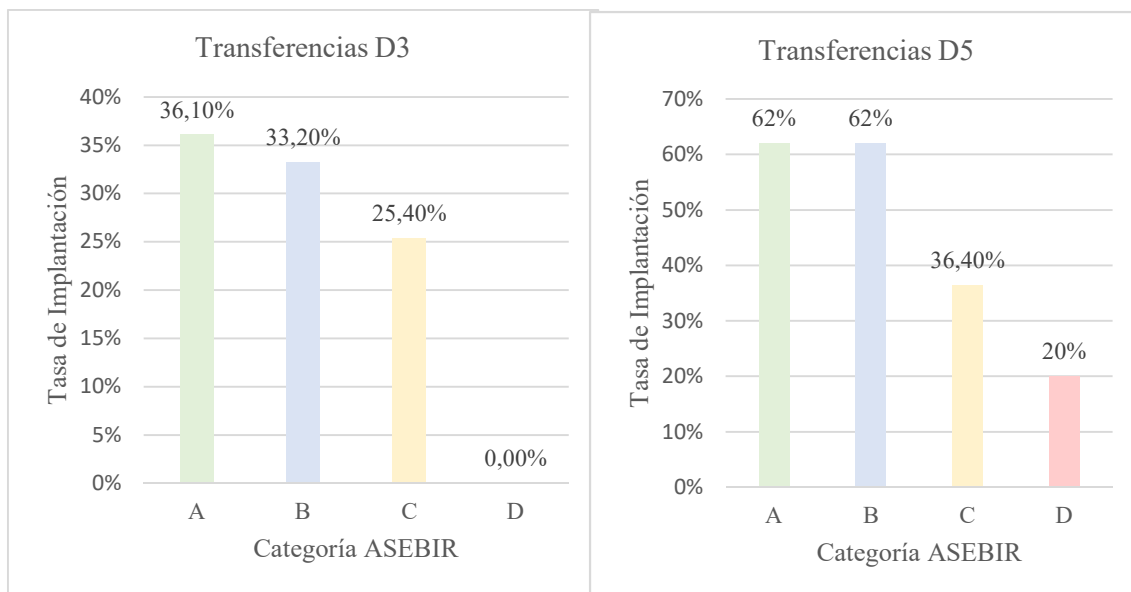


Figura 53: Tasa de implantación en cada categoría ASEBIR en función del día de la transferencia.

5.1.4.5 Regresión logística tasa de implantación

El potencial de implantación de los embriones en función de la categoría Eeva® también se analizó con un modelo de regresión logística.

Realizamos un análisis teniendo en cuenta el día de la transferencia (día 3 o día 5) y la clasificación morfológica de ASEBIR (*Tabla 3*).

Tasa de Implantación			
	OR	CI95%	
Medium vs Low	1,370	0,835-2,248	ns
<i>High</i> vs Low	2,238	1,441-3,475	<0,001
A vs C	1,062	0,529-2,133	ns
B vs C	1,450	0,791-2,657	ns
TD5 vs D3	2,171	1,436-3,282	<0,001

Tabla 3: Tasa de Implantación. Modelo de regresión logística.

El área bajo la curva para evaluar la predictividad para seleccionar embriones con un potencial de implantación más elevado combinando la clasificación del Eeva® y la morfológica fue 0,650 (IC95% 0,600-0,699) (Figura 54).

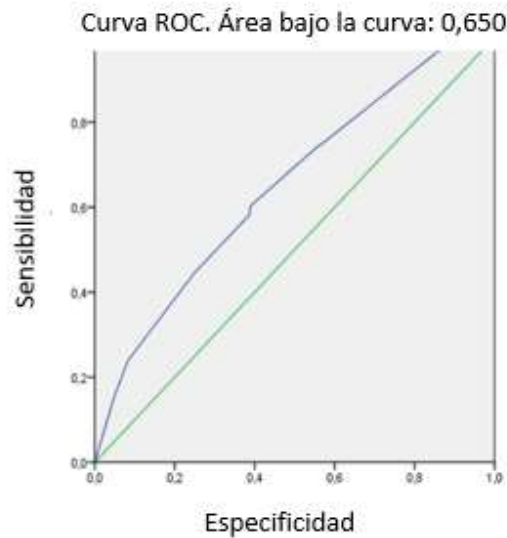


Figura 54: Curva ROC. Modelo ASEBIR-Eeva®

5.1.5 Tasa de Gestación

5.1.5.1 Tasa de gestación (TD3+TD5)

Para realizar el análisis de la tasa de gestación distinguimos los casos en los que se transfirió al menos un embrión categorizado con la mejor clasificación (“high” en el caso de Eeva® y A en el caso de ASEBIR), de las transferencias en las que ninguno de los embriones transferidos fue clasificado como “high” o A.

Hicimos un primer análisis con el fin de ver el resultado conjunto sin distinguir el día en el que se realizó la transferencia (Figura 55).

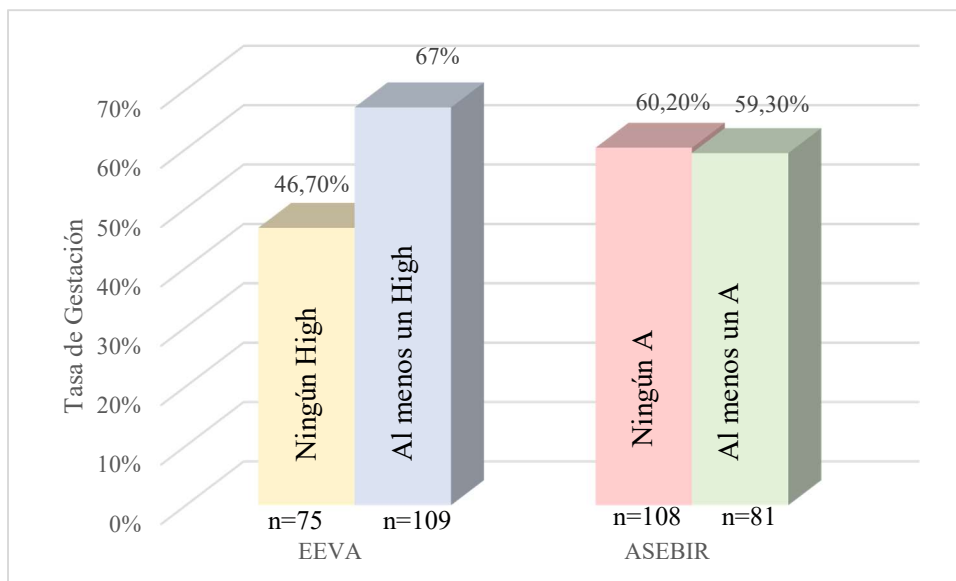
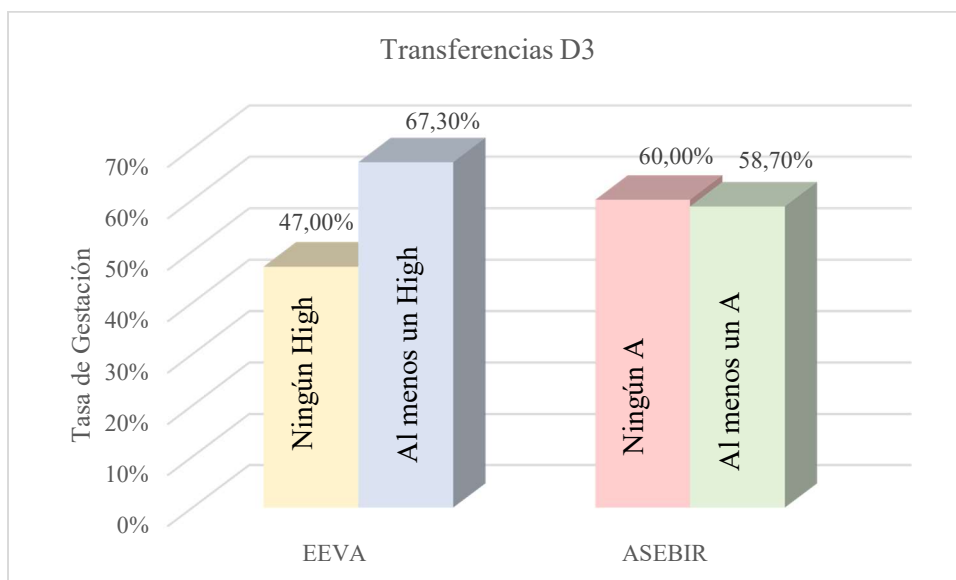


Figura 55: Tasa de gestación en función de la clasificación de los embriones (D3+D5).

5.1.5.2 Tasa de gestación TD3 y TD5 por separado

A continuación, realizamos un segundo análisis distinguiendo el día de la transferencia (*Figura 56*).



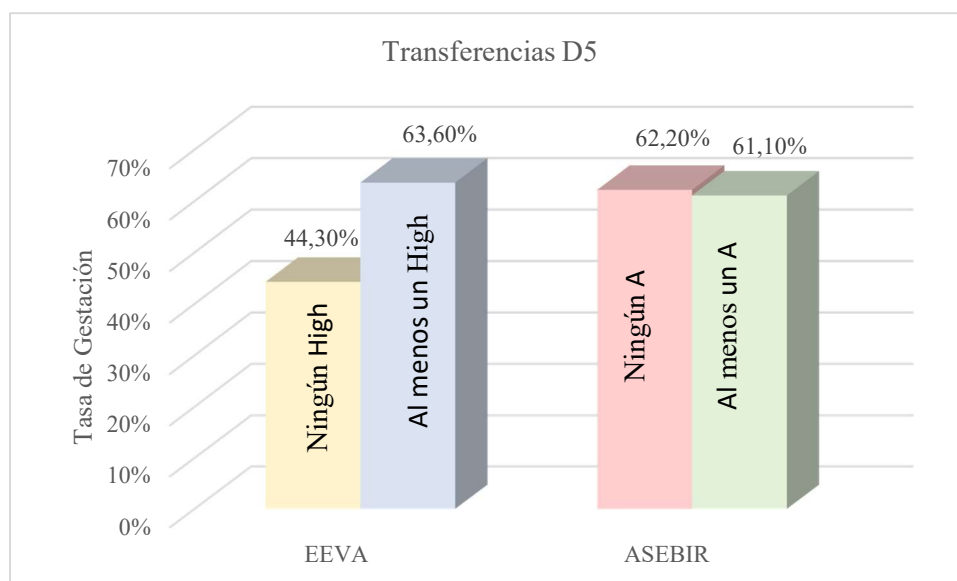


Figura 56: Tasa de gestación en función de la clasificación de los embriones transferidos en D3/D5.

