

Capacidad predictiva de imágenes obtenidas con sistemas time-lapse para el análisis de la viabilidad embrionaria

Predictive ability of images obtained with time lapse systems for the analysis of embryonic viability

Trabajo de Fin de Grado. Biotecnología

Autora: Ana Vela Sebastián

Director: Antonio Urries López



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular.

Unidad de Reproducción Asistida del Hospital QuirónSalud Zaragoza

27 de Junio de 2018

Carta de Presentación TFG Ana Vela Sebastián

Actualmente, el mayor interés de todos los que trabajamos en Técnicas de Reproducción Asistida Humana es el de conseguir que una pareja con problemas de fertilidad consiga su deseo de ser padres de un niño sano de la forma más rápida posible.

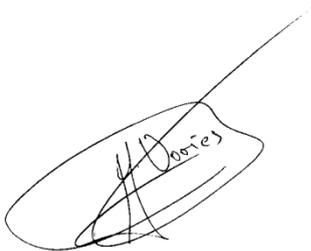
En la búsqueda de esa meta últimamente se están desarrollando procedimientos encaminados a una mejor clasificación embrionaria que nos permita detectar de una forma sencilla y objetiva cuál es el embrión con mayor capacidad de implantación.

Desde el año 2010 se ha venido observando cómo ciertos eventos cinéticos que ocurren durante los tres primeros días de división embrionaria pueden tener capacidad predictiva y ayudarnos para tal fin.

Por ello, y gracias a la incorporación de los sistemas Time Lapse a nuestros incubadores, podemos analizar de forma continua tales eventos con el fin de detectar cuáles de ellos pueden tener una mayor capacidad predictiva.

Ese ha sido el motivo principal para abordar el Trabajo de Fin de Grado motivo de esta carta, a lo largo del cuál, y tal como puede verse en el desarrollo de dicho estudio, hemos podido dar el primer paso para ahondar en la detección del embrión con mayor posibilidad de embarazo, lo cual nos puede permitir de forma indirecta reducir igualmente el porcentaje de embarazos múltiples al poder transferir un único embrión sin perder por ello posibilidades de embarazo.

Naturalmente vamos a continuar profundizando en dicho estudio.



Fdo. Antonio Urries López

Director Unidad Reproducción Asistida

Hospital Quirónsalud Zaragoza

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
ESTIMULACIÓN OVÁRICA	8
PUNCIÓN FOLICULAR.....	8
PROCESADO DE LA MUESTRA SEMINAL.....	8
FECUNDACIÓN <i>IN VITRO</i>	9
CULTIVO EMBRIONARIO	9
DETERMINACIÓN DE EMBARAZO CLÍNICO	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
AFECTACIÓN DEL NÚMERO DE PRONÚCLEOS OBSERVADOS.....	11
AFECTACIÓN DE LA ESCISIÓN TEMPRANA	12
AFECTACIÓN DE LA DIVISIÓN DIRECTA.....	13
AFECTACIÓN DEL GRADO DE FRAGMENTACIÓN	14
AFECTACIÓN DE LA ASIMETRÍA DE LOS BLASTÓMEROS.....	16
AFECTACIÓN DE LA MULTINUCLEACIÓN	17
AFECTACIÓN DEL GRADO DE COMPACTACIÓN EN ESTADÍO DE MÓRULA	18
AFECTACIÓN DEL GRADO DE EXPANSIÓN EN ESTADÍO DE BLASTOCISTO.....	19
AFECTACIÓN DE LA PRESENCIA DE VACUOLAS	20
VALIDACIÓN DE UN NUEVO SISTEMA DE PuntuACIÓN.....	21
CONCLUSIONES	23
CONCLUSIONS	23
BIBLIOGRAFÍA	24
ANEXO I	26
ANEXO II	27

RESUMEN

En la actualidad, los incesantes intentos para disminuir la incidencia de gestaciones múltiples y mejorar las tasas de implantación y embarazo logradas como consecuencia de un ciclo de fecundación *in vitro*, han llevado al desarrollo de los sistemas *time-lapse* con capacidad de captar imágenes predictivas de la viabilidad embrionaria, proporcionando una herramienta excepcional para la selección de embriones con las mejores características y el mayor potencial evolutivo.

Atendiendo a criterios morfológicos, con base a las recomendaciones de la clasificación embrionaria de ASEBIR, en el presente trabajo se han analizado las grabaciones de un total de 347 embriones, correspondientes a 173 ciclos de pacientes del hospital QuirónSalud de Zaragoza, que posteriormente fueron transferidos, con el objetivo final de evaluar la incidencia sobre la tasa de embarazo de determinados eventos que transcurrían durante las distintas fases del desarrollo embrionario.

Los parámetros objeto de estudio incluyen el número de pronúcleos, la escisión temprana, la división directa, el grado de fragmentación, la asimetría de los blastómeros, la multinucleación, el grado de compactación y el grado de expansión del blastocisto resultante.

Como resultado, se obtuvo que las transferencias de embriones con un número extraordinario de pronúcleos, eventos de división directa y elevado porcentaje de fragmentación disminuían drásticamente las tasas de implantación. En contraposición, los blastocistos y embriones en fase de compactación mejoraban notoriamente las tasas de embarazo. En última instancia, no se obtuvieron conclusiones significativas para la afectación de los parámetros de escisión temprana, asimetría celular ni multinucleación, evidenciando la necesidad de más estudios adicionales en este campo.

Considerando las conclusiones derivadas del estudio y los conocimientos actuales sobre el tema, adicionalmente se validó un nuevo sistema de puntuación de clasificación embrionaria, definiendo intervalos de ponderación para embriones de muy baja/nula; baja; media; y alta capacidad de implantación.

ABSTRACT

Nowadays, the incessant efforts to reduce the influence of multiple gestations and improve the implantation and pregnancy rates achieved as a product of a IVF cycle, have concluded with the development of time lapse systems with the ability to capture predictive images of embryonic viability, providing an exceptional tool to select the embryo with the best characteristics and the larger evolutionary potential.

Attending to morphological criteria, based on ASEBIR's recommendation of embryonic classification, in this project, the video recordings of 347 embryos, corresponding to 173 patients cycles in the QuironSalud hospital of Zaragoza, which were transferred afterwards, have been analyzed in order to evaluate the incidence in the pregnancy rate of several events that took place along the different stages of the embryo development.

The parameters studied involve the pronuclei number, early cleavage, direct split, fragmentation degree, cellular asymmetry, multinucleation, compaction scale and expansion rank of the resultant blastocyst.

As a result, it was obtained that embryo's transfers with an extraordinary pronuclei number, events of direct cleavage and high fragmentation percentage reduced drastically the implantation rates. In contrast, blastocysts and embryos in compaction stage notably improve the pregnancy rates. As a last resort, it was not possible to obtain significantly conclusions of the effect of early cleavage, blastomeres' asymmetry and multinucleation, demonstrating the necessity of further studies in this field.

Considering the conclusions obtained and current knowledge about the issue, it was additionally validated a new scoring system of embryonic classification, defining weighting intervals for embryos with very low/null; low; medium; and high implantation ability.

ANTECEDENTES

Desde la introducción de las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV) en la década de 1970 con el objetivo de ayudar a las parejas con problemas de fertilidad a lograr la gestación, dicho enfoque ha tenido una gran aceptación, pero a día de hoy, la tasa de éxito dista mucho de ser próxima al 100% de los casos.¹ A pesar de los esfuerzos para optimizar los procedimientos actuales, las tasas de fecundidad humana son relativamente bajas, debido en gran medida a la pérdida de embriones previa y posteriormente a la implantación. De hecho, en torno a un 50-70% de los embriones de FIV no llegan a alcanzar la etapa de blastocisto al ser cultivados *in vitro*,² resultando como consecuencia en una tasa de embarazo clínico del 30% por transferencia.³

En general, la eficacia de las técnicas de reproducción asistida (TRA) depende de las decisiones tomadas en cada una de las etapas del procedimiento, incluidos los métodos de estimulación ovárica, la recuperación de oocitos, las condiciones de cultivo, el mantenimiento de la calidad del ovocito, espermatozoides y embrión y las técnicas de transferencia de embriones entre otras.⁴ Concretamente, la transferencia de embriones con alto potencial de implantación y correcto desarrollo posterior es fundamental para lograr resultados óptimos.¹ Sin embargo, la tasa de éxito de la fertilización *in vitro* y la probabilidad de embarazo se relaciona principalmente con la cantidad de embriones que son transferidos.⁴

Comúnmente es habitual la transferencia de varios embriones por ciclo con el objetivo de compensar las tasas de implantación relativamente bajas^{1,2,4}, desembocando con frecuencia en embarazos múltiples con los subsecuentes riesgos adicionales tanto para la madre como para el niño⁴, que han conducido a un aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad materna y neonatal.¹ Algunas de las complicaciones asociadas documentadas incluyen un mayor riesgo de partos prematuros, bajo peso al nacer, complicaciones en el desarrollo que dañifican a las áreas del aprendizaje y problemas de salud en los descendientes; así como el desencadenamiento de trastornos hipertensivos y una alta incidencia de cesáreas y hemorragias post-parto que afectan a las madres.⁵

Para evitar dichas adversidades, se han implementado políticas de transferencia restrictiva en varios países europeos.^{1,6} En España, la actual Ley de Reproducción Asistida (Ley 14/2006) limita a 3 el número máximo de embriones por cada tratamiento, aunque desde la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) se recomienda encarecidamente la transferencia de uno o dos embriones, relegando la transferencia de 3 únicamente a casos excepcionales de muy mal pronóstico reproductivo.⁷ Como consecuencia, el objetivo de reducir el número de embriones transferidos ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de selección de embriones individuales de óptima calidad que podrían eliminar por completo la incidencia de gestaciones múltiples, a excepción del hermanamiento monocigótico.^{1,3}

Como mínimo, es fundamental el cumplimiento de tres criterios para lograr una aplicación más generalizada de la transferencia de un único embrión (SET): 1) La capacidad de cultivar embriones en un ambiente libre de estrés. En los últimos años se ha dado un gran avance a este respecto, con el desarrollo de medios optimizados para cada etapa específica de evolución embrionaria, así como medios individuales diseñados para permitir un crecimiento sin perturbaciones en el medio de cultivo. 2) La habilidad de crioconservar embriones con éxito, logrando asegurar posteriormente buenas tasas de implantación tras el proceso de descongelación; y 3) La destreza de seleccionar un embrión viable con alto potencial de implantación entre una cohorte para un paciente determinado, definiéndose *viabilidad* como la capacidad de un embrión para alcanzar la etapa de blastocisto y/o lograr implantar en el útero después de la transferencia.⁸ Sin embargo, la selección del mejor embrión para la

transferencia continúa constituyendo un gran desafío en FIV y las estrategias de mejora siguen siendo una importante prioridad en investigación.⁹

Tradicionalmente la evaluación de los embriones se ha llevado a cabo mediante su extracción diaria del incubador para su análisis cualitativo por un embriólogo bajo un microscopio óptico.¹⁰ El desarrollo del embrión humano se inicia con la fusión del espermatozoides y el oocito, la reprogramación epigenética de los pronúcleos gaméticos y una secuencial serie de divisiones que culmina con la activación del genoma embrionario, momento en que comenzará la compactación para formar una mórula y posteriormente, un blastocisto donde ya se podrán diferenciar poblaciones celulares especializadas: el trofoectodermo externo y la masa celular interna.² Con el objetivo de verificar el correcto desarrollo del cigoto, en la evaluación diaria se recomienda la observación de determinados eventos posteriores a la inseminación¹⁰:

- Un control de fertilización a las 16-18 horas, detectando la presencia de pronúcleos; y un control de singamia de los mismos a las 24-28 horas.
- Una valoración de división temprana entre las 25-27 horas post-ICSI; y entre las 27-29 horas post-FIV.
- Evaluación de embriones a día 2 a las 43-45 horas, esperando la detección de estadios de cuatro células.
- Evaluación de embriones a día 3 a las 67-69 horas, aguardando detectar estadios de ocho células.
- Evaluación de embriones a día 4 a las 90-94 horas, observando la tendencia a compactar en una mórula.
- Y por último, evaluación de embriones a día 5 a las 114-118 horas, estadio en que se espera apreciar la formación del blastocisto.