5.1.5.3 Regresión logística tasa de gestación

La probabilidad de gestación en relación a la clasificación Eeva® también se analizó con un modelo de regresión logística, teniendo en cuenta el día del transfer (día 3 o día 5) y la clasificación morfológica de ASEBIR (Tabla 4).

TASA DE GESTACIÓN			
	OR	IC95%	
Al menos un “high”	2,567	1,302-5,062	<0,05
Al menos un A	0,563	0,268-1,182	ns
Transferencia D3/D5	0,795	0,244-2,597	ns

Tabla 4: Tasa de Gestación. Modelo de regresión logística.

5.2 ALGORITMO XTEND®

5.2.1 Distribución de embriones por categorías Xtend®

5.2.2 Tasa de blastocisto

5.2.2.1 Tasa de blastocisto por categoría Xtend®

5.2.2.2 Tasa de blastocisto óptimo por categoría Xtend®

5.2.2.3 Porcentaje de blastocisto óptimo por clasificación Xtend® agrupada

5.2.2.4 Porcentaje de blastocisto no óptimo por clasificación Xtend® agrupada

5.2.2.5 Regresión logística tasa de blastocisto

5.2.3 Tasa de Implantación

5.2.3.1 Distribución de embriones KID por categoría Xtend®

5.2.3.2 Tasa de implantación de embriones frescos y congelados por categoría Xtend®

5.2.3.3 Distribución de embriones KID por categorías Xtend® agrupadas

5.2.3.4 Tasa de implantación de embriones frescos y congelados por categorías Xtend® agrupadas

5.2.3.5 Tasa de implantación de blastocistos óptimos por categoría Xtend®

5.2.3.6 Tasa de implantación de blastocistos no óptimos por categoría Xtend®

5.2.3.7 Tasa de implantación de blastocistos frescos y congelados por separado

5.2.3.8 Regresión logística tasa de implantación

5.2.4 Humedad y categorías Xtend®

5.2.5 Diagnóstico genético relacionado con categorías Xtend®

5.2.1 Distribución de embriones por categoría Xtend®

En esta parte del estudio, analizamos 3001 embriones, que fueron clasificados de acuerdo a los nuevos parámetros del algoritmo Xtend® en 5 categorías diferentes.

Los embriones presentaron una distribución bastante homogénea en las distintas categorías.

A continuación, mostramos la distribución de dichos embriones según la categoría Xtend® (Figura 57).

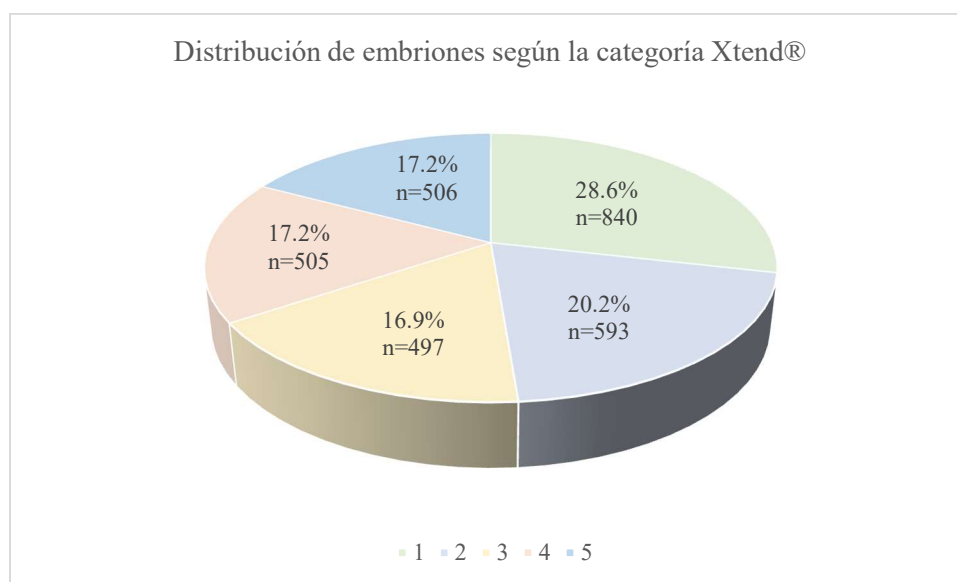


Figura 57: Porcentaje de embriones en cada categoría Xtend®.

5.2.2 Tasa de blastocisto

5.2.2.1 Tasa de blastocisto por categoría Xtend®

La tasa de llegada a blastocisto global sin tener en cuenta la categoría Xtend® fue de un 73.6%.

Se observó un aumento de la tasa de llegada a blastocisto a medida que mejora la categoría Xtend® (Figura 58).

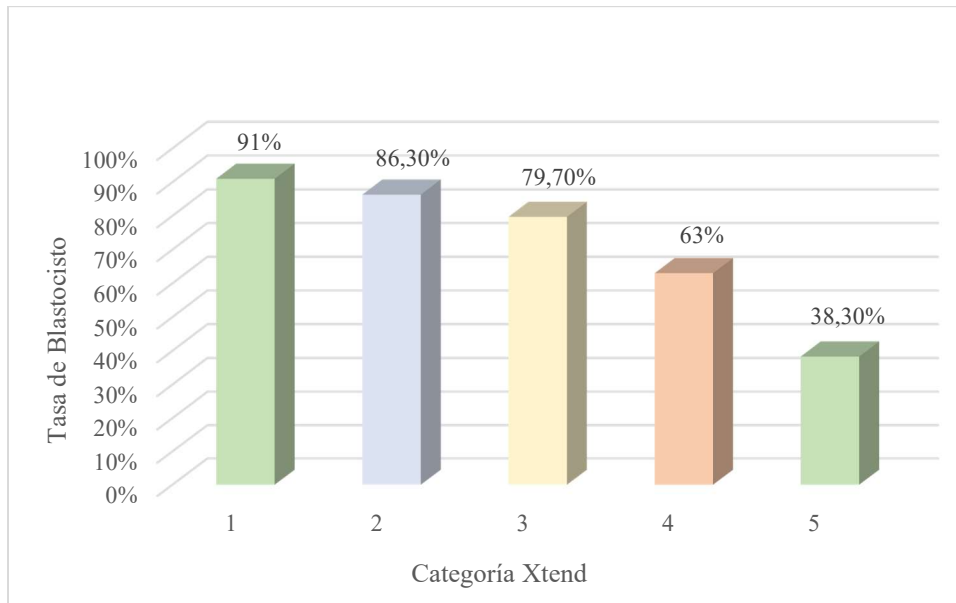


Figura 58: Tasa de blastocisto en cada categoría Xtend®.

5.2.2.2 Tasa de blastocisto óptimo por categoría Xtend®

Independientemente del día que el embrión llegara a blastocisto (D5 o D6), analizamos el porcentaje de blastocistos de buena calidad morfológica (A o B) en cada categoría (*Figura 59*).

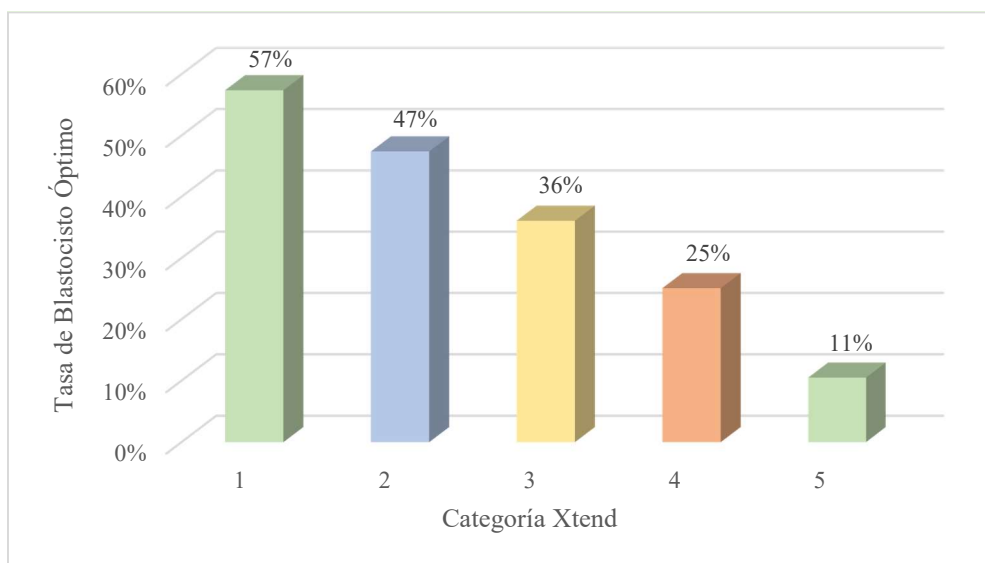


Figura 59: Tasa de blastocisto de calidad óptima en cada categoría Xtend®.

Observamos cómo, al analizar la calidad de los blastocistos, no solamente nos encontramos con un mayor porcentaje de blastocistos en las primeras categorías, sino que el porcentaje de blastocistos de calidad A y B es claramente superior y va disminuyendo a medida que la clasificación empeora.