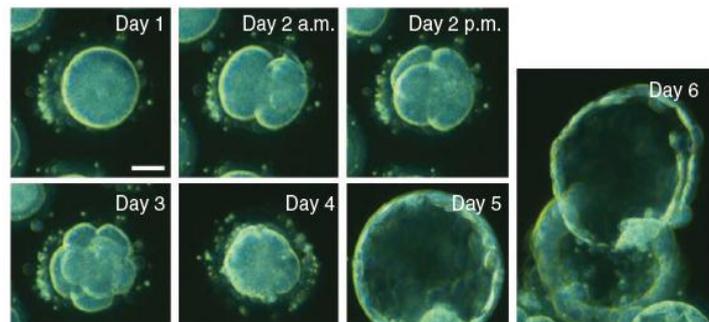


Ilustración 1. Línea de desarrollo temporal de un embrión de preimplantación humano óptimo.

No obstante, esta práctica expone a los embriones a las condiciones subóptimas del medio ambiente externo a la incubadora y al manejo humano,¹⁰ proporciona una única imagen fija por día de un proceso dinámico^{1,11} y está limitado por un sistema de evaluación que incluye la subjetividad del embriólogo.^{4,12} De hecho, la selección de embriones basada en características morfológicas no ha conseguido exceder un 35% de tasa de implantación.⁴ Todos estos factores han llevado al desarrollo de nuevos métodos, tanto invasivos como no invasivos, para ayudar al embriólogo a seleccionar el embrión con el mayor potencial de implantación. Entre ellos se incluyen¹³:

- Alargamiento del cultivo hasta el estadio de blastocisto: Estudios han demostrado que los blastocistos presentan mayores tasas de implantación y embarazo en comparación con estadios anteriores de desarrollo, aunque así mismo, también se ha relacionado el cultivo de embriones extendido con la aparición de malformaciones congénitas y un mayor riesgo de parto prematuro y gemelos monocigóticos.^{8,13,14} Adicionalmente, se ha sugerido que las condiciones de cultivo *in vitro*, a largo plazo, pueden afectar al perfil epigenético del embrión, afectando a la expresión de determinados genes.¹³

- Medida de la actividad metabólica embrionaria: Técnicas basadas en la detección de nutrientes consumidos en el medio de cultivo, así como sustancias de desecho secretadas por el embrión. Específicamente, la actividad glucolítica, el consumo de piruvato y los cambios de concentración de aminoácidos se han correlacionado con la capacidad de desarrollo embrionario.^{4,13}
- Detección de la expresión génica de las células del cúmulo: Consiste en el análisis del transcriptoma mediante qRT-PCR para valorar la expresión de genes correlacionados con el desarrollo potencial del oocito.¹³
- Diagnóstico genético preimplantacional para aneuploidías: Técnica que permite evaluar el contenido cromosómico del embrión, cuyas anomalías se asocian con una importante disminución en las tasas de implantación.^{11,13} Sin embargo, a pesar de permitir seleccionar embriones con óptimas características, cuenta con el inconveniente de tratarse de una metodología muy invasiva que requiere la biopsia de blastómeros del embrión, pudiendo afectar así a su viabilidad posterior.^{3,4}
- Análisis de la morfo-cinética embrionaria: Consiste en la evaluación de parámetros morfológicos en las primeras etapas del desarrollo del embrión. Se basa en que la calidad del embrión está predeterminada antes de la activación del genoma embrionario.¹³

A excepción del último, se trata de procedimientos complejos que requieren mucho tiempo,⁴ motivo por el que los sistemas de clasificación basados en morfología siguen siendo una primera optativa en la evaluación de la competencia embrionaria, impulsado en gran medida por la existencia de una patente correlación entre la apariencia morfológica y la capacidad de desarrollo del embrión.³ Todo ello ha llevado al desarrollo de los sistemas *time-lapse*.

Un sistema *time-lapse* es un dispositivo, con posibilidad de instalación en un incubador tradicional, que toma imágenes digitales (y las compila utilizando un software especializado) de embriones a intervalos regulares de tiempo, permitiendo de esta forma aumentar la frecuencia de las observaciones morfológicas sin necesidad de retirarlos físicamente del incubador, minimizando el impacto del medio ambiente y la manipulación humana en el desarrollo embrionario.¹⁰

El primer uso de esta tecnología data de 1929, cuando se utilizó para mapear el desarrollo de embriones de conejo. Pero fue varias décadas después, en 1997, cuando se utilizó por primera vez para valorar la fertilización y el desarrollo de embriones humanos a manos de Payne et al.¹ Diez años más tarde, Mio y Maeda ampliaron el período de análisis y caracterizaron los eventos dinámicos y morfo-cinéticos ocurrientes hasta el momento de la eclosión del blastocisto.¹² Desde entonces, se han ideado varios dispositivos y se han realizado gran cantidad de estudios para evaluar cómo esta nueva tecnología podía mejorar las perspectivas en el ámbito de la embriología.¹

Principalmente destacan dos beneficios del *time-lapse*. En primer lugar, permite obtener imágenes de embriones sin necesidad de extraerlos de la incubadora, permitiendo así mantener inalterables sus condiciones de cultivo y minimizar los cambios de temperatura, pH y composición gaseosa. Una segunda ventaja se debe a su capacidad de acumular imágenes detalladas del desarrollo embrionario, permitiendo la detección de eventos tales como la dinámica de los pronúcleos, las divisiones celulares, la presencia de multinucleación y fragmentación y la simetría de los blastómeros entre otros, características que pueden pasar desapercibidas en una evaluación morfológica estándar.^{1,4,10,12} Constituye un gran avance debido a la existencia de una evidente correlación entre la morfología embrionaria y la viabilidad, permitiendo seleccionar embriones de alta calidad para transferir, logrando reducir el tiempo necesario para conseguir el embarazo de una pareja sin necesidad de

posteriores transferencias.¹⁰ Concretamente, sus potenciales atributos condujeron a que en el año 2010, en Hungría, la transferencia de un único embrión seleccionado con ayuda de esta tecnología resultara en un embarazo y finalmente en el nacimiento del primer bebé del mundo concebido con FIV/*time-lapse*.⁵

Sin embargo, la implantación del uso del *time-lapse* también va acompañada de una serie de aspectos negativos a considerar. Entre ellos, su uso implica una exposición continua de los embriones a una luz de determinada longitud de onda que puede resultar perjudicial para su desarrollo^{4,12} como consecuencia de un calentamiento focalizado con capacidad de dañar al DNA o generar especies radicales libres.¹ En lo que concierne a ese aspecto, la seguridad de la técnica se analizó en un estudio en que se comparó el desarrollo embrionario en sistemas *time-lapse* frente a incubadores tradicionales, poniendo de manifiesto que la adquisición de imágenes periódicas no afectaba a la calidad embrionaria ni a su potencial de implantación.¹²

Conjuntamente, otro de los inconvenientes de los sistemas *time-lapse* es que no permiten la rotación de los embriones, dificultando en ocasiones la observación visual, especialmente cuando se produce superposición de blastómeros o una elevada fragmentación citoplasmática.¹² Por último, habría que sumarle el elevado coste de la técnica, lo que limita su implementación en muchos centros de reproducción asistida.⁴

Pese a ello, los beneficios de la implementación de los sistemas *time-lapse* son innegables, debido principalmente a la incorporación de algoritmos de software de seguimiento celular que han evolucionado como una metodología objetiva y no invasiva capaz de mejorar la selección de embriones con el mayor potencial de implantación¹⁰ respecto a la valoración de la morfología convencional al incluir una serie de parámetros morfo-cinéticos que así mismo pueden complementar la evaluación de la ploidía embrionaria.¹⁵

Wong et al. Realizaron un estudio de análisis de imágenes *time-lapse* y perfiles de expresión génica con el objetivo de identificar parámetros predictivos del desarrollo a blastocisto y llegaron a la conclusión de que tres parámetros eran representativos de la futura evolución del embrión. Entre ellos, la duración de la primera escisión, el intervalo de tiempo entre la primera y la segunda división, así como entre la segunda y la tercera mitosis. Con posterioridad, Meseguer et al. Identificaron los mismos marcadores predictivos en un estudio independiente junto con el intervalo de tiempo entre la inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) y la formación de embriones de cinco células y definieron una serie de factores predictivos negativos tales como la división directa del embrión de una a tres células, la desigualdad del tamaño de los blastómeros en estadio de dos células, y la multinucleación en estadio de cuatro células. Finalmente, mediante el uso de variables predictivas negativas y positivas se definió un algoritmo para la selección de embriones basado en la morfo-cinética.^{12,16}

A pesar de estas prometedoras observaciones, estudios posteriores han cuestionado la posibilidad de definir intervalos de tiempo universalmente aplicables para la evaluación de un desarrollo embrionario óptimo¹⁷ puesto que se ha demostrado que los protocolos de estimulación, la población de pacientes, la elección del medio de cultivo, el método de fertilización y la fragmentación del DNA espermático entre otras, pueden influir en la velocidad de escisión de los embriones.^{3,18,19} Para disminuir la variabilidad y mejorar la transferibilidad, algunos investigadores han propuesto el uso de patrones de división en lugar de temporizadores de división como los parámetros de *time-lapse*,^{18,20} y aunque bien es cierto que hay diferencias en los esquemas de graduación de embriones entre las distintas clínicas de fertilidad, gran parte de los laboratorios clasifican los embriones en estadio de escisión en función

del grado de fragmentación, presencia y número de núcleos, número y simetría de blastómeros por embrión. Así mismo, es común evaluar los blastocistos de acuerdo a su grado de expansión y cohesión entre las células constituyentes.^{11,17}

Tomando en consideración dichos parámetros, la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) propuso una clasificación embrionaria en 2007 que consta de cuatro categorías: A, B, C y D; siendo los embriones pertenecientes a la categoría A los de mayor potencial de implantación, y por tanto, los de la categoría D, los de menor potencial atendiendo a sus características morfológicas y una serie de eventos observados durante las distintas etapas del desarrollo embrionario (Anexo I),²¹ principales objetos de estudio que se valorarán en el presente trabajo.

OBJETIVOS

Los principales objetivos del presente trabajo son:

- Analizar diferentes parámetros que tienen lugar durante las distintas etapas del desarrollo embrionario con la finalidad de valorar su afectación a la calidad y viabilidad del embrión resultante. Entre dichos parámetros se incluyen: número de pronúcleos, eventos de división temprana, división directa, número de células, grado porcentual de fragmentación, simetría de blastómeros, presencia de multinucleación, grado de compactación en estadio de mórula y alcance de fase de blastocisto y nivel de expansión.
- Relacionar dichos parámetros con las tasas de embarazo o no embarazo resultado de la transferencia de embriones para determinar su nivel de afectación a la tasa de implantación y su potencial como herramientas útiles de validación de calidad embrionaria.
- Valorar la adecuación de un determinado sistema de puntuación de clasificación embrionaria propuesto en base a los eventos que transcurren durante el desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se han analizado un total de 1483 vídeos de desarrollo embrionario pertenecientes a 212 ciclos de pacientes del Hospital QuironSalud de Zaragoza recogidos mediante tecnología de sistemas *time-lapse* durante los meses de febrero a agosto de 2017, generados por técnicas de fecundación *in vitro* (FIV convencional y/o ICSI) tanto a partir de gametos propios como de programas de donación de ovocitos (P.D.O).