5.2.2.3 Porcentaje de blastocisto óptimo por clasificación Xtend® agrupada

Viendo una clara tendencia de mejora en las tres categorías superiores, agrupamos éstas analizando el porcentaje de blastocistos de calidad A/B en los casos en los que los embriones fueran clasificados como 1, 2 ó 3, y lo comparamos con el porcentaje de blastocistos de calidad óptima cuando la clasificación de los embriones por el modelo Xtend® había sido 4 ó 5.

En los diagramas mostrados podemos ver unas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) con un 83,9 % de los blastocistos de calidad óptima clasificados como 1-2-3, y solamente un 16,1 % de estos blastocistos A/B categorizados como 4-5 por parte del Xtend® (Figura 60).

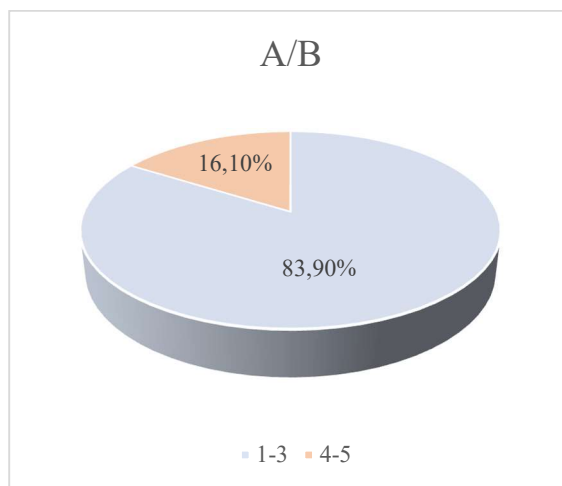


Figura 60: Distribución de embriones óptimos por categoría Xtend agrupada.

5.2.2.4 Porcentaje de blastocisto no óptimo por clasificación Xtend® agrupada

En cambio, cuando la clasificación morfológica de los blastocistos no era buena (no A/B), no observamos diferencias significativas respecto a la clasificación proporcionada por el sistema Xtend®, clasificándose aproximadamente la mitad de ellos en cada grupo de categorías agrupadas Xtend® (Figura 61).

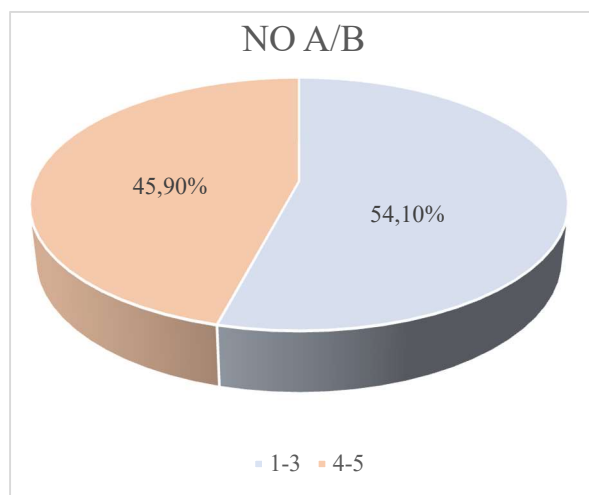


Figura 61: Distribución de los blastocistos según su calidad en categorías Xtend® agrupadas.

5.2.2.5 Regresión logística tasa de blastocisto

Con el fin de cuantificar y comparar la probabilidad de llegada a blastocisto de los embriones clasificados en las diferentes categorías, realizamos un análisis de regresión logística. Para ello comparamos cada categoría EEVA con la inferior (categoría 5) (Tabla 5).

Categoría Xtend®	OR	IC 95%	p	
1 vs 5	16,167	12,023-21,739	0	s
2 vs 5	10,166	7,568-13,654	0	s
3 vs 5	6,303	4,743-8,376	0	s
4 vs 5	2,782	2,156-3,589	0	s

Tabla 5: Probabilidad de llegada a blastocisto según categoría Xtend®. Modelo de regresión logística.

Observamos diferencias estadísticamente significativas en todas las categorías destacando que, en las dos primeras, la probabilidad de que un embrión clasificado como 1-2 por *Xtend*® llegue a estadio de blastocisto es más de 10 veces superior a que llegue un embrión que ha sido clasificado como 5.

Realizamos otro análisis de regresión logística en este caso con las calidades de los blastocistos. En este caso analizamos la probabilidad de que los embriones alcanzaran el estadio de blastocisto con una calidad óptima (A-B) independientemente de que lo hicieran en día 5 o 6 de desarrollo (*Tabla 6*).

Categoría <i>Xtend</i> ®	OR	IC 95%	p	
1 vs 5	11,508	8,392-15,779	0	s
2 vs 5	7,698	5,551-10,676	0	s
3 vs 5	4,837	3,445-6,791	0	s
4 vs 5	2,872	2,027-4,069	0	s

Tabla 6: Probabilidad de llegada a blastocisto de calidad óptima según categoría *Xtend*®.
Modelo de regresión logística

En este caso volvemos a observar diferencias estadísticamente significativas respecto a la categoría inferior. La probabilidad de que un embrión clasificado como 1 ó 2 alcance el estadio de blastocisto y además ese blastocisto tenga una calidad óptima es claramente superior a la probabilidad de que eso suceda si el embrión ha sido clasificado como 5.

5.2.3 Tasa de Implantación

5.2.3.1 Distribución de embriones KID por categoría Xtend®

Analizamos la tasa de implantación de los blastocistos según su categoría *Xtend*®. Para dicho análisis solamente incluimos aquellos embriones de implantación conocida (KID). No distinguimos tampoco en este apartado si las transferencias habían sido en fresco o embriones que habían sido sometidos previamente a un procedimiento de vitrificación (*Figura 62*).

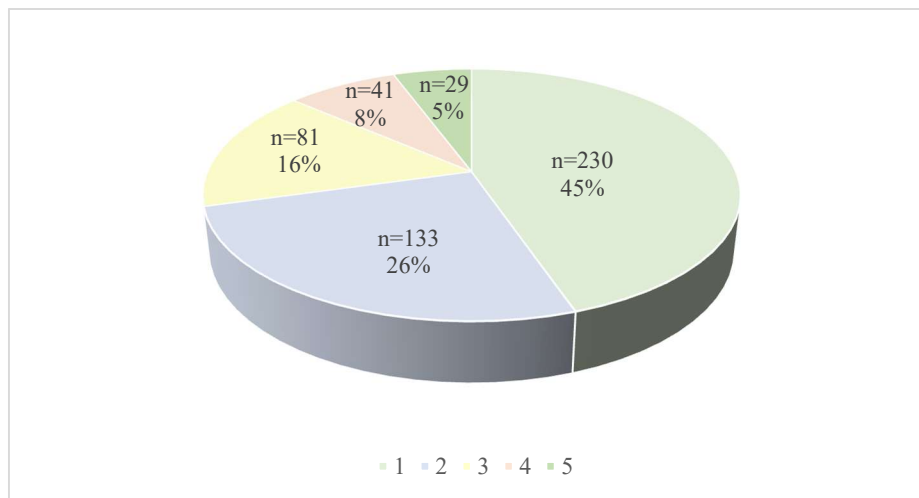


Figura 62: Distribución embriones KID en cada categoría Xtend®.

5.2.3.2 Tasa de implantación de embriones frescos y congelados por categoría Xtend®

La tasa de implantación disminuye claramente cuando la categoría *Xtend*® es inferior (*Figura 63*).

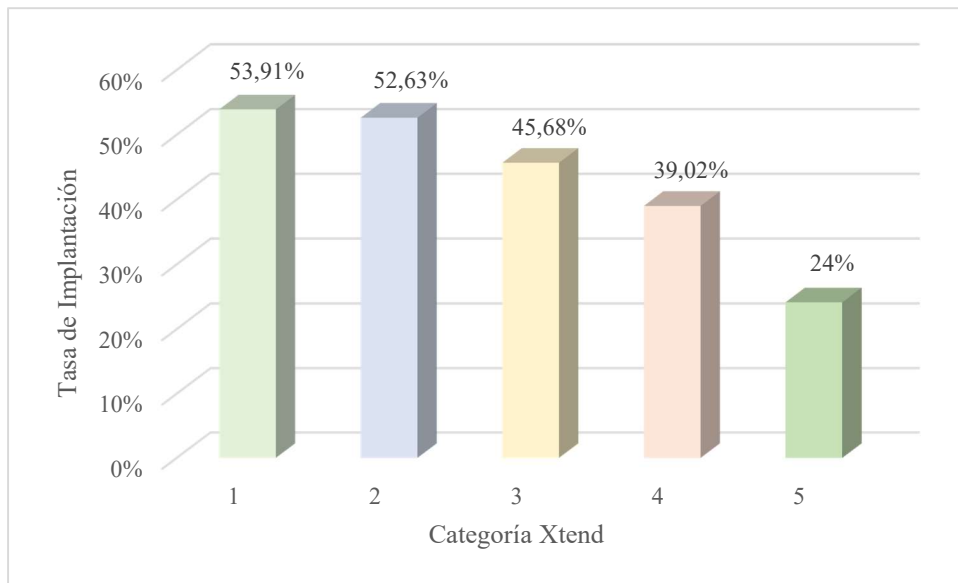


Figura 63: Tasa de implantación de embriones frescos y congelados en cada categoría Xtend® ($p=0,017$).

5.2.3.3 Distribución de embriones KID por categorías Xtend® agrupadas

Realizamos también este mismo análisis de tasa de implantación agrupando las categorías Xtend®. Se ve en este caso de forma todavía más clara que el número de blastocistos KID era mucho más elevado en el grupo 1-3 (Figura 64).