Independientemente de la procedencia de los gametos de cada uno de los ciclos, en líneas generales, todos ellos han sido sometidos a los mismos procedimientos en el laboratorio:

Estimulación ovárica

Generalmente la selección del protocolo de estimulación ovárica al que se someten las pacientes depende de varias características tales como su edad, los niveles séricos hormonales, el recuento de folículos antrales y su capacidad de respuesta a determinados cócteles hormonales.²²

Habitualmente la medicación prescrita consiste en una combinación de hormonas, entre las que se incluyen agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) para suprimir la ovulación hasta el momento en que se alcanza la madurez del folículo; y hormona folículo estimulante (FSH) recombinante que induce el desarrollo de los óvulos en los folículos. Finalmente, la maduración folicular completa se desencadena con la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) una vez se detecta, mediante ecografía transvaginal, la presencia de folículos de entre 18-20mm de diámetro medio.

Punción folicular

Transcurridas 36-48 horas desde la administración de la hCG, se procede con la punción ovárica o folicular mediante una intervención quirúrgica que requiere sedación en la que se procede a la aspiración de los oocitos contenidos en los folículos con ayuda de una aguja guiada por ultrasonido transvaginal.

El líquido recogido en el que flotarán los oocitos, pasa directamente al interior de tubos de ensayo con una mínima cantidad de PBS que han sido previamente atemperados a 37°C, condiciones en que se trasladan desde el quirófano hasta el laboratorio, donde los embriólogos analizarán el contenido recolectado en busca de oocitos maduros, que serán recuperados, lavados y almacenados en medio G-IVF™.

Procesado de la muestra seminal

Durante el procesado de la muestra eyaculada, previamente se evalúa la concentración, movilidad y morfología espermática con la ayuda de una cámara Makler bajo microscopía óptica y posteriormente, la muestra restante se somete a gradientes de densidad con medio PureSperm100™ con el objetivo de separar los compuestos descapacitantes presentes en el plasma seminal y recuperar la fracción constituyente por aquellos espermatozoides que generalmente presentan una mejor movilidad, los cuales finalmente son sometidos a una etapa de lavado en G-IVF™, medio que contiene carbohidratos y aminoácidos para garantizar altas tasas de fertilización tanto para los espermatozoides como para los oocitos.

Fecundación *in vitro*

La técnica de fecundación *in vitro* de elección que se sigue en cada ciclo correspondiente varía en función de la calidad de la muestra seminal aportada por el varón, atendiendo principalmente a la concentración espermática de la misma.

De manera general, si las características del eyaculado son aceptables, con una concentración superior a 3 millones de espermatozoides/ml y una aparente buena movilidad, suele recurrirse a técnicas de FIV convencional en que se co-incuban en la misma placa los oocitos y los espermatozoides (una microgota), facilitando de esta forma la fecundación.

Por el contrario, en casos de factor masculino severo, suele recurrirse a ICSI. Para la correcta realización de esta técnica, los oocitos son previamente deanudados, es decir, desprendidos de las células del cúmulus, mediante pipeteo reiterado en medio HYASE-10X™, una solución salina fisiológica que contiene hialuronidasa. Una vez desprovistos de dicha capa celular protectora, se disponen en placas específicas para la técnica a realizar en cuestión, sobre microgotas de G-MOPS™, medio de manejo que permite el mantenimiento estable del pH durante las manipulaciones externas de la incubadora. En dicha placa también se depositan los espermatozoides sobre medio ICSI™, una solución viscosa que contiene albúmina humana recombinante y PVP, facilitando de esta forma la inmovilización y el aislamiento de espermatozoides para proceder con éxito a la inyección intracitoplasmática.

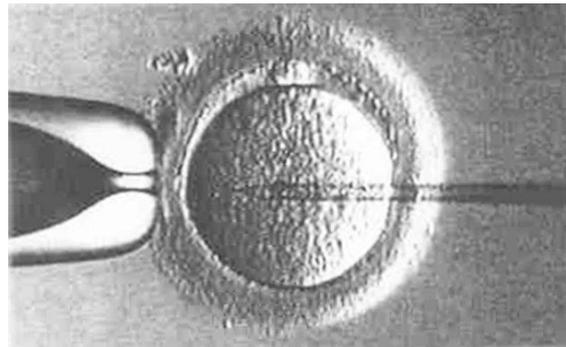


Ilustración 2. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides vista al microscopio invertido

Cultivo embrionario

Los cigotos resultantes tras la aplicación de las técnicas de fecundación *in vitro* se transfieren a Geri Medium™, un medio de cultivo único que permite el crecimiento y desarrollo del embrión sin perturbaciones tras la fecundación hasta el día de la transferencia a la paciente, momento en que se traspa al medio EmbryoGlue™.

Hasta ese instante, los embriones se mantienen en condiciones inalteradas de 37°C y 6% de CO₂ en el Incubador Geri®, en placas de 16 micropocillos dispuestos en círculo con un diámetro de 500µm que permiten el manejo de los embriones de forma cómoda, y 400µm de profundidad, evitando así su salida de los micropocillos.

El Incubador Geri® cuenta con seis cámaras individuales, diseñadas para contener embriones de un solo paciente de manera independiente, dotadas cada una de ellas, con un microscopio individual con cámara de alta resolución (CMOS monocromo de 2560x1928 píxeles) que proporciona imágenes de *time-lapse* del desarrollo de cada embrión bajo un sistema de iluminación LED naranja de 591nm, con una duración de <0.005 segundos por imagen, garantizando una exposición total a la luz de ~125 segundos por día por embrión. Concretamente, dichas imágenes son capturadas en intervalos de tiempo de cada 5 minutos, registrando un total de 11 planos focales.²³

Hoy en día, Geri® constituye el único sistema *time-lapse* automático disponible en el mercado, que incluye la prueba de Eeva.²⁴ El sistema Eeva (*Early Embryonic Viability Assessment*) requiere la incorporación de un microscopio adicional especial en la incubadora que utiliza tecnología de campo oscuro, permitiendo la obtención de imágenes con un perfil más nítido de las membranas celulares y por consiguiente, un monitoreo preciso de las divisiones embrionarias. Dicho sistema dispone de un software asociado que, con base a los momentos de escisión temprana del embrión, es capaz de predecir cuáles tienen más probabilidad de desarrollarse en etapa de blastocisto. Para ello atiende principalmente a dos parámetros cinéticos: el tiempo que transcurre desde que el embrión pasa de estadio de dos células a tres células (P2) y el tiempo necesario para pasar de embrión de tres células a embrión de cuatro células (P3).¹⁶ Así mismo, también tiene en consideración la edad del ovocito, el número de células del embrión en día tres y el análisis post-P3.²⁵ Por tanto, una de las principales ventajas que aporta es conseguir disminuir la variabilidad entre observadores y aumentar la capacidad del embriólogo para identificar correctamente los mejores embriones, aunque bien es cierto que requiere revisión, puesto que el sistema automatizado puede confundir fragmentos grandes con blastómeros, afectando así a su precisión de selección.¹⁶

En vista a la posibilidad de defectos asociados al trabajar con el sistema Eeva, que ya habían sido registrados en previos ensayos documentados,²⁶ se propuso, para este estudio, la revisión de la secuencia de imágenes captadas por el sistema *time-lapse* del Incubador Geri® mediante el software adjunto Geri® Connect y un sistema de puntuación definido para evaluar/clasificar los embriones obtenidos en función de los eventos originados durante su desarrollo con el objetivo de valorar finalmente su impacto en la tasa de implantación del embrión resultante.

Determinación de embarazo clínico

Para valorar finalmente si los embriones transferidos han desembocado en un resultado exitoso de gestación, se mide la concentración de gonadotropina coriónica humana (β -hCG) sérica, una hormona producida durante el embarazo por el embrión en desarrollo, en las pacientes a los 16 días. La detección de valores superiores a ~10 UI/L es indicativo de una correcta implantación embrionaria y subsecuente embarazo clínico. Dicha evaluación se confirma posteriormente a las dos semanas mediante la búsqueda del latido cardíaco para ratificar que el embarazo se desarrollará correctamente a término.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se han analizado un total de 1483 secuencias de imágenes de desarrollo embrionario tomadas mediante sistemas *time-lapse*, correspondientes a 212 ciclos, tanto de FIV/ICSI como de P.D.O, de pacientes de la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital QuirónSalud de Zaragoza entre los meses febrero-agosto de 2017.

Bien es cierto que de todos los embriones analizados y clasificados, únicamente la información de aquellos que posteriormente fueron transferidos a las pacientes resulta relevante para la extracción de conclusiones en este trabajo, cuyo objetivo final es valorar el impacto de determinados eventos que pueden ocurrir durante el desarrollo embrionario con la tasa de implantación posterior resultante y la posibilidad de generar un embarazo. Es por ello que datos de interés son los procedentes de un total de 347 embriones, correspondientes a 173 ciclos, con un número variable (entre 1-3) de embriones transferidos por ciclo. El resto de embriones analizados, bien fueron congelados si presentaban aparentemente buenas características y/o eran capaces de alcanzar el estadio de mórula, o bien fueron

descartados, la mayoría de los cuales por fallos de fecundación, detención prematura del desarrollo o presencia de tres pronúcleos. Así mismo, también se han excluido del análisis aquellos embriones para los que se desconocía si habían resultado o no en un embarazo, y los embriones transferidos en ciclos sometidos a DGP por considerar que en ese caso la selección de embriones no atendió a parámetros morfológicos si no a criterios genéticos. Está bien documentado que los embriones de buena calidad morfológica pueden ser aneuploides mientras que los embriones subóptimos pueden ser euploides. De hecho, se considera que una razón para la elevada incidencia de aneuploidía en embriones humanos que no se detienen en el desarrollo podría ser que en la etapa embrionaria, los puntos de control del ciclo celular que minimizan el riesgo de errores cromosómicos y/o roturas en el DNA celular no funcionan correctamente en los embriones tempranos, hipótesis que fue propuesta por Ambartsumyan y Clark.¹⁷

A continuación se analizan, de manera independiente, valorando su correlación con las tasas de embarazo clínico, la afectación de cada uno de los eventos que han sido evaluados durante el proyecto. Entre ellos: número de pronúcleos, escisión temprana, división directa, grado de fragmentación, simetría de blastómeros, multinucleación, grado de compactación en estadio de mórula y alcance de fase de blastocisto expandido.

Bien es cierto que el propio diseño del ensayo tiene un cierto error intrínseco asociado y es que en aquellos ciclos en que se transfirieron múltiples embriones que habían acontecido diferentes eventos durante el desarrollo y resultaron en un embarazo, resulta imposible determinar qué embrión de entre todos los transferidos (y por tanto, las características morfológicas óptimas del mismo) fue capaz de implantar en el útero materno. Para valorar los resultados de este ensayo, se analizarán las tasas de embarazo por ciclo y no por número de embriones transferidos, pero teniendo en consideración la comisión de ese error.

Afectación del número de pronúcleos observados

La observación de los pronúcleos suele realizarse en torno a las 16-18 horas post-inseminación. En un intervalo de tiempo posterior, puede darse el caso de que los pronúcleos hayan desaparecido.

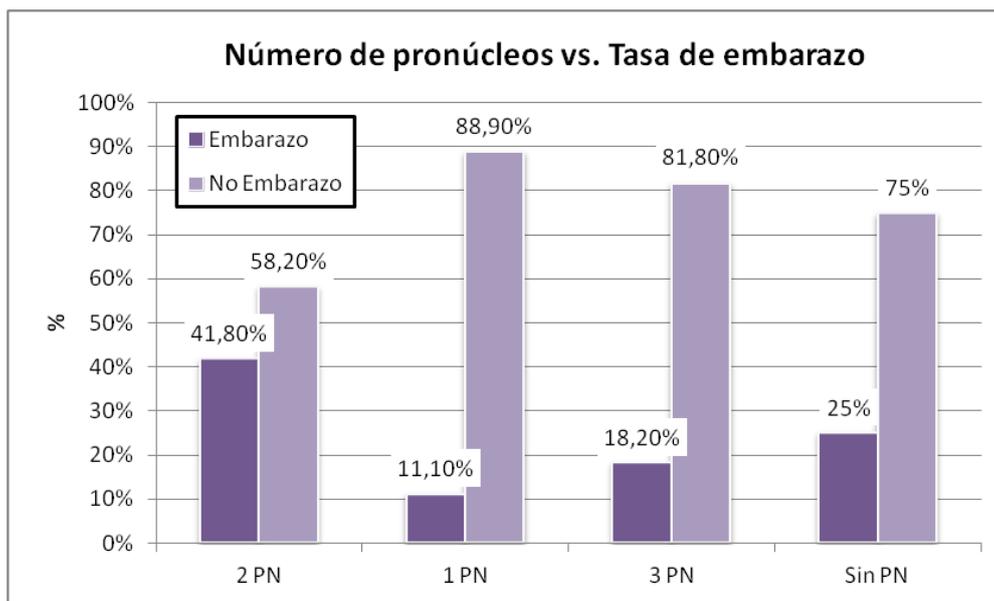
Si el proceso de fecundación ha transcurrido con éxito, esperaríamos detectar la presencia de dos corpúsculos polares y dos pronúcleos en el embrión.²¹ En este ensayo, de los 347 embriones transferidos analizados, 321 de ellos, pertenecientes a 170 ciclos, presentaban dos pronúcleos. De todos ellos, un total de 71 ciclos (41.76%) resultaron en embarazo, mientras que en los 99 ciclos (58.24%) restantes, fueron incapaces de implantar en el útero.

También hubo casos en que se transfirieron embriones que únicamente presentaban un pronúcleo, lo cual puede reflejar una asincronía, una fusión temprana o un error durante el proceso de formación de los mismos, motivo por el que se suele recomendar descartarlos a pesar de que en ocasiones estos embriones sean capaces de alcanzar el estadio de blastocisto.²¹ En este ensayo, un total de 10 embriones pertenecientes a 9 ciclos fueron transferidos a pesar de presentar un único pronúcleo. Como resultado, un único ciclo (11.11%) resultó en embarazo, y los 8 restantes (88.89%) generaron un resultado de gestación negativo.

Otra posibilidad es detectar la presencia de tres pronúcleos, que se considera un signo inequívoco de fecundación anómala, consecuencia, probablemente de una polipenetración espermática. A pesar de que ante la detección de esta marca se recomienda descartar al cigoto, que probablemente será triploide,²¹ en este caso se transfirieron 11 embriones pertenecientes a 11 ciclos con esta característica,

dando lugar a 2 ciclos (18.18%) con resultado de embarazo positivo, y 9 ciclos (81.82%) con resultado negativo.

Por último lugar, también hubo casos en que se transfirieron embriones en los que no se había detectado la presencia de pronúcleos, tal vez debido a su real inexistencia, o bien a que la granulosa o densidad del citoplasma del oocito observado en cuestión dificultaba su visualización. Consistieron en un total de 5 embriones correspondientes a 4 ciclos, de los cuales un único ciclo (25%) derivó en un embarazo; y los 3 ciclos restantes (75%) en un no embarazo. Debemos recordar en todo momento que cabe la posibilidad de que en un mismo ciclo se hayan transferido embriones de distintas características, situaciones en que resulta imposible conocer cuál de ellos ha sido capaz de implantar y generar un embarazo.



Gráfica 1. Relación entre el número de pronúcleos observados (0, 1, 2 ó 3 pronúcleos) en el cigoto tras la fecundación y la capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

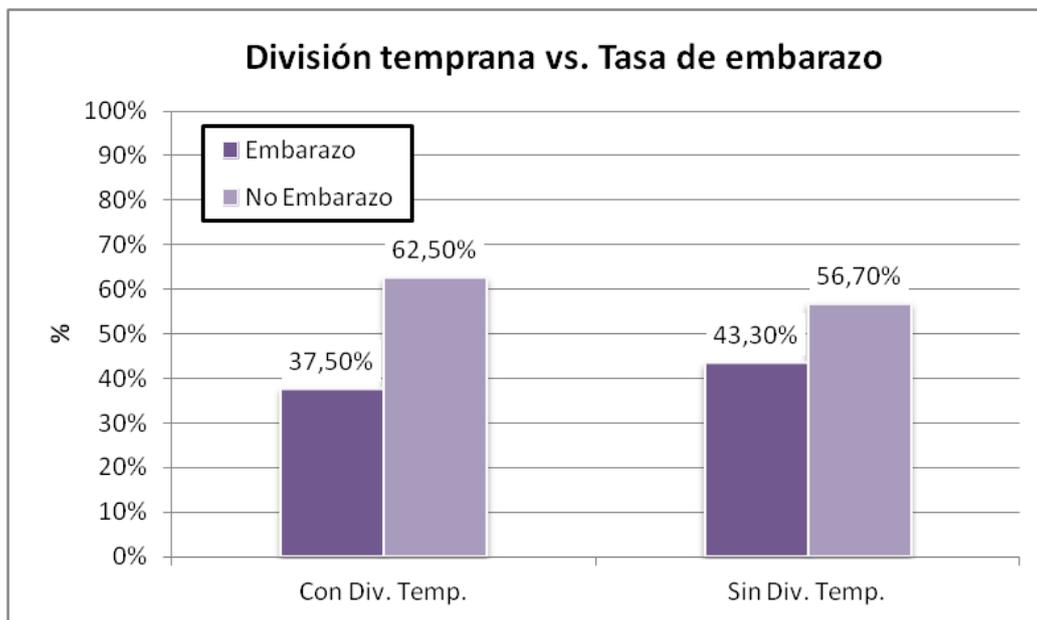
En vista a los resultados obtenidos, la transferencia de embriones con un número de pronúcleos diferente al acostumbrado (2 PN) se relaciona con bajas tasas de implantación y subsecuente embarazo. Se ha de considerar que los porcentajes de tasas de embarazo correspondientes a embriones transferidos con un número de pronúcleos extraordinario no tienen por qué indicar que dichos cigotos han sido los responsables de generar gestación, sino que puede deberse a una transferencia conjunta con embriones de óptimas características.

Afectación de la escisión temprana

Se considera que se produce el fenómeno de escisión temprana cuando el cigoto se divide entre las 25 y las 27 horas posteriores a la inseminación.²¹ Algunos autores como Shoukir et al. Han documentado que los embriones que se dividen con anterioridad tienen una mayor probabilidad de convertirse en blastocistos e implantar.^{11,16} Sin embargo, la relación entre la división temprana y los resultados clínicos, el desarrollo y la calidad embrionaria se considera hoy en día controvertida.²¹

En el presente análisis, un total de 54 embriones correspondientes a 48 ciclos presentaron escisión temprana. De todos ellos, 18 ciclos (37.5%) frente a 30 ciclos (62.5%) resultaron en un embarazo. Por consiguiente, los 293 embriones restantes, correspondientes en este caso a 157 ciclos, no mostraron

signos de división temprana durante el desarrollo. Entre estos últimos, 68 ciclos (43.31%) desembocaron en un embarazo clínico, mientras que los 89 ciclos restantes (56.69%) arrojaron un resultado negativo.



Gráfica 2. Relación entre el evento de escisión temprana y la capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los eventos de escisión temprana durante el desarrollo embrionario no parecen correlacionar con mejoras en las tasas de implantación como documentan algunos autores. Para extraer juicios concluyentes sería necesario el análisis de un mayor número de muestra que presente dichas características.

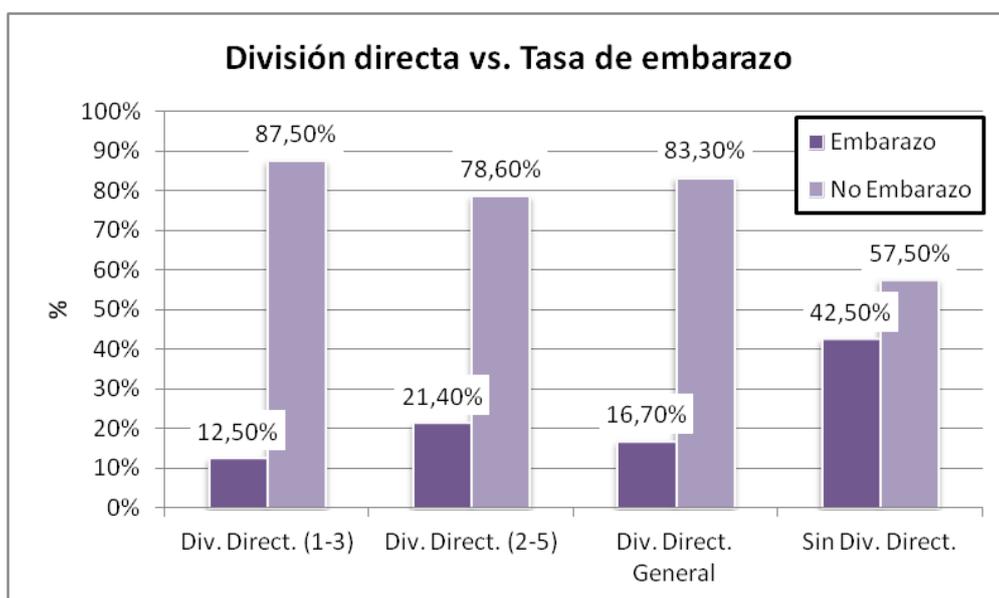
Afectación de la división directa

La escisión directa hace referencia a una división irregular durante el desarrollo embrionario en la que un blastómero divide directamente a tres o más células hijas. Suele originarse como resultado de una mitosis tricotómica asociada a fallos en el huso acromático, hipotéticamente causada por un alto e irregular número de centriolos que conducen a una distribución cromosómica aberrante. Dicho patrón de división puede ocurrir durante cualquier etapa de escisión, pero de especial importancia durante el primer y segundo ciclo mitótico.²⁷ Rubio et al. Confirmaron que los embriones con este patrón de división irregular mostraban tasas de implantación muy bajas (del orden del 1.2%), lo que les llevó a sugerir que excluirlos de la transferencia mejoraría los resultados obtenidos. Sin embargo, con posterioridad, Lagalla et al. Demostraron que los embriones que sufrían escisión directa a menudo eran capaces de desarrollarse y dar lugar a un blastocisto euploide, manifestando de esta forma que no deberían descartarse por presentar dicha característica. Curiosamente, suele tratarse de embriones que exhiben una compactación incompleta con la extrusión de algunas células en el estadio de mórula, pudiendo tratarse de un mecanismo potencial de “autocorrección de aneuploidías”.¹¹

Durante este estudio se ha identificado la transferencia de un total de 32 embriones pertenecientes a 30 ciclos con patrón de escisión directa. De todos ellos, 5 ciclos (16.67%) resultaron en embarazo frente a los 25 ciclos restantes (83.33%). Se llevó a cabo un análisis más detallado atendiendo al momento en el que se producía la división aberrante en el desarrollo, diferenciando embriones que pasaban de

estadio de 1 a 3 células, y embriones que a su vez, evolucionaban de 2 a 5 células, con el objetivo de estudiar la gravedad del parámetro en función de su cronología. En el primer caso, se identificaron 17 embriones, de 16 ciclos, que daban lugar a tres células como resultado de la primera mitosis. Sólo 2 de dichos ciclos (12.5%) resultaron en un embarazo clínico frente a los 14 ciclos restantes (87.5%). En el segundo caso, se detectó la transferencia de 15 embriones pertenecientes a 14 ciclos con evolución directa desde 2 a 5 células. Únicamente 3 de esos ciclos (21.43%) arrojaron un resultado positivo, mientras que los otros 11 ciclos (78.57%) no dieron lugar a gestación.