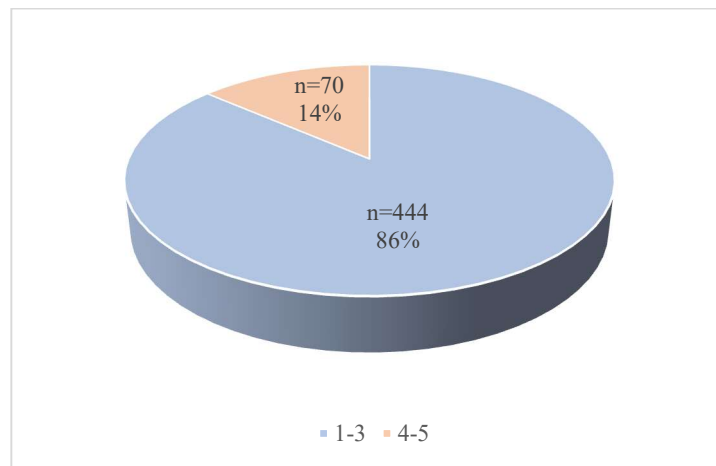


Figura 64: Distribución de embriones KID en cada categoría Xtend® agrupada.

5.2.3.4 Tasa de implantación de embriones frescos y congelados por categorías Xtend® agrupadas

Observamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de implantación entre ambos grupos al agrupar las categorías Xtend® (Figura 65).

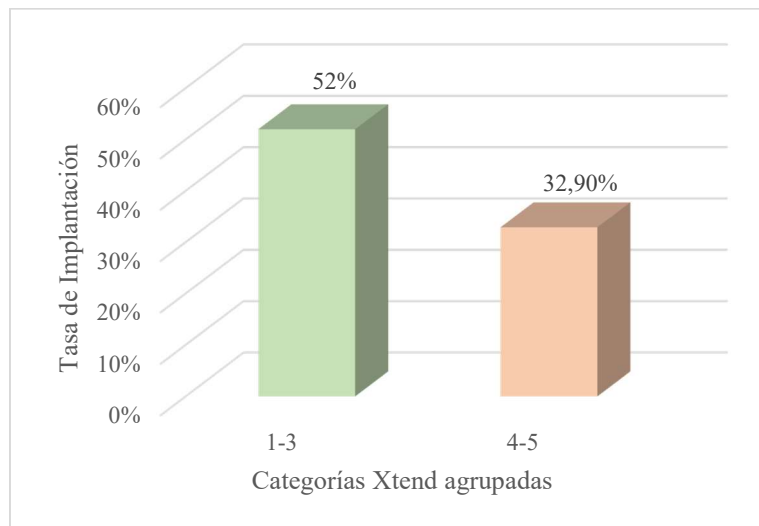


Figura 65: Tasa de implantación en las categorías Xtend® agrupadas ($p=0.003$).

5.2.3.5 Tasa de implantación de blastocistos óptimos por categoría Xtend®

Analizamos por un lado la tasa de implantación de blastocistos de calidad A/B según su categoría Xtend® (Figura 66).

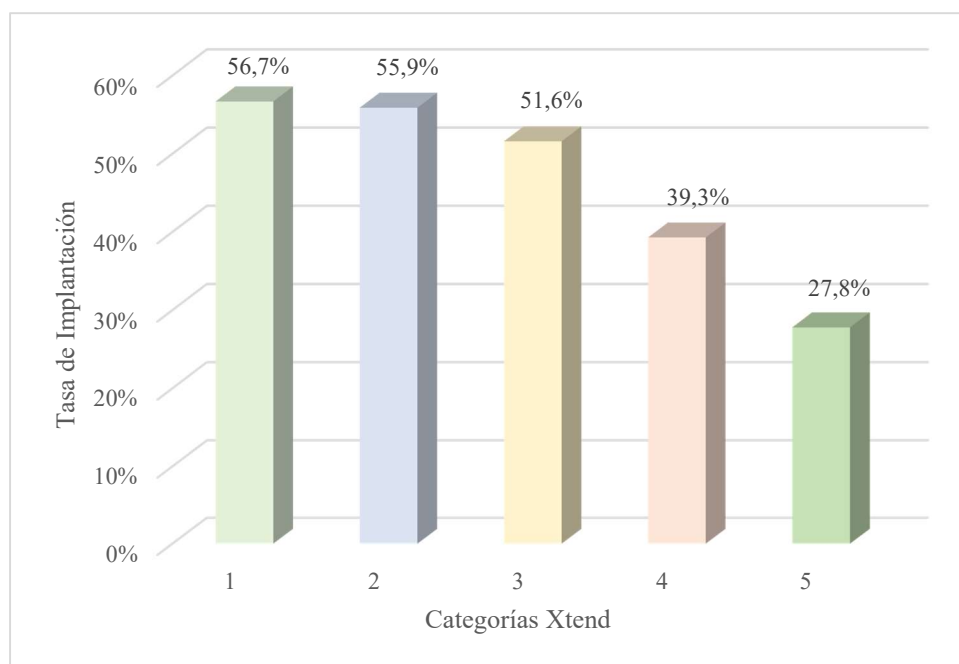


Figura 66: Tasa de implantación en blastocistos KID de calidad A/B según su categoría Xtend® ($p=0.084$).

La tasa de implantación en blastocistos que tienen una buena calidad morfológica aumenta a medida que mejora la clasificación Xtend®, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas.

5.2.3.6 Tasa de implantación de blastocistos no óptimos por categoría Xtend®

Analizamos también aquellos embriones que no tenían una clasificación morfológica óptima, es decir, que no eran categoría A/B (Figura 67).

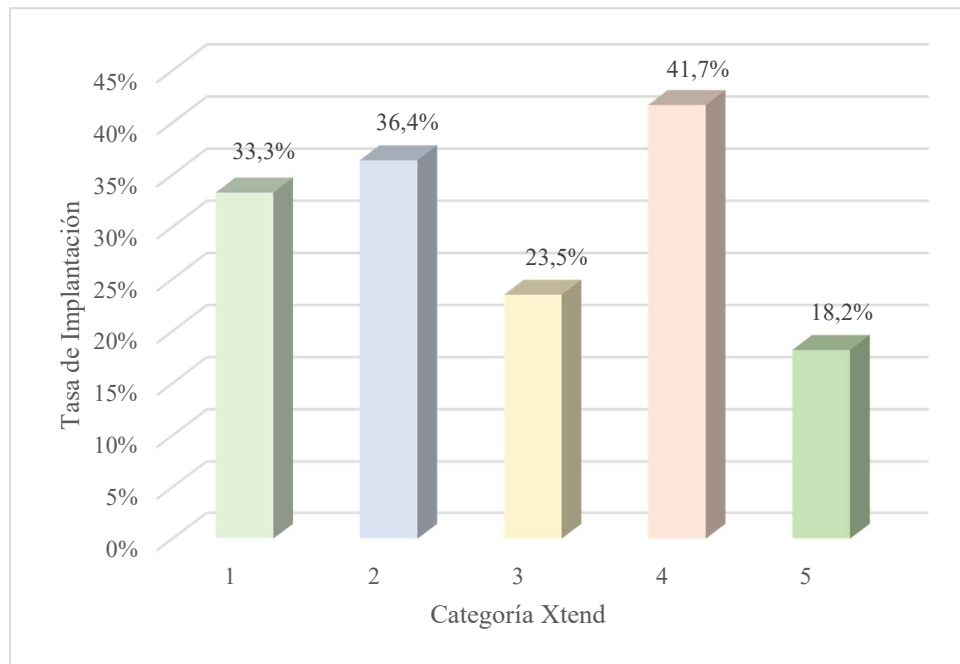


Figura 67: Tasa de implantación en blastocistos KID que no eran de calidad A/B según su categoría Xtend® ($p=0.687$).

En los blastocistos que no eran de calidad óptima, no se encontraron diferencias en la tasa de implantación según las categorías Xtend®.

5.2.3.7 Tasa de implantación de blastocistos frescos/congelados

Por otra parte, realizamos los análisis separando las transferencias de embriones en fresco de las transferencias de embriones congelados. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Se analizó la tasa de implantación de estos blastocistos transferidos en fresco distinguiendo su categoría Xtend® (Figura 68).

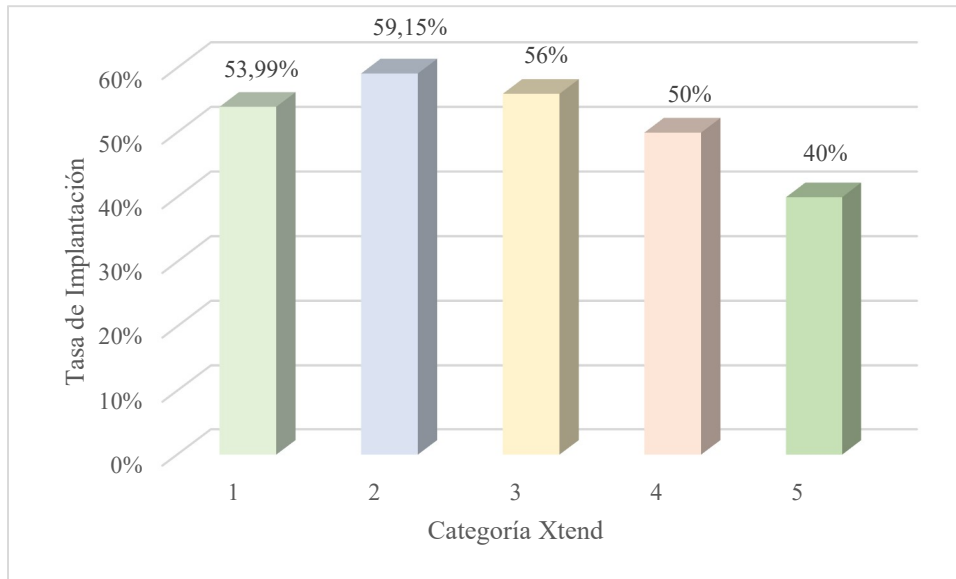


Figura 68: Tasa de implantación en blastocistos KID frescos según su categoría Xtend ($p < 0.05$).

Este mismo análisis se realizó en blastocistos que habían sido sometidos a un proceso de vitrificación previo (*Figura 69*).