Adicionalmente, se han analizado los datos correspondientes a embriones que durante su desarrollo no presentaban este parámetro. Un total de 315 embriones correspondientes a 167 ciclos evolucionaban sin experimentar divisiones directas anormales. Sin embargo, de todos ellos, únicamente un 42.51% de los ciclos (n=71 ciclos) desembocaron en gestación, en comparación con los 96 ciclos (57.49%) que no lo hicieron.



Gráfica 3. Relación entre el evento de escisión directa, tanto en términos generales como en función de la temporalización (bien se produzca división directa de 1 a 3 células o de 2 a 5 células), y la capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

En líneas generales, el análisis de los resultados obtenidos corrobora que los fenómenos de escisión directa, como ya indicaron en estudios anteriores otros autores, se relacionan con una baja tasa de implantación en comparación con ciclos en los que se transfieren embriones con patrón de división regular. Más detalladamente, atendiendo a la cronología en que puede darse el evento objeto de estudio en cuestión, es posible concluir que una incidencia en etapas anteriores del desarrollo se caracteriza por un peor pronóstico, vinculándose con unas tasa de implantación, y por consiguiente, unas tasas de embarazo inferiores, lo cual, en cierta medida, es un resultado esperado puesto que cuanto mayor sea la precocidad con que se dé el proceso, mayor será el número de células resultantes con alteraciones cromosómicas.

Afectación del grado de fragmentación

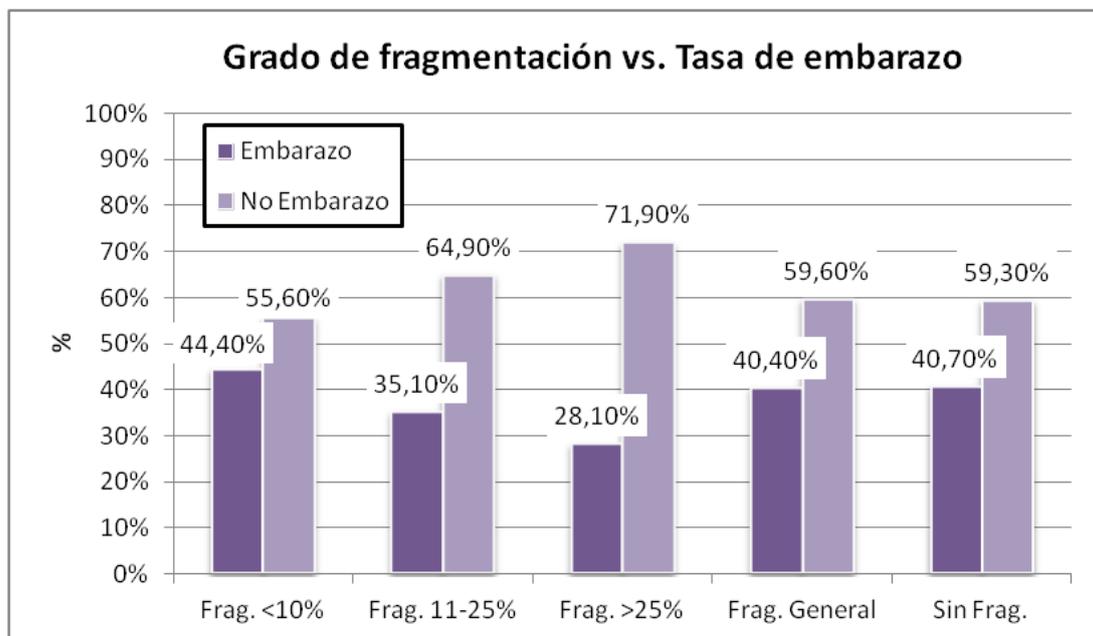
Se define un fragmento como una estructura citoplasmática extracelular anuclear unida a la membrana que en conjunto, puede suponer un porcentaje variable del volumen total del embrión.²⁸ Se trata de un parámetro que afecta, en mayor o menor medida, a ~ 80% de los embriones, por lo que se interpreta

como un proceso habitual adicional en el desarrollo normal del embrión. Sin embargo, en lo que concierne a este aspecto hay cierta controversia. Racowsky et al. Afirmaron que la fragmentación en los estadios tempranos del desarrollo reducía la viabilidad del embrión como consecuencia de anomalías que terminaban desembocando en un bloqueo embrionario. En cambio, otros autores estudiaron y concluyeron que grados de fragmentación incluso en torno al 20-25% no afectaban a la implantación del embrión en cuestión.²¹

En este estudio, se han detectado un total de 273 embriones, pertenecientes a 151 ciclos, con fragmentación durante el desarrollo, de los que 61 ciclos (40.4%) generaron un embarazo frente a 90 ciclos (59.6%) que desembocaron en un resultado negativo. Para profundizar el estudio y determinar con mayor precisión la afectación de este parámetro, se definió una clasificación en tres grados de fragmentación: inferior al 10%, entre el 11-25%, y superior al 25%.

En el primer caso, un total de 161 embriones correspondientes a 108 ciclos presentaron menos de un 10% de fragmentación. 48 de esos ciclos (44.44%) generaron un embarazo frente a los 60 ciclos (55.56%) restantes. En el segundo caso, se detectaron 70 embriones, de 57 ciclos, con un grado de fragmentación entre el 11-25%. De todos ellos, 20 ciclos (35.09%) en comparación con los otros 37 ciclos (64.91%) resultaron en gestación. Finalmente, en el tercer caso, se identificaron 43 embriones, incluidos en un total de 32 ciclos, con un grado de fragmentación superior al 25%. Entre estos últimos, únicamente un 28.13% de los ciclos (n=9 ciclos) suscitaron un embarazo, y por consiguiente, un 71.87% de los ciclos (n=23 ciclos) no lo hicieron.

Adicionalmente, se analizaron aquellos embriones que se desarrollaban en ausencia absoluta de fragmentación. Se trataba de un grupo constituido por 74 embriones correspondientes a 54 ciclos. De todos ellos, 22 ciclos (40.74%) evolucionaron con óptimas tasas de implantación, mientras que los 32 ciclos restantes (59.26%) no resultaron en gestación.



Gráfica 4. Relación entre el grado de fragmentación, tanto en términos generales como atendiendo a distintas gradaciones (<10%, 11-25%, >25%), y su relación con la capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

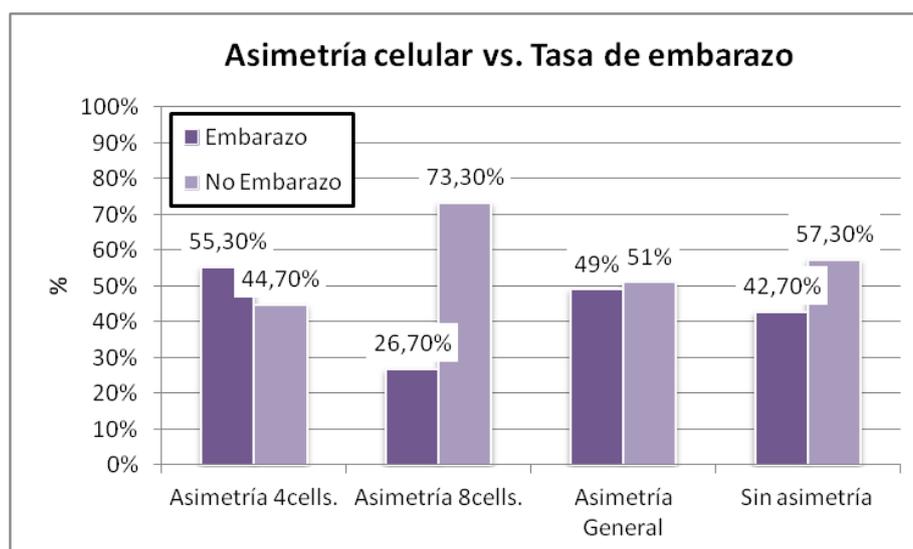
En una interpretación generalista de los rendimientos obtenidos, la aparición de fragmentación durante el desarrollo embrionario no parecería afectar a la tasa de implantación posterior al relacionarse con tasas de embarazo similares a las obtenidas como resultado de la transferencia de embriones carentes de dicha anomalía. Sin embargo, un análisis más detallado parece indicar que a medida que aumenta el grado de fragmentación que presenta un embrión, es posible detectar una relación con inferiores tasas de implantación.

Afectación de la asimetría de los blastómeros

El proceso de división celular ha de ser simétrico para garantizar que cada una de las células hijas que se generan contiene el material citoplasmático suficiente para garantizar su capacidad de desarrollo posterior. En casos en los que ello no sucede, se habla de división asimétrica y se caracteriza por la generación de células hijas de distinto tamaño. De acuerdo con las apuntes de Hardarson et al. Se considera asimetría cuando la diferencia en el diámetro de los blastómeros de mayor y menor tamaño es superior al 20%.²¹

Durante este análisis se han identificado un total de 60 embriones pertenecientes a 51 ciclos con asimetría en el tamaño de los blastómeros. En líneas generales, un 49.02% de los ciclos (n=25) frente a un 50.98% (n=26) resultaron en embarazo. Para ampliar su estudio, se clasificaron los embriones en cuestión en función de si la desigualdad en el tamaño de las células constituyentes se detectaba cuando el embrión se encontraba en estadio de cuatro u ocho células. En el primer caso, se detectaron 46 embriones correspondientes a 38 ciclos con blastómeros desiguales en estadio de cuatro células. De ellos, 21 ciclos (55.26%) frente a 17 ciclos (44.74%) resultaron en una correcta implantación. En el segundo caso, 15 embriones pertenecientes a 15 ciclos se caracterizaban por presentar células de tamaño desigual en estadio de ocho células. Entre éstos, únicamente 4 ciclos (26.67%) frente a los restantes 11 ciclos (73.33%) desembocaron en gestación.

Así mismo, también se analizó el conjunto de embriones que se desarrollaba con simetría celular (o desigualdad inferior al 20% en tamaño), grupo constituido por un total de 287 integrantes correspondientes a 164 ciclos, de los cuales, 70 ciclos (42.68%) generaron embarazo en contraste con los 94 ciclos (57.32%) restantes.



Gráfica 5. Relación entre la detección de asimetría en el tamaño celular, tanto en general como en estadio de 4 u 8 células, y su capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

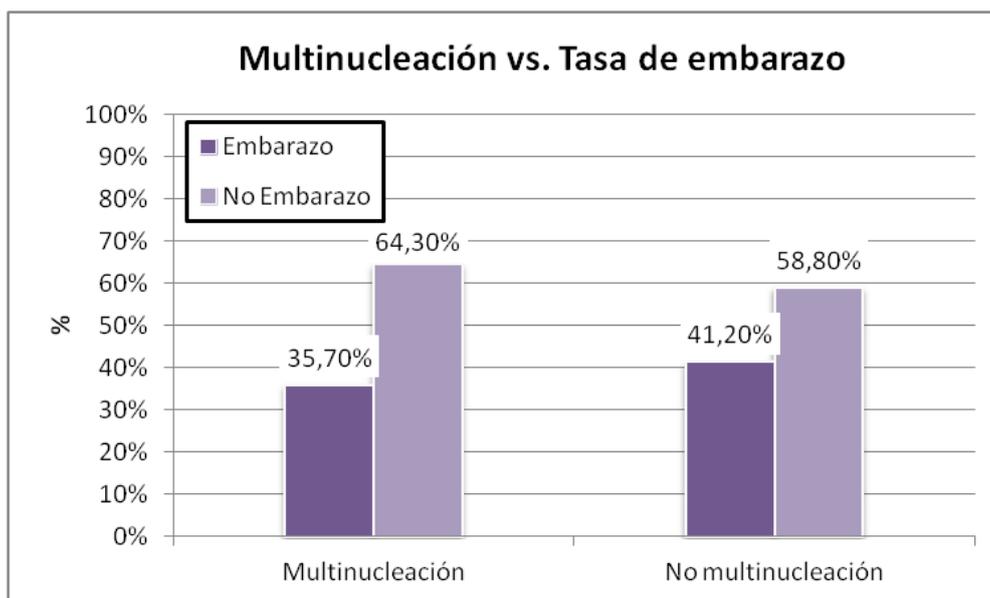
En cuanto a este respecto, los resultados generales parecen indicar que la presencia de asimetría en el tamaño celular no se correlaciona con tasas de implantación más bajas. Bien es cierto que un análisis más detallado atendiendo al estadio de desarrollo, en términos de número de células, en que se produce el fenómeno indica que la afectación en etapas tempranas de evolución no supone una reducción en las tasas de embarazo, pero en cambio, sí es posible detectar cierta implicación cuando el parámetro se da en embriones en estadio de desarrollo más avanzado. La revisión de las imágenes obtenidas con sistemas *time-lapse* pone de manifiesto que los embriones son capaces de corregir la asimetría detectada en etapas prematuras a medida que se van desarrollando, probablemente debido al carácter totipotencial de los blastómeros en cuestión. Sin embargo, cuando el evento acontece en estadios más diferenciados, momento en que las células comienzan a especializarse, parece ser que es más complicado que se produzca una reparación, relacionándose en consecuencia con menores tasas de implantación.

Afectación de la multinucleación

La multinucleación se define como la presencia de más de un núcleo en un solo blastómero, incluidos los micronúcleos. Aunque bien es cierto que se desconoce el mecanismo exacto por el que se genera, hipótesis sugieren que se debe a un proceso de cariocinesis sin posterior citocinesis o, alternativamente, consecuencia de errores en la segregación y el empaquetamiento cromosómico durante el ciclo mitótico. Por tanto, se trata de una característica que suele asociarse a células cromosómicamente anormales,²⁷ de ahí que se haya considerado un factor de mal pronóstico con bajo potencial de implantación. Dicha razón ha llevado al consejo general de, siempre que sea evitable, no transferir embriones con estas propiedades a pesar de que se han publicado nacimientos de niños sanos a partir de embriones multinucleados.²¹

Así mismo, se ha documentado que determinados casos de binucleación en día dos y tres de evolución no parecen tener afectación aberrante a la posterior tasa de implantación del embrión en cuestión, siempre y cuando éstos se caractericen por presentar un desarrollo óptimo.²¹ De ahí que a la hora de analizar las grabaciones del sistema *time-lapse* no se haya considerado como multinucleación la presencia de binucleación en estadio de cuatro células ni la presencia de binucleación con afectación a un máximo de dos blastómeros cuando el embrión se encontraba en estadio de ocho células.

A este respecto, se han registrado datos de un total de 110 embriones transferidos, correspondientes a 84 ciclos, que presentaban multinucleación. De todos ellos, 30 ciclos (35.71%) dieron un resultado positivo de embarazo, mientras que 54 ciclos (64.29%) arrojaron un rendimiento negativo. Por contraposición, los restantes 237 embriones transferidos, pertenecientes a 148 ciclos, en un 41.22% de los casos (n=61 ciclos) desencadenaron un embarazo y en un 58.78% (n=87) el desenlace fue negativo.



Gráfica 6. Relación entre la presencia de multinucleación y la capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

Atendiendo a los datos derivados del estudio, es posible detectar un ligero descenso en la tasa de embarazo al comparar los porcentajes de ciclos con resultado positivo entre los embriones multinucleados transferidos y los uninucleados, sin embargo, la diferencia detectada no parece ser estadísticamente significativa por lo que sería necesario un análisis con un mayor tamaño muestral para establecer conclusiones punteras sobre la afectación de este fenómeno en la tasa de embarazo resultante.

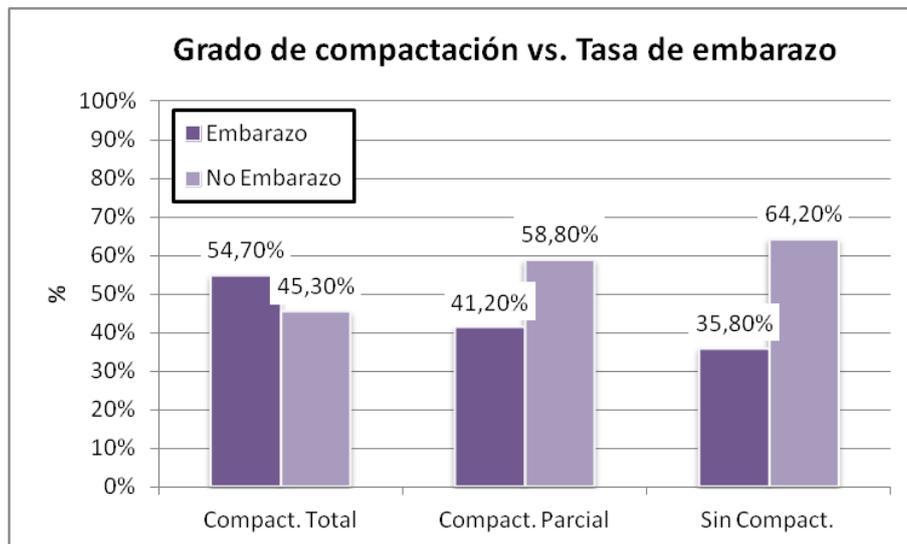
Afectación del grado de compactación en estadio de mórula

La compactación en mórula es un punto clave a considerar durante el desarrollo, consecuencia de la activación del genoma embrionario. Suele coincidir con la cuarta ronda de divisiones mitóticas que darán lugar a un embrión de más de ocho células. Se caracteriza por un aumento del grado de adhesión celular, representado por la aparición de amplias zonas de contacto entre los blastómeros que desembocarán finalmente en una masa de células compactas en la que únicamente se podrán distinguir los núcleos de los blastómeros constituyentes pero no sus contornos celulares. Se considera que en este estadio las células dejan de ser totipotentes, dando lugar a un embrión ya especializado.

Es posible diferenciar distintos grados de compactación. Se habla de compactación total cuando afecta a todas las células del embrión, caracterizándose por la apariencia de una masa multicelular. En cambio, se habla de compactación parcial cuando se detecta la exclusión de al menos más de una célula (sin consideración de los posibles fragmentos existentes) durante el proceso de compactación. Según Tao et al. El pronóstico implantatorio depende del porcentaje del embrión excluido en el proceso de compactación.²¹

En el análisis realizado se han detectado un total de 89 embriones correspondientes a 53 ciclos que presentaban un grado de compactación completo. Del total de dichos ciclos, un 45.28% (n=24) no generó embarazo frente a un 54.72% (n=29) que sí lo hizo. Así mismo, se identificaron 23 embriones pertenecientes esta vez a 17 ciclos con un grado de compactación parcial. En este último caso, 7 ciclos (41.18%) desembocaron en un embarazo, mientras que 10 ciclos (58.82%) generaron un resultado negativo.

En caso de las transferencias de embriones sin alcanzar el estadio de mórula, bien porque fueron incapaces de compactar durante el cultivo *in vitro* o bien porque presentaban un patrón de desarrollo más lento, se detectaron un total de 258 embriones, correspondientes a 134 ciclos. De todos ellos, únicamente 48 ciclos (35.82%) concluyeron con gestación frente a los 86 ciclos (64.18%) restantes.



Gráfica 7. Relación entre el grado de compactación alcanzado en estadio de mórula (compactación total, compactación parcial, ausencia de compactación) y su capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la transferencia de embriones con distinto grado de compactación mejora relativamente las tasas de embarazo en comparación con la transferencia de embriones carentes de la misma. Así mismo, cuando la compactación es total, las tasas de implantación son ligeramente superiores a las obtenidas en casos de transferencia de embriones con grados de compactación parcial, pero en ambas condiciones se obtiene un óptimo desenlace dentro del rango de tasa de embarazo esperado.

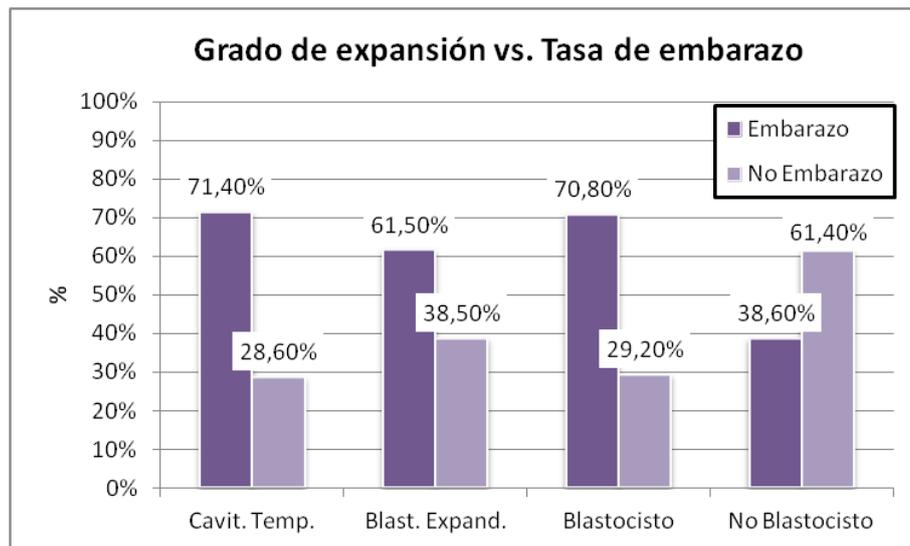
Afectación del grado de expansión en estadio de blastocisto

En última instancia, la observación del blastocele se caracteriza por presentar buenas tasas de implantación y se considera que su formación se relaciona con una adecuada maduración trofoblástica. El proceso comienza con una etapa de cavitación temprana y a medida que se produce la expansión del blastocele, le acompaña un afinamiento del grosor de la zona pelúcida, que llega a ser mínimo, momento en que se considera que el blastocisto se encuentra totalmente expandido.²¹

En el conjunto de imágenes de *time-lapse* analizadas durante este estudio, se detectaron un total de 34 embriones transferidos, correspondientes a 24 ciclos, que habían comenzado a cavitarse o habían logrado alcanzar el estadio de blastocisto expandido. Del total, un 70.83% de los casos (n=17 ciclos) presentaron buenas tasas de implantación en comparación con el otro 29.17% de los casos restantes (n=7 ciclos). El análisis independiente de embriones en etapas de cavitación temprana o blastocistos totalmente expandidos no resultó relevante, alcanzándose tasas de implantación del orden del 71.43% y del 61.54% respectivamente.

En contraposición, un total de 313 embriones pertenecientes a 158 ciclos se transfirieron sin alcanzar el estadio de blastocisto, bien porque no llegó a desarrollarse en las condiciones de cultivo *in vitro* o bien porque la transferencia de los mismos tuvo lugar en estadios prematuros, generalmente a día tres

de desarrollo. En este último caso, de todos los ciclos, 61 (38.61%) resultaron en embarazo en comparación con los 97 ciclos restantes (61.39%).