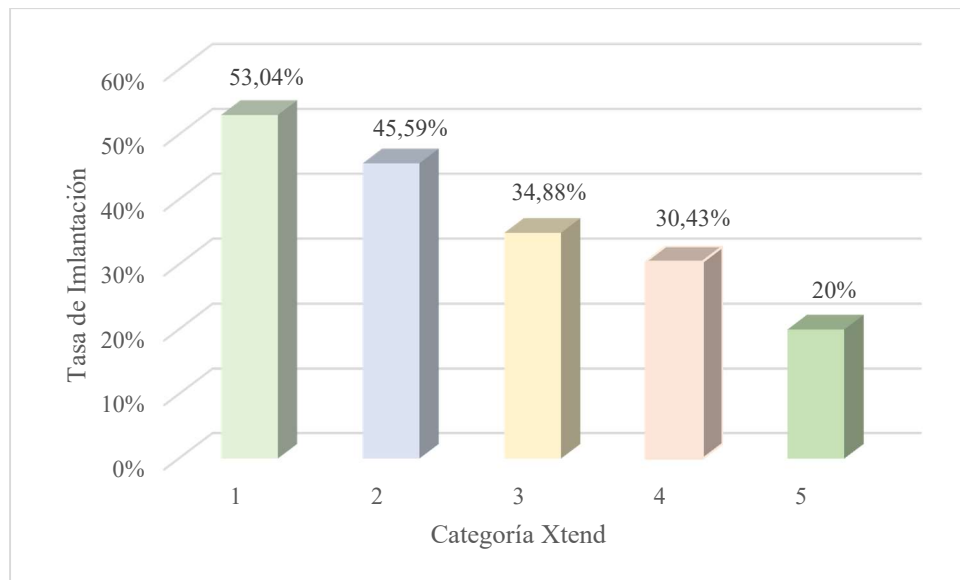


Figura 69: Tasa de implantación en blastocistos KID desvitrificados según su categoría Xtend® ($p = 0.019$).

5.2.3.8 Regresión logística tasa de implantación

Realizamos un modelo de regresión logística de la tasa de implantación incluyendo la calidad de los blastocistos y la categoría *Xtend*® (Tabla 7).

	OR	IC 95%	p
Blastocisto A/B vs no A/B	2,303	1,407-3,772	0,01
<i>Xtend</i> ® 1-3 vs 4-5	1,917	1,111-3,308	0,019

Tabla 7: Implantación según la calidad de los blastocistos y de la categoría *Xtend*®. Modelo de regresión logística.

Observamos diferencias estadísticamente significativas en las dos variables analizadas. La tasa de implantación aumentaba más del doble en los casos en los que los blastocistos fueran de calidad óptima respecto a los casos en los que los blastocistos no fueran de calidad óptima. Del mismo modo, la tasa de implantación también eran casi el doble en blastocistos categorizados como 1-3 en comparación con blastocistos que habían sido clasificados por *Xtend*® como 4-5.

Comparamos la tasa de implantación respecto a las categorías inferiores con un modelo de regresión logística (*Tabla 8*).

	OR	IC 95%	p	
Categoría ASEBIR				
A vs C	1,915	0,506-7,241	0,339	ns
B vs C	1,041	0,296-3,659	0,951	ns
Categoría Xtend®				
1 vs 5	2,148	0,437-10,570	0,347	ns
2 vs 5	2,553	0,489-13,316	0,266	ns
3 vs 5	2,454	0,452-13,339	0,299	ns
4 vs 5	2,346	0,395-13,932	0,348	ns
Nº ovocitos MII	1,044	0,920-1,185	0,508	ns
IMC	0,989	0,919-1,064	0,77	ns
Nº embriones congelados	0,912	0,790-1,054	0,213	ns

Tabla 8: Modelo de regresión logística de la tasa de implantación considerando categorías ASEBIR, Xtend®, número de ovocitos, IMC y número de embriones congelados.

Como observamos en la tabla, ninguno de los parámetros analizados es estadísticamente significativo respecto a la tasa de implantación.

5.2.4 Humedad y categorías Xtend®

Analizamos el porcentaje de embriones según las diferentes categorías *Xtend*® en un grupo con humedad y sin humedad (*Tabla 9*).

		Categoría <i>Xtend</i> ®					TOTAL
		1	2	3	4	5	
Húmedo	n	132	124	99	102	104	561
	%	23,50%	22,10%	17,60%	18,20%	18,50%	
	CI95%	19,99- 27,01	18,67- 25,53	14,45- 20,75	15,01- 21,39	15,29- 21,71	
Seco	n	119	86	58	80	112	455
	%	26,20%	18,90%	12,70%	17,60%	24,60%	
	CI95%	22,16- 30,24	15,30- 22,50	9,64-15,76	14,10- 21,10	20,64- 28,56	

Tabla 9: Número de blastocistos incubados en ambiente húmedo o seco según su categoría *Xtend*®.

A continuación, hicimos lo mismo, pero agrupando las categorías *Xtend*® en dos grupos (*Tabla 10*).

		Categoría <i>Xtend</i> ®		TOTAL
		1-3	4-5	
Húmedo	n	355	206	561
	%	63,30%	36,70%	
	IC95%	59,31-67,29	32,71-40,69	
Seco	n	263	192	455
	%	57,26%	42,20%	
	IC95%	53,26-62,34	37,66-46,74	

Tabla 10: Número de blastocistos incubados en ambiente húmedo o seco según su categoría *Xtend*® agrupada.

Observamos que, en el grupo con humedad, el número de embriones clasificados con las mejores categorías del *Xtend*® es más elevado que en la incubación en ambiente seco.

5.2.5 Diagnóstico genético relacionado con categorías *Xtend*®

Analizamos el número de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto con una calidad adecuada para poder ser biopsiados (*Figura 70*).

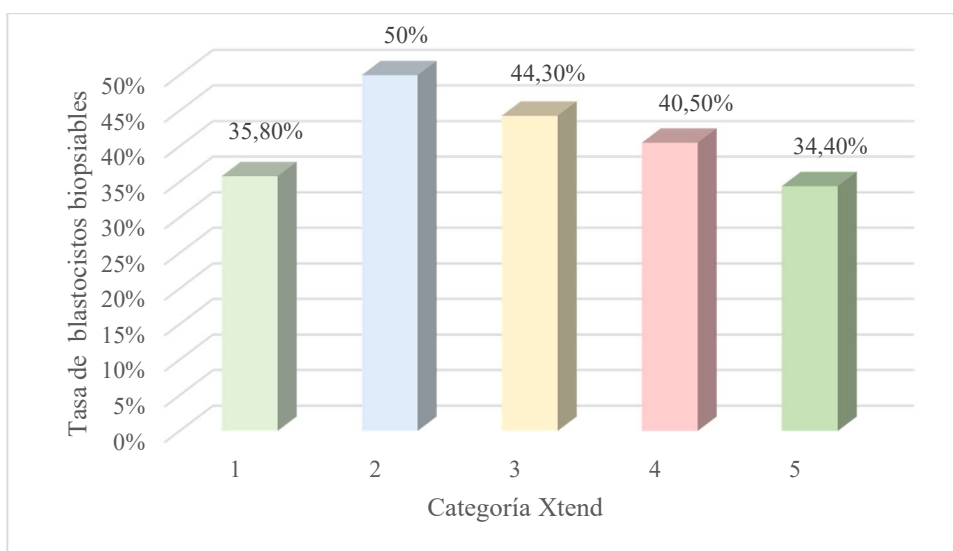


Figura 70: Tasa de blastocistos biopsiables en cada categoría *Xtend*®

Podemos observar una tendencia a un mayor porcentaje de blastocistos biopsiables en las categorías Xtend® superiores.

Realizamos un segundo análisis con el resultado final del análisis cromosómico de los blastocistos, estudiando el porcentaje de euploides en cada categoría Xtend® (Figura 71).

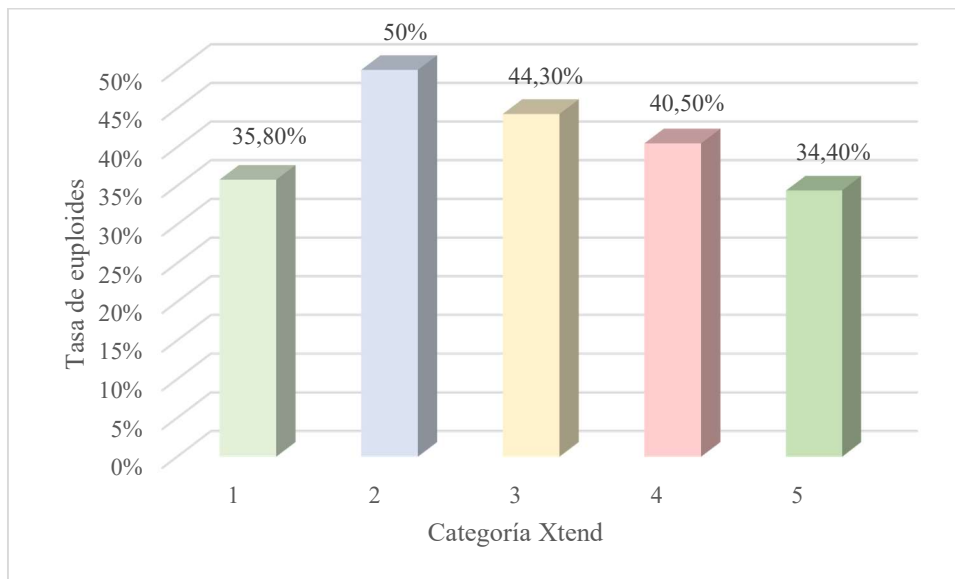


Figura 71: Tasa de blastocistos euploides en cada categoría Xtend®

En este caso no se observó ningún tipo de correlación entre el porcentaje de embriones euploides en función de la categoría Xtend.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

No hay ninguna duda de que el time-lapse se ha convertido en una herramienta prometedora en la mayor parte de los laboratorios FIV.

Lo primero que nos preguntamos respecto a los estudios previos de time-lapse es por qué algunos de ellos no han encontrado diferencias en la tasa de gestación cuando comparan los resultados entre incubadores con time-lapse e incubadores convencionales.

La respuesta es sencilla en el caso del trabajo de Cruz *et al.* (47). Compararon los resultados entre ambos incubadores mediante la selección embrionaria únicamente basada en la morfología, todo ello con la idea de demostrar la implementación del Embryoscope® como una herramienta más de trabajo.

En el caso del trabajo de Mio y Maeda (91) el objetivo era sólo observar los cambios durante el desarrollo de los embriones, sin tener en cuenta parámetros cinéticos y por tanto, no reflejándose diferencias en la tasa de embarazo. En cambio, en el momento que se combinan la morfología con la cinética como complemento para la selección embrionaria, como el trabajo de Meseguer *et al.* (53), se ve incrementada la tasa de gestación.

Como hemos comentado con anterioridad, el grupo de Kieslinger (77) tampoco encontró diferencias en tasa de gestación entre ciclos incubados con time-lapse, en este caso en Eeva® respecto al incubador convencional. Sin embargo, hay que señalar en cuanto a estos resultados, que no se analizaron factores de confusión y que el grupo del incubador convencional tenía un número más elevado de donantes de semen y de embriones de buena calidad morfológica, además de que el estudio fue realizado en pacientes con ovocitos propios.

Los sistemas de monitorización continua mediante time-lapse proporcionan una información muy valiosa extra porque podemos obtener una película del desarrollo embrionario completo captando parámetros clave de las divisiones embrionarias, así

como identificando marcadores dinámicos y reduciendo el proceso de manipulación y por tanto, de costes.

Además, la información aportada por los sistemas time-lapse resulta útil para la identificación y exclusión de embriones que serían considerados viables con los sistemas convencionales estáticos, pero que presentan patrones de división anormales. Aunque la selección embrionaria basada en la morfocinética no garantiza la total normalidad cromosómica de los embriones, ha sido publicado que la mayoría de los embriones con divisiones celulares anormales muestran múltiples aneuploidías, pudiendo ser esta dotación cromosómica alterada la causa de estos desórdenes respecto a los patrones óptimos de división celular (92).

El embriólogo tiene más parámetros en que basarse para la selección embrionaria, obteniendo una combinación entre la morfología y los nuevos parámetros basados en la cinética, la cual, proporcionará una mejor selección embrionaria y, por tanto, unos mejores resultados. Se ha publicado en numerosas ocasiones que la duración y la sincronía de las primeras divisiones embrionarias tienen un valor predictivo respecto al desarrollo potencial del embrión. Si estos resultados se confirman con otros estudios, deberíamos tener en cuenta la ventaja que supone la transferencia de embriones en estadio de células, implicando menos días de cultivo, y, por tanto, menos gasto de laboratorio, así como un menor tiempo de exposición a las condiciones artificiales in vitro, lo cual, puede estar asociado a problemas epigenéticos.

Los algoritmos elaborados para la selección embrionaria varían entre los distintos grupos de trabajo. Probablemente esto sea debido a que los parámetros usados en cada caso no son exactamente los mismos. Sin embargo, podemos destacar algunos puntos en común que es importante resaltar:

Si analizamos los tres parámetros que aparecen como predictivos en cuanto a tasa de implantación en el estudio de Wong, éstos se confirman en otros estudios. Los tiempos entre la primera y segunda mitosis así como la sincronía entre la segunda y tercera mitosis, que fueron parámetros definidos como relevantes en el algoritmo de Meseguer (61), son casi idénticos a los presentados por Wong (41).

Además, el grupo de Hashimoto (64) señaló que los blastocistos de mejor calidad morfológica precisaban menores tiempos para completar la segunda y tercera división, lo cual confirma los resultados de Wong.

Dal Canto *et al.* (65) encontraron mayor relevancia en las divisiones más tardías (7 y 8 células (t7 y t8)) que las tempranas. Sin embargo, Meseguer *et al.* (61) observaron que t5 era el parámetro más relevante sin tener en cuenta tiempos de divisiones celulares posteriores. A pesar de que estas dos afirmaciones pueden parecer contradictorias, ambas divisiones corresponden al mismo ciclo celular por lo que realmente no son tan discrepantes. Conforme el embrión va evolucionando y el número de células va aumentando, la dificultad de evaluar los tiempos exactos de las divisiones celulares es cada vez mayor. Por ello, los tiempos de las divisiones a partir de 5 o 6 células pueden resultar menos precisos, sobre todo si el embrión presenta algo de fragmentación.

De este modo, podemos ver que a pesar de que los objetivos o resultados parecen variar entre estudios, sí que existe un consenso en cuanto a los parámetros definidos como marcadores relevantes de selección embrionaria.

Estos estudios requieren validación multicéntrica ya que los diferentes algoritmos no han sido comprobados ni validados todavía con diferentes instrumentos de time-lapse. Es necesario el desarrollo de futuros estudios capaces de proporcionar resultados con el fin de unificar criterios y definir marcadores cinéticos universales entre diferentes laboratorios.

Diferentes estudios se han centrado en reproducir los patrones predictivos proporcionados por los diferentes algoritmos morfocinéticos que clasifican los embriones en función de su potencial de implantación.

- El grupo de Freur (93) no pudo replicar con éxito un modelo que había sido publicado para predecir la implantación basado en variables morfocinéticas.
- Liu y colaboradores(94), tras un intento fallido de reproducir un algoritmo morfocinético relacionado con implantación, concluyeron que los algoritmos morfocinéticos basados en parámetros cuantitativos podían variar entre

laboratorios pero resaltaron que las medidas cualitativas mejoran la reproducibilidad dentro de un laboratorio.

- El grupo de Storr (95) y el de Barrie (60) realizaron un análisis con el fin de determinar las diferentes clasificaciones proporcionadas por distintos algoritmos sobre embriones con implantación conocida. Tras los resultados obtenidos, ambos destacaron la necesidad de validar siempre con datos de cada laboratorio antes de la utilización de cualquier algoritmo para determinar el mejor para cada clínica.
- Un metanálisis reciente publicado con Pribensky (96) confirma el valor de la selección embrionaria utilizando la morfocinética, mostrando mejor tasa de gestación y de recién nacido vivo así como una disminución en la tasa de aborto.
- El grupo de Adolfsson (97) demostró que la tecnología del time-lapse supone una disminución en la variabilidad en cuanto a la evaluación embrionaria por parte de los embriólogos. También trataron de validar el algoritmo de Meseguer (53) sin demasiado éxito. Afirman que su falta de reproducibilidad podría ser debida a una diferencia en los protocolos de estimulación utilizados, o a que también incluyeron ciclos de fecundación convencional y unos niveles de oxígeno diferentes mostrando en general en su estudio unos tiempos de división de los embriones más rápidos.

Nuestro objetivo principal en la presente tesis doctoral fue la validación de los algoritmos proporcionados por el sistema Eeva® para demostrar la utilidad de esta clasificación con los datos de nuestro propio laboratorio.

Además del algoritmo morfocinético, también validamos las anotaciones automáticas proporcionadas por el sistema ya que tal y como afirmó Mölder (98), la automatización permite a los embriólogos centrar sus conocimientos y habilidades en otras tareas que no sean la anotación manual de las imágenes adquiridas. A pesar de que el sistema tiene una herramienta para corregir las anotaciones automáticas proporcionadas por el software, optamos por no utilizarla en nuestro estudio para validar no solamente el algoritmo sino la automatización.

Este estudio presenta el mayor número de embriones analizados con el sistema Eeva® hasta la fecha, como podemos observar en la introducción del presente trabajo.

Primer algoritmo Eeva®

Los resultados obtenidos muestran una correlación directa con la tasa de blastocistos y el porcentaje de blastocistos óptimos de acuerdo a las diferentes categorías establecidas.

Otro de los análisis realizados fue el día en que los embriones llegaban a estadio de blastocisto. Los resultados muestran claramente cómo la mayor parte de los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto lo hacen en día 5 de desarrollo. Pero además podemos destacar que esto es más evidente en las categorías superiores. El 90% de los embriones “*high*” clasificados como óptimos alcanzan este estadio en día 5 encontrando un porcentaje muy bajo de blastocistos óptimos “*high*” en día 6. La tasa de implantación en nuestro laboratorio es más elevada en día 5 que en día 6 de desarrollo por lo que esta clasificación también parece aportarnos información del potencial de los embriones, con una mayor capacidad de alcanzar el estadio de blastocisto en D5, mientras que en la categoría “*low*” aparecen más blastocistos óptimos que necesitan un día más de cultivo y por tanto un potencial de implantación inferior.

Tal y como comentaba Kirkegaard (99), es muy importante tener en cuenta que una elevada proporción de los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto finalmente no implantan por ello en este estudio utilizamos la calidad de los blastocistos, la tasa de implantación y de gestación como variables finales analizadas. Directamente relacionados con la tasa de blastocisto, observamos una tasa de implantación significativamente más elevada en los embriones con una clasificación mejor.

En cuanto a la tasa de gestación, como no todas las transferencias fueron “*puras*” en cuanto a la clasificación de los embriones transferidos y su categoría, analizamos que al menos uno de los embriones fuera categorizado como “*high*” o como “*A*”. Los resultados muestran diferencias significativas cuando al menos uno de los embriones es clasificado como “*high*” pero estas diferencias no aparecen si al menos uno de ellos se clasifica como “*A*”.

Kirkegaard también critica que muchos de los estudios publicados no tienen en cuenta posibles factores de confusión a la hora de analizar los resultados. En nuestro caso, analizamos el peso que tenía la clasificación según el sistema Eeva® en la tasa de llegada a blastocisto, implantación y gestación con algunos factores de confusión. Los factores de confusión incluidos en el análisis fueron aquellos que sabemos con certeza que están relacionados con la tasa de gestación en nuestro programa de ovodonación.