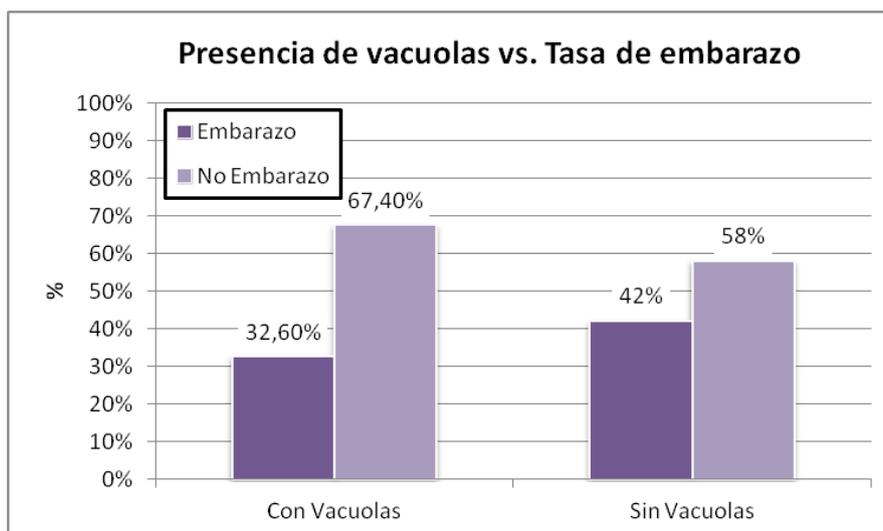
Gráfica 8. Relación entre el grado de expansión en estadio de blastocisto (en sus comienzos -cavitación temprana-, en su totalidad -blastocisto expandido-, o en términos generales), y su capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

Atendiendo a los resultados obtenidos relacionados con el grado de expansión, es posible detectar una notoria mejora en cuanto a las tasas de implantación y embarazo cuando se transfieren embriones en estadio de blastocisto que cuando éstos se encuentran en etapas prematuras de desarrollo. El embrión en esa etapa se caracteriza por un mayor grado de madurez que le permite adaptarse con mayor éxito a las condiciones del tracto reproductor de la receptora en cuestión. Adicionalmente, se puede apreciar un ligero aumento en la tasa de embarazo cuando la transferencia se realiza en las primeras fases de expansión (cavitación temprana) que cuando se ha alcanzado el estadio de blastocisto totalmente expandido. Ello puede correlacionarse con hipótesis previamente documentadas de que los embriones que se desarrollan con anterioridad tienen asociada una mayor probabilidad de implantar.¹⁶

Afectación de la presencia de vacuolas

Adicionalmente, se evaluó la afectación de la presencia de vacuolas durante el desarrollo embrionario, un parámetro que a pesar de su relativa frecuencia, ha sido poco estudiado. Concretamente, las vacuolas se definen como inclusiones citoplasmáticas membranosas rellenas de un fluido idéntico al localizado en el espacio perivitelino. En líneas generales, se considera que la presencia de múltiples vacuolas de pequeño tamaño no compromete el desarrollo posterior del embrión, mientras que una vacuolización extensa puede resultar perjudicial y afectar gravemente a las tasas de implantación.²¹

Durante este análisis, se detectaron un total de 50 embriones correspondientes a 46 ciclos que habían sido transferidos a pesar de la presencia de vacuolas de distinto tamaño en su citoplasma. Como resultado, un 32.61% de los casos (n=15 ciclos) logró generar un embarazo, mientras que un 67.39% de los casos (n=31) no lo hizo. En contraste, los restantes 297 embriones transferidos, provenientes de 162 ciclos, no presentaban vacuolización. De todos ellos, 68 ciclos (41.97%) generaron gestación frente a 94 ciclos (58.03%) que no lo hicieron.



Gráfica 9. Relación entre la presencia/ausencia de vacuolas en el citoplasma del embrión y su capacidad de generar o no un embarazo. Datos representados en porcentajes respecto al número de ciclos.

Por último, el estudio de la afectación de la presencia de vacuolas parece indicar un ligero descenso en la tasa de embarazo resultante en comparación con la transferencia de embriones carentes de vacuolas citoplasmáticas. Bien es cierto que para extraer conclusiones sería necesario un análisis más detallado atendiendo, entre otros parámetros, al volumen embrionario afectado por la vacuolización.

Validación de un nuevo sistema de puntuación

Un objetivo adicional perseguido con este trabajo consistía en la valoración de la adecuación de un sistema de puntuación propuesto (Anexo II) basado en los conocimientos actuales sobre la afectación a las tasas de implantación de los diferentes eventos que pueden tener lugar durante el desarrollo embrionario.

Atendiendo a los datos -y a sus puntuaciones correspondientes en cuestión- de los embriones transferidos, que habían desembocado en un resultado positivo de embarazo, se llevó a cabo un análisis estadístico con el propósito de definir una serie de intervalos de puntuación que pudieran resultar útiles para fijar valores críticos a partir de los cuales poder predecir la capacidad de implantación o no de un determinado embrión objeto de estudio. Para ello, se examinaron las puntuaciones correspondientes a estadio en día 3 de los embriones transferidos, reduciendo de esta forma el error asociado al estudiar conjuntamente embriones transferidos en día 5 de evolución. Así mismo, cabe destacar que en aquellos ciclos en que se transfirieron múltiples embriones, únicamente se tuvo en consideración el embrión con la puntuación de mayor valor que en principio, se asociaría con una mayor probabilidad de implantación. Como resultado se obtuvo:

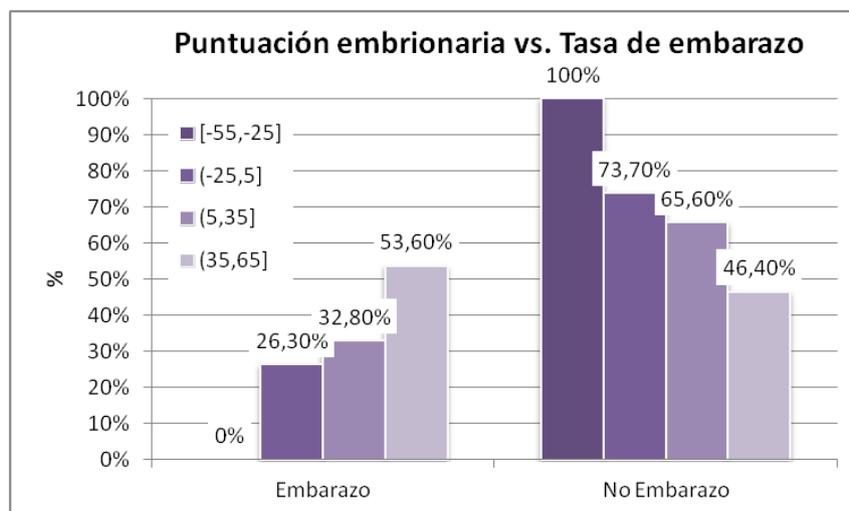
Embrión	Tamaño muestral	Mínimo	Máximo	Rango	Moda	Media	Desviación estándar	CI 95%
D+3	42	-10	65	75	40	38.21	13.83	0.13
D+4	11	-5	60	65	45	33.08	17.90	0.34
D+5	18	-15	65	80	40	34.44	21.48	0.32
Global	71	-15	65	80	40	36.55	16.55	0.12

Tabla 1. Análisis estadístico de las puntuaciones embrionarias atendiendo a los embriones transferidos en día 3 (D+3), en estadio de mórula (D+4), en día 5 (D+5) y al conjunto total de embriones (Global). Independientemente del día de la transferencia, las puntuaciones base han sido calculadas para el estadio correspondiente a día 3.

Es posible observar que la puntuación promedio de los embriones resultantes en gestación se encuentra en torno a valores próximos a 35-40 con una gran desviación estándar que manifiesta una amplia dispersión respecto a la media pero con un intervalo de confianza del 95% de gran precisión.

Considerando el sistema de puntuación establecido, un embrión en día tres podría alcanzar una máxima puntuación de 65, mientras que el mínimo valor posible optado sería -55. En función del rango de dichos valores, es posible definir cuatro intervalos de clasificación embrionaria: [-55, -25]; (-25, 5]; (5, 35] y (35, 65]. Del total de embriones transferidos que desembocaron en un embarazo (n=71), 0, 5 (7%), 21 (29.6%) y 45 (63.4%) correspondían a cada uno de los intervalos delimitados, motivo por el que se les asignó las categorías de embriones con muy baja o nula; baja; media; y alta capacidad de implantación respectivamente. A su vez, en lo que respecta a los embriones transferidos que no generaron embarazo, de un total de 100 ciclos, la distribución se ajustó a: 7%, 14%, 40% y 39% respectivamente.

Por último, se llevó a cabo el estudio conjunto del total de embriones transferidos, atendiendo a los rangos de puntuaciones previamente definidos. En el intervalo de puntuación de [-55, -25] se identificaron un total de 7 embriones, todos los cuales (100%) fueron incapaces de generar un embarazo. En el intervalo de (-25,5] se encontraron un total de 19 embriones, 5 de los cuales (26.3%) generaron un embarazo, y los 14 restantes (73.7%) arrojaron un resultado negativo de gestación. En el siguiente rango de puntuación, (5, 35], se registraron 61 embriones, de los cuales, 21 (32.8%) desembocaron en gestación y los 40 restantes (65.6%) no lo hicieron. En último lugar, en el intervalo de (35, 65] puntos se identificaron un total de 84 embriones. De todos ellos, 45 (53.6%) resultaron en un embarazo frente a los 39 faltantes (46.4%).



Gráfica 10. Relación comparativa entre los intervalos de puntuación embrionaria previamente definidos y las tasas de embarazo y no embarazo asociadas de los embriones objetos de estudio transferidos.

Es posible observar un paulatino incremento de embriones con tasa de embarazo positiva y por consiguiente, un sincopado descenso de embriones con tasas de gestación negativas para los intervalos asignados a las distintas categorías (muy baja/nula, baja, media y alta capacidad de implantación). Podrían constituir unos primeros límites de referencia para la clasificación embrionaria, pero indudablemente sería necesario el estudio más detallado de un mayor tamaño muestral para definir unos intervalos más específicos en que se aprecie una diferencia percentil superior entre embriones con tasas de embarazo positivas y negativas con capacidad predictiva más certera de su posible competencia implantatoria.

CONCLUSIONES

1. La transferencia de embriones con un número de pronúcleos diferente al habitual se relaciona con bajas tasas de implantación.
2. La escisión temprana no parece correlacionar con mejoras en la tasa de implantación aunque para extraer juicios concluyentes, se necesitan estudios con mayor tamaño muestral.
3. Los embriones con anomalías de escisión directa se caracterizan por una baja tasa de implantación, la cual se agudiza cuando se produce en etapas prematuras del desarrollo.
4. La tasa de embarazo se reduce significativamente a medida que aumenta el grado de fragmentación del embrión.
5. El efecto de la asimetría celular no queda claro. Parece afectar cuando ocurre en estadíos más avanzados de desarrollo, pero su dilucidación requiere más estudio.
6. No se han obtenido resultados concluyentes sobre cómo afectan la multinucleación y la presencia de vacuolas. Únicamente se aprecia un ligero descenso en la tasa de implantación pero igualmente, se necesita un análisis más profundo.
7. La transferencia de blastocistos y embriones con distintos grado de compactación se relacionan con una mejora significativa de las tasas de embarazo.
8. Se podría establecer un sistema de puntuación de clasificación embrionaria definiendo los intervalos [-55, -25]; (-25, 5]; (5, 35] y (35, 65], y relacionándolos con embriones de muy baja/nula, baja, media y alta capacidad de implantación, pero se requiere un análisis más profundo para delimitar intervalos más precisos.