Observamos diferencias estadísticamente significativas, con el doble de posibilidades de un embrión “*high*” de llegar a blastocisto que uno “*low*”. En cuanto a la clasificación ASEBIR aparece que los embriones clasificados como A también tienen mayor probabilidad de llegada a blastocisto confirmando que la morfología juega un papel importante en la selección embrionaria. Los resultados de este análisis confirmaron que las transferencias en estadio de blastocisto tienen una tasa de implantación más elevada que aquellas en las que se transfieren embriones en día 3 de desarrollo, a pesar de que estas diferencias no son estadísticamente significativas en tasa de gestación, seguramente debido a que en este caso el número de embriones es más bajo. Finalmente, el otro factor de confusión analizado era la categoría morfológica de ASEBIR, mostrando que los embriones clasificados como A tenían una tasa de implantación mayor, pero no con diferencias significativas, que los clasificados como C, que no aparece tampoco como significativo al analizar la tasa de gestación.

Además, al desarrollar el modelo predictivo comparando la capacidad predictiva de la morfología de ASEBIR frente a la categorización Eeva® observamos una moderada utilidad de ambas clasificaciones pero mostrando un valor predictivo mejor de la categorización Eeva®.

Todos estos análisis se llevaron a cabo con un modelo de regresión logística multivariable que mostró que todas las variables eran independientes entre sí. Por lo tanto, nuestra conclusión ante estos resultados es que la morfología es esencial y que no debemos tomar decisiones a ciegas basando la selección embrionaria solamente en la cinética pero que la clasificación Eeva® proporciona información extra que puede mejorar el proceso de selección ya que no todos los embriones clasificados morfológicamente como A por ASEBIR van a ser categorizados como “*high*”. Por lo

tanto, una combinación de estas clasificaciones es necesaria para mejorar la decisión final y la eficacia del ciclo.

Algoritmo Xtend®

En el caso del algoritmo Xtend® también podemos observar una correlación entre la tasa de blastocisto y de blastocisto óptimo en cada categoría. Tal y como ocurría con el primer algoritmo, podemos observar al combinar las categorías ASEBIR y Xtend® que no todos los embriones con una mejor clasificación ASEBIR se corresponden con los mejor clasificados por parte del Eeva® demostrando que la combinación de ambas clasificaciones es la mejor opción para la selección embrionaria.

En esta parte podemos observar cómo la categorización Xtend® se correlaciona con una mejor tasa de implantación en las categorías superiores en el caso de que los blastocistos sean de calidad óptima.

En embriones con peor calidad morfológica esta clasificación no resulta útil porque no observamos ningún tipo de correlación. Esto nos sirve por lo tanto para concluir que la combinación de ambas clasificaciones es especialmente útil en embriones de buena calidad.

Se trata del primer análisis hasta la fecha que ha estudiado la correlación de las categorías del algoritmo Xtend® en función de la humedad de incubación. Actualmente todavía existe controversia en cuanto al nivel óptimo de humedad ya que el riesgo de contaminación por crecimiento de microorganismos es más elevado en un ambiente húmedo. En un ambiente seco, a pesar de que las placas van recubiertas de aceite, existe una evaporación del medio que puede alterar su osmolaridad y por lo tanto las condiciones óptimas para el desarrollo embrionario. Además, no debemos olvidar que, in vivo, los embriones se desarrollan en un ambiente húmedo. Los resultados muestran que el porcentaje de embriones clasificados como mejores (1-3) es más alto en humedad que en seco.

En cuanto a los blastocistos que fueron analizados genéticamente, también pudimos observar una correlación con el algoritmo Xtend®. En las categorías superiores observamos que el porcentaje de blastocistos que pudieron biopsiarse era superior que en

las categorías inferiores. Una vez realizado el análisis genético observamos que el porcentaje de embriones euploides (cromosómicamente normales) no se correlacionaba con las categorías Xtend®.

Es importante destacar que el time-lapse no supone una competición contra la morfología, pero nuestros resultados demuestran la habilidad de un software automatizado de evaluar la calidad embrionaria independientemente de su clasificación morfológica.

Por último, podemos concluir que es incuestionable que la tecnología del time-lapse en el laboratorio de fecundación in vitro se está convirtiendo en una herramienta de gran utilidad que permite seleccionar embriones con mayor potencial de implantación y gracias a la cual estamos aprendiendo conceptos nuevos relacionados con la embriología.

Los sistemas de clasificación automática Eeva® son la primera aplicación práctica de la inteligencia artificial a la rutina clínica. Con dos aproximaciones, la primera en el proceso de aprendizaje en el recuento de blastómeros del embrión basado en redes neuronales convolucionales y la segunda en el proceso de análisis post P3 realizado por el algoritmo Xtend® que mediante técnicas de “*deep learning*” analiza los cambios morfológicos del embrión durante 24 horas.

Como futuros retos en este campo y como laboratorio pionero en la utilización de las últimas tecnologías, nos proponemos utilizar el algoritmo Xtend® para la selección embrionaria y seguir trabajando en el desarrollo y validación de nuevos algoritmos para que la fusión de todos ellos nos acerque cada día más a un algoritmo universal.

CONCLUSIONES



7. CONCLUSIONES

7.1 Algoritmo Eeva®

- La tasa de llegada a blastocisto y de blastocisto de calidad óptima aumenta de forma estadísticamente significativa a medida que mejora la clasificación Eeva®.
- El porcentaje de blastocistos viables es superior en D5 que en D6 de desarrollo, independientemente de la categoría.
- La predicción de la llegada a blastocisto es más precisa utilizando la categorización Eeva® que la morfológica.
- La tasa de implantación aumenta a medida que mejora la clasificación Eeva®, independientemente del día en el que se realice la transferencia.
- La probabilidad de gestación al transferir al menos un embrión clasificado como “*high*” es mayor que en los casos en los que al menos uno de los embriones transferidos se categoriza morfológicamente como “A” (ASEBIR).

7.2 Algoritmo Xtend®

- La tasa de llegada a blastocisto y de blastocisto de calidad óptima aumenta de forma estadísticamente significativa a medida que mejora la clasificación Xtend®.
- La tasa de implantación aumenta a medida que mejora la clasificación Xtend®.
- En blastocistos óptimos, se mantiene esta correlación entre la tasa de implantación y la categoría Xtend® sin embargo en blastocistos que no se clasifican morfológicamente como “A” o “B” (ASEBIR) no existe correlación entre implantación y categorías Xtend®.
- La incubación en cámaras con humedad dio lugar a un mayor porcentaje de embriones clasificados con las mejores categorías Xtend® comparado con la incubación en cámaras con ambiente seco.
- El porcentaje de embriones biopsiables es mayor en las mejores categorías Xtend®.
- No existe una correlación entre el porcentaje de embriones euploides y las categorías Xtend®.



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril* 2013;99(1):63.
- (2) Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definition and causes of infertility. *Reproductive biomedicine online* 2001;2(1):173-185.
- (3) Leridon H. Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology. *Comptes rendus biologies* 2007;330(4):339-346.
- (4) Izzo CR, Monteleone PAA, Serafini PC. Human reproduction: current status. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2015;61(6):557-559.
- (5) Schlegel PN. Evaluation of male infertility. *Minerva Ginecol* 2009 Aug;61(4):261-283.
- (6) Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. *Asian J Androl* 2008;10(1):134-145.
- (7) Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Revista do Hospital das Clínicas* 2004;59(6):375-382.
- (8) Sheiner EK, Sheiner E, Hammel RD, Potashnik G, Carel R. Effect of occupational exposures on male fertility: literature review. *Ind Health* 2003;41(2):55-62.
- (9) Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update* 2007 May-Jun;13(3):209-223.
- (10) Kodaman PH, Arici A, Seli E. Evidence-based diagnosis and management of tubal factor infertility. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 2004;16(3):221-229.
- (11) Sellors JW, Mahony JB, Chernesky MA, Rath DJ. Tubal factor infertility: an association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis. *Fertil Steril* 1988;49(3):451-457.

- (12) Adamson GD. Endometriosis classification: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2011 Aug;23(4):213-220.
- (13) Kuivasaari-Pirinen P, Raatikainen K, Hippeläinen M, Heinonen S. Adverse outcomes of IVF/ICSI pregnancies vary depending on aetiology of infertility. *ISRN obstetrics and gynecology* 2012;2012.
- (14) Sanders B. Uterine factors and infertility. *J Reprod Med* 2006 Mar;51(3):169-176.
- (15) Scott JZ, Nakamura RM, Mutch J, Davajan V. The cervical factor in infertility: diagnosis and treatment. *Fertil Steril* 1977;28(12):1289-1294.
- (16) ESHRE TR, ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2004;81(1):19-25.
- (17) Yilmaz N, Kilic S, Kanat-Pektas M, Gulerman C, Mollamahmutoglu L. The relationship between obesity and fecundity. *Journal of Women's Health* 2009;18(5):633-636.
- (18) Fard Abdollahi S, Ghavi F, Najafi J, Abdi M. Smoking and Infertility. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 2014;11.
- (19) Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reproductive biomedicine online* 2002;4(3):223-232.
- (20) Allahbadia GN, Morimoto Y. *Ovarian Stimulation Protocols*. : Springer; 2015.
- (21) Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011 Jul;26(7):1616-1624.
- (22) Romany L, Garrido N, Motato Y, Aparicio B, Remohí J, Meseguer M. Removal of annexin V-positive sperm cells for intracytoplasmic sperm injection in ovum donation cycles does not improve reproductive outcome: a controlled and randomized trial in unselected males. *Fertil Steril* 2014;102(6):1567-1575. e1.

- (23) Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, Peer S, Ellenbogen A, Feldberg B, et al. How to improve IVF–ICSI outcome by sperm selection. *Reproductive biomedicine online* 2006;12(5):634-638.
- (24) Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. *Handbook of in vitro fertilization* 2000:205-264.
- (25) Mercader A, Valbuena D, Simon C. Human embryo culture. *Meth Enzymol* 2006;420:3-18.
- (26) Tejera A, Castelló D, de los Santos, Jose Maria, Pellicer A, Remohí J, Meseguer M. Combination of metabolism measurement and a time-lapse system provides an embryo selection method based on oxygen uptake and chronology of cytokinesis timing. *Fertil Steril* 2016.
- (27) Dominguez F, Gadea B, Mercader A, Esteban FJ, Pellicer A, Simon C. Embryologic outcome and secretome profile of implanted blastocysts obtained after coculture in human endometrial epithelial cells versus the sequential system. *Fertil Steril* 2010 Feb;93(3):774-782.e1.
- (28) Haikin Herzberger E, Ghetler Y, Tamir Yaniv R, Berkovitz A, Gonen O, Cohen I, et al. Time lapse microscopy is useful for elective single-embryo transfer. *Gynecological Endocrinology* 2016:1-3.
- (29) Meseguer M, Kruhne U, Laursen S. Full in vitro fertilization laboratory mechanization: toward robotic assisted reproduction? *Fertil Steril* 2012 Jun;97(6):1277-1286.
- (30) Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update* 2005 Nov-Dec;11(6):575-593.
- (31) Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *The Lancet* 2002;359(9305):461-465.
- (32) Alberts B, Bray D. *Introducción a la biología celular*. : Ed. Médica Panamericana; 2006.

- (33) Lemmen J, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online* 2008;17(3):385-391.
- (34) Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012 Dec;98(6):1458-1463.
- (35) Cummins J, Breen T, Harrison K, Shaw J, Wilson L, Hennessey J. 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. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* 1986;3(5):284-295.
- (36) McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 2003 May;125(5):625-633.
- (37) 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 Mar;1(1):3-23.
- (38) Joris H, Van den Abbeel E, De Vos A, Van Steirteghem A. Reduced survival after human embryo biopsy and subsequent cryopreservation. *Human Reproduction* 1999;14(11):2833-2837.
- (39) Basile N, Caiazzo M, Meseguer M. What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015 Feb 19.
- (40) Basile N, Meseguer M. Time-lapse technology: evaluation of embryo quality and new markers for embryo selection. *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2012;7(2):175-190.
- (41) 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(10):1115-1121.
- (42) Herrero J, Tejera A, Albert C, Vidal C, de los Santos, Maria José, Meseguer M. A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertil Steril* 2013;100(6):1602-1609. e4.

- (43) Ottosen LDM, Hindkjær J, Ingerslev J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet* 2007;24(2):99-103.
- (44) Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Obstet Gynecol* 2008;199(6):660. e1-660. e5.
- (45) 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(2):93-96.
- (46) 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(7):569-573.
- (47) Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012 Oct;25(4):371-381.
- (48) Kirkegaard K, Campbell A, Agerholm I, Bentin-Ley U, Gabrielsen A, Kirk J, et al. Limitations of a time-lapse blastocyst prediction model: a large multicentre outcome analysis. *Reproductive BioMedicine Online* 2014.
- (49) Storr A, Venetis CA, Cooke S, Susetio D, Kilani S, Ledger W. Morphokinetic parameters using time-lapse technology and day 5 embryo quality: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(7):1151-1160.
- (50) Motato Y, de los Santos, María José, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohí J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril* 2016;105(2):376-384. e9.
- (51) Milewski R, Kuć P, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Łukaszuk K, Kuczyński W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(4):571-579.
- (52) Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, Garcia Velasco JA, Remohi J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod* 2015 Feb;30(2):276-283.

- (53) Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction* 2011;26(10):2658-2671.
- (54) Adamson GD, Abusief ME, Palao L, Witmer J, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril* 2016;105(2):369-375. e6.
- (55) Adamson GD, Abusief ME, Palao L, Witmer J, Palao LM, Gvakharia M. Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertil Steril* 2015.
- (56) Dominguez F, Meseguer M, Aparicio-Ruiz B, Piqueras P, Quiñonero A, Simón C. New strategy for diagnosing embryo implantation potential by combining proteomics and time-lapse technologies. *Fertil Steril* 2015;104(4):908-914.
- (57) Rocafort E, Enciso M, Leza A, Sarasa J, Aizpurua J. Euploid embryos selected by an automated time-lapse system have superior SET outcomes than selected solely by conventional morphology assessment. *J Assist Reprod Genet* 2018;35(9):1573-1583.
- (58) Meseguer M, Pellicer A. One for all or all for one? The evolution of embryo morphokinetics. *Fertil Steril* 2017 Mar;107(3):571-572.
- (59) Alegre L, Palma A, Marcos J, Albert C, Del Gallego R, Pellicer A, et al. Time-lapse technology combined with a novel automated analysis method for embryo selection; clinical validation. *Fertil Steril* 2017;108(3):e239.
- (60) Barrie A, Homburg R, McDowell G, Brown J, Kingsland C, Troup S. Examining the efficacy of six published time-lapse imaging embryo selection algorithms to predict implantation to demonstrate the need for the development of specific, in-house morphokinetic selection algorithms. *Fertil Steril* 2017;107(3):613-621.
- (61) 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 Oct;26(10):2658-2671.
- (62) Aguilar J, Rubio I, Muñoz E, Pellicer A, Meseguer M. Study of nucleation status in the second cell cycle of human embryo and its impact on implantation rate. *Fertil Steril* 2016;106(2):291-299. e2.

- (63) 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 Dec;98(6):1481-1489.e10.
- (64) Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril* 2012 Feb;97(2):332-337.
- (65) Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012 Nov;25(5):474-480.
- (66) Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014;102(5):1287-1294. e5.
- (67) Motato Y, de los Santos, María José, Escriba MJ, Ruiz BA, Remohí J, Meseguer M. Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertil Steril* 2015.
- (68) Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2016;105(2):275-285. e10.
- (69) Blake D, Farquhar C, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2007;4.
- (70) Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *The Cochrane Library* 2012.
- (71) Chen AA, Tan L, Suraj V, Reijo Pera R, Shen S. Biomarkers identified with time-lapse imaging: discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril* 2013;99(4):1035-1043.
- (72) Wong C, Chen A, Behr B, Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reproductive biomedicine online* 2013;26(2):120-129.

- (73) 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.
- (74) Wirka KA, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, et al. Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertil Steril* 2014;101(6):1637-1648. e5.
- (75) VerMilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multi-centre study. *Reproductive biomedicine online* 2014;29(6):729-736.
- (76) Diamond MP, Suraj V, Behnke EJ, Yang X, Angle MJ, Lambe-Steinmiller JC, et al. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(1):61-68.
- (77) Kieslinger DC, De Gheselle S, Lambalk CB, De Sutter P, Kosteljik EH, Twisk JW, et al. Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Hum Reprod* 2016 Sep 12.
- (78) Noyes N, Hampton BS, Berkeley A, Licciardi F, Grifo J, Krey L. Factors useful in predicting the success of oocyte donation: a 3-year retrospective analysis. *Fertil Steril* 2001;76(1):92-97.
- (79) Abdalla HI, Brooks AA, Johnson MR, Kirkland A, Thomas A, Studd JW. Endometrial thickness: a predictor of implantation in ovum recipients? *Hum Reprod* 1994 Feb;9(2):363-365.
- (80) Escribá M, Bellver J, Bosch E, Sánchez M, Pellicer A, Remohí J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertil Steril* 2006;86(1):92-97.
- (81) World Health Organisation. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. : Cambridge university press; 1999.

- (82) Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International braz j urol* 2014;40(4):433-453.
- (83) World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 2010.
- (84) Jameel T. Sperm swim-up: a simple and effective technique of semen processing for intrauterine insemination. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association* 2008;58(2):71.
- (85) Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 1988;9(6):367-376.
- (86) Alvarez JG. Preparación del semen para Técnicas de Reproducción Asistida. *ASEBIR* 2005;10:28-42.
- (87) Van Steirteghem A, Nagy P, Liu J, Joris H, Smitz J, Camus M, et al. Intracytoplasmic sperm injection—ICSI. *Reproductive Medicine Review* 1994;3(03):199-207.
- (88) Balaban B, Brison D, Calderón G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, et al. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction* 2011;26(6):1270-1283.
- (89) de los Santos, Maria José, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, de Mendoza, Maria Victoria Hurtado, et al. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live-birth rate. *Fertil Steril* 2014;101(4):981-987.
- (90) 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 Sep;25(9):2239-2246.
- (91) MIO Y. The beginning of human life under time-laps Cinematography. *Period Biol* 2009;111(3):323-327.
- (92) Patel DV, Shah PB, Kotdawala AP, Herrero J, Rubio I, Banker MR. Morphokinetic behavior of euploid and aneuploid embryos analyzed by time-lapse in embryoscope. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2016;9(2):112.

- (93) Fréour T, Le Fleuter N, Lammers J, Splingart C, Reignier A, Barrière P. External validation of a time-lapse prediction model. *Fertil Steril* 2015;103(4):917-922.
- (94) Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P. Time-lapse deselection model for human day 3 in vitro fertilization embryos: the combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertil Steril* 2016;105(3):656-662. e1.
- (95) Storr A, Venetis C, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Time-lapse algorithms and morphological selection of day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study. *Fertil Steril* 2018;109(2):276-283. e3.
- (96) Pribenszky C, Nilsseld AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017 Nov;35(5):511-520.
- (97) Adolfsson E, Andershed AN. Morphology vs morphokinetics: a retrospective comparison of inter-observer and intra-observer agreement between embryologists on blastocysts with known implantation outcome. *JBRA Assist Reprod* 2018 Sep 1;22(3):228-237.
- (98) Mölder A, Drury S, Costen N, Hartshorne GM, Czanner S. Semiautomated analysis of embryoscope images: Using localized variance of image intensity to detect embryo developmental stages. *Cytometry Part A* 2015;87(2):119-128.
- (99) Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev HJ, Hardarson T. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril* 2015;103(2):323-332.