CONCLUSIONS

1. Embryos' transfer with a different number of pronuclei than usual is related to low implantation rates.
2. Early cleavage does not seem to correlate with improvements in implantation rates although it would be necessary the analysis of a larger sample size to deduce conclusive judgments.
3. Embryo's with direct cleavage abnormalities are characterized by low implantation rates which aggravates when they occur in early development stages.
4. The pregnancy rates are significantly reduced as the embryo's fragmentation degree increases.
5. It is unclear the effect of cellular asymmetry. It seems to affect when it occurs in advanced development stages but its elucidated needs further study.
6. It has not been possible to obtain conclusive results about how multinucleation and vacuoles' presence affect. Only it is appreciated a slight decrease in the implantation rate but likewise, additional studies are necessary.
7. The transfer of blastocysts and embryos with different compaction degree is related to a meaningful improvement in pregnancy rates.
8. It could be possible to establish a scoring system of embryonic classification defining the intervals [-55, -25]; (-25, 5]; (5, 35] and (35, 65], relating them to embryos with very low/null, low, medium, and high implantation ability, but it is necessary a deeper analysis to delimitate more precise intervals.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mandawala A.A., Harvey S.C, Roy T.K and Fowler K.E. *Time-lapse embryo imaging and morphokinetic profiling: towards a general characterization of embryogenesis*. Animal Reproduction Science. 2016; 174: 2-10.
2. Wong C.C, Loewke K.E, Bossert N.L, Behr B, De Jonge C.J, Baer T.M et al. *Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage*. Nature Biotechnology. 2010; 28(10): 1115-1124.
3. Kirkegaard K., Agerholm I.E. and Ingerslev H.J. *Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment*. Human Reproduction. 2012; 27(5): 1277-1285.
4. Omidi M., Faramarzi A., Agharahimi A. and Ali Khalili M. *Noninvasive imaging systems for gametes and embryo selection in IVF programs: a review*. Journal of Microscopy. 2017; 0(0): 1-12.
5. Faramarzi A., Ali Khalili M., Micara G. and Agharahimi A. *Revealing the secret life of pre-implantation embryos by time-lapse monitoring: A review*. Int J Reprod BioMed. 2017; 15(5): 257-264.
6. Basile N., Caiazza M. and Meseguer M. *What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes?* Curr Opin Obstet Gynecol. 2015; 27: 193-200.
7. Cuevas I. *Time-lapse. Parámetros citocinéticos*. [Curso] Clasificación embrionaria clásica vs time lapse. ASEBIR. 2017.
8. Conaghan J. *Time-lapse imaging of preimplantation embryos*. Semin Reprod Med. 2014; 32(2): 134-140.
9. Bhide P., Maheshwari A., Cutting R., Seenan S., Patel A., Khan K. et al. *Time lapse imaging: is it time to incorporate this technology into routine clinical practice?* Human Fertility. 2017; 20(2): 74-79.
10. Armstrong S., Arroll N., Cree L.M., Jordan V. and Farquhar C. *Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction (review)*. Cochrane Database of Systematic Reviews. 2015; 2 (CD011320).
11. Zaninovic N., Irani M. and Meseguer M. *Assessment of embryo morphology and developmental dynamics by time-lapse microscopy: is there a relation to implantation and ploidy?* Fertil Steril. 2017; 108(5): 722-729.
12. Herrero J. and Meseguer M. *Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics*. Fertil Steril. 2013; 99 (4): 1030-1034.
13. Sigalos G.A., Triantafyllidou O. and Vlahos N.F. *Novel embryo selection techniques to increase embryo implantation in IVF attempts*. Arch Gynecol Obstet. 2016; 294 (6): 1117-1124.
14. Yang L., Cai S., Zhang S., Kong X., Gu Y., Lu C. et al. *Single embryo transfer by day 3 time-lapse selection versus day 5 conventional morphological selection: a randomized, open-label, non-inferiority trial*. Human Reproduction. 2018; 33(5): 869-876.

15. Rosenwaks Z. *Biomarkers of embryo viability: the search for the “holy grail” of embryo selection.* Fertil Steril. 2017; 108(5): 719-721.
16. Kovacs P. *Embryo selection: the role of time-lapse monitoring.* Reproductive Biology and Endocrinology. 2014; 12 (124): 1-11.
17. Kirkegaard K., Ahlström A., Ingerslev H.J. and Hardarson T. *Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology.* Fertil Steril. 2015; 103 (2): 323-332.
18. Yang S.H., Wu C.H., Chen Y.C., Yang C.K., Wu T.H., Chen P.C. et al. *Effect of morphokinetics and morphological dynamics of cleavage stage on embryo developmental potential: A time-lapse study.* Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology. 2018; 57: 76-82.
19. Rives N. *Factores que afectan en el uso del time-lapse.* [Curso] Clasificación embrionaria clásica vs time lapse. ASEBIR. 2017.
20. Findikli N. and Oral E. *Time-lapse embryo imaging technology: does it improve the clinical results?* Curr Opin Obstet Gynecol. 2014; 26(3): 138-144.
21. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción. *Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos.* 3ª Edición. Madrid: Góbal; 2015.
22. Desai N., Goldberg J.M., Austin C. and Falcone T. *Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy?* Fertil Steril. 2018; 109(4): 665-674.
23. Merck [Internet]. *Geri®: A world-class incubator with time-lapse functionality. Overview.* Darmstadt, Germany: Merck KGaA. [Consultado el 17/06/2018]. Disponible en: <https://www.professionalsinfertility.com/en/our-fertility-technology/geri.html>
24. Aparicio B., Romany L. and Meseguer M. *Selection of preimplantation embryos using time-lapse microscopy in in vitro fertilization: State of the technology and future directions.* Birth Defects Research. 2018; 110: 648-653.
25. Carrasco B. *Plataformas actuales de time lapse.* [Curso] Clasificación embrionaria clásica vs time lapse. ASEBIR. 2017.
26. Kieslinger D.C., De Gheselle S., Lambalk C.B., De Sutter P., Kostelick E.H., Twisk J.W.R. et al. *Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study.* Human Reproduction. 2016; 31(11): 2450-2457.
27. Pennetta F., Lagalla C. and Borini A. *Embryo morphokinetic characteristics and euploidy.* Curr Opin Obstet Gynecol. 2018; 30(3): 185-196.
28. Basile N., Vime P., Florensa M., Aparicio B., García J.A., Remohí J. et al. *The use of morphokinetics as a predictor of implantation: A multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection.* Human Reproduction. 2015; 30(2): 276-283.

ANEXO I

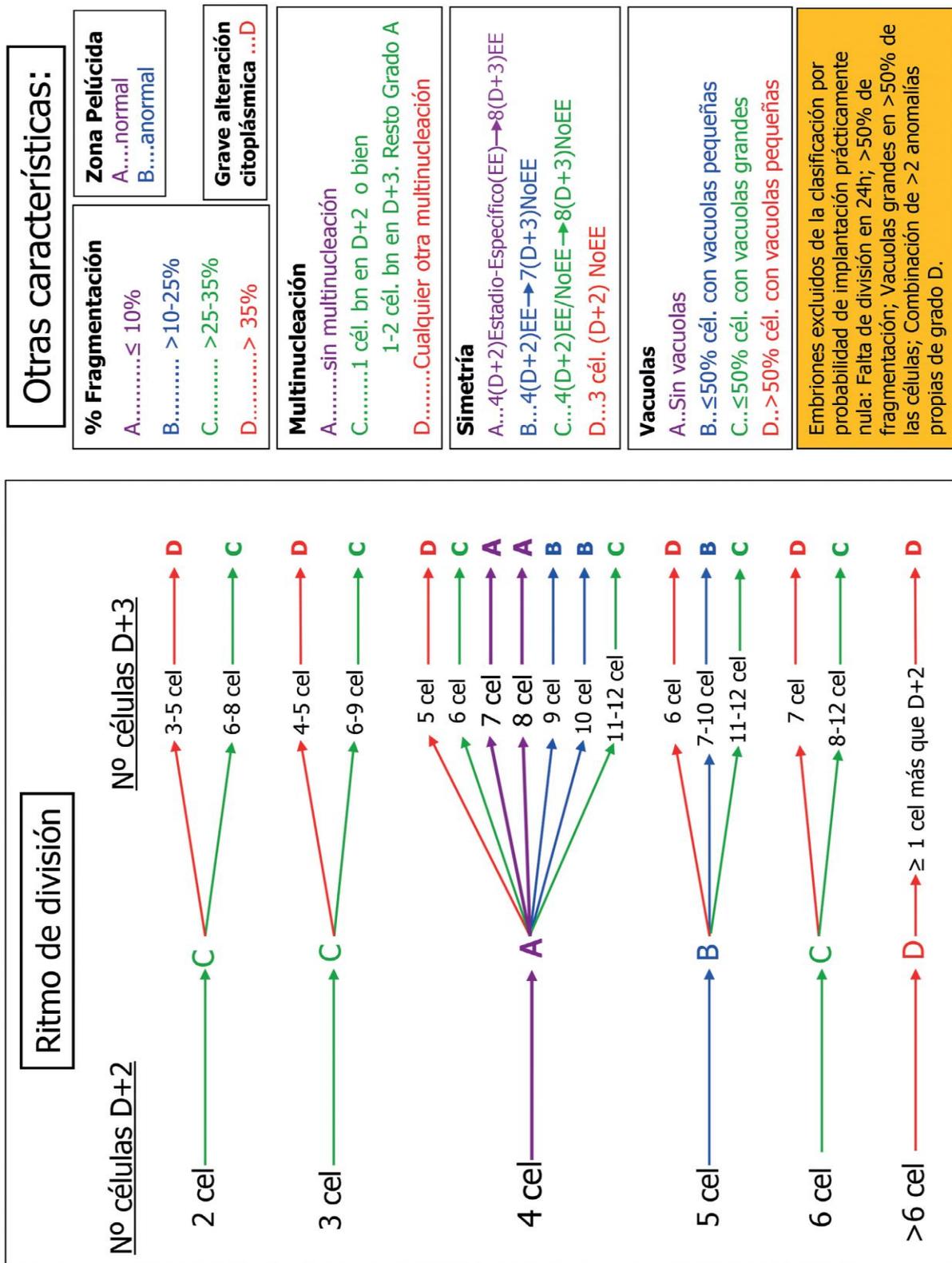


Ilustración 3. Clasificación categórica de embriones propuesta por ASEBIR atendiendo al ritmo de división, porcentaje de fragmentación, apariencia de la zona pelúcida, alteraciones citoplásmicas, multinucleación, simetría celular y presencia de vacuolas.

ANEXO II

Estadío de observación	Evento	Puntuación
Fertilización	Aparición de pronúcleos	10
	1 PN	-15
	3 PN	-60
D+2, hacia las 4 células	División temprana	+20
	4 células	25
	10% Fragmentación	-5
	11-25% Fragmentación	-15
	>25% Fragmentación	-30
	Desigualdad de tamaño entre blastómeros	-5
	Multinucleación	-15
	División directa	-50
D+3, hacia las 8 células	Parado	-100
	8 células	45
	10% Fragmentación	-5
	11-25% Fragmentación	-15
	>25% Fragmentación	-30
	Desigualdad de tamaño entre blastómeros	-5
	Multinucleación	-15
D+4, hacia mórula	Parado	-100
	Mórula	70
	>8 células	-15
	Compactación parcial	-10
D+5, hacia blastocisto	Parado	-100
	Cavitación temprana	100
	Blastocisto expandido	110
D+6, Eclosión	Eclosión completa del blastocisto	155

Tabla 2. Sistema de puntuación establecido atendiendo a cada uno de los posibles eventos susceptibles de ocurrir durante el desarrollo embrionario *in vitro*. Valores establecidos considerando el conocimiento actual acerca de la afectación de cada parámetro analizado sobre la tasa de implantación y embarazo del embrión resultante en cuestión.