



UNIVERSIDADE DA CORUÑA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

**LA VALORACIÓN DE UN SISTEMA *TIME-LAPSE* COMO  
HERRAMIENTA PARA LA OBSERVACIÓN DEL  
DESARROLLO EMBRIONARIO *IN VITRO***

Trabajo de Fin de Grado presentado por

**ROCÍO CASTRO VIÑUELAS**

Junio 2014

Dirigido por Dra. Mariana García García y Dra. María Esther Rodríguez  
Belmonte

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue realizado bajo la supervisión de la Dra. Mariana García García y de la Dra. María Esther Rodríguez Belmonte, a quienes me gustaría expresar mi más profundo agradecimiento por haber hecho posible la realización del mismo y sin quienes este trabajo no habría llegado a buen término. Además, quisiera agradecer la paciencia, tiempo y dedicación que todo el personal de la unidad de reproducción asistida del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) ha tenido para que este trabajo pudiera realizarse.

## RESUMEN

El éxito de los programas de reproducción asistida depende fundamentalmente de la selección de aquellos embriones con mayor potencial implantatorio. De manera convencional, la valoración de la calidad embrionaria con el fin de seleccionar qué embrión(es) transferir, se realiza en momentos muy concretos del desarrollo, lo que puede suponer la pérdida de información valiosa y comprometer la calidad de los embriones al extraerlos de las condiciones controladas y seguras del incubador. Los sistemas *time-lapse* pueden solucionar estos problemas al tratarse de métodos no invasivos que realizan un seguimiento continuo del desarrollo embrionario desde el interior del incubador. Teniendo esto en cuenta, el objetivo del presente trabajo fue valorar un sistema de análisis de imagen (Primo Vision) como herramienta en los tratamientos de reproducción asistida para la observación del desarrollo embrionario *in vitro*, mediante un análisis comparativo de resultados clínicos obtenidos en el Primo Vision (sistema *time-lapse*) y un incubador convencional. Los resultados obtenidos mostraron que este sistema *time-lapse* es una herramienta de trabajo segura, que posibilita un mejor desarrollo de los embriones y que proporciona la información necesaria para una toma de decisiones más objetiva por parte de los embriólogos, facilitando así los procedimientos de selección embrionaria.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN .....	1
1.- Fecundación <i>in vitro</i> : expectativas y limitaciones.....	1
2.- Selección embrionaria .....	2
2.1.- Métodos actuales de selección embrionaria .....	2
2.2.- Nuevos métodos de selección embrionaria .....	3
2.2.1.- Análisis metabólico .....	3
2.2.2.- Sistemas <i>time-lapse</i> .....	4
3.- Tipos de sistemas <i>time-lapse</i> .....	5
OBJETIVO .....	7
MATERIAL Y MÉTODOS .....	8
1.- Estimulación ovárica de las pacientes y recuperación de ovocitos .....	8
2.- Capacitación espermática .....	8
3.- Técnicas de fecundación <i>in vitro</i> .....	9
3.1.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) .....	9
3.2.- Fecundación <i>in vitro</i> convencional (FIV convencional) .....	9
4.- Valoración de la fecundación .....	9
5.- Incubación de los embriones .....	10
6.- Clasificación y selección embrionaria .....	11
6.1.- Sistema convencional .....	11
6.2.- Sistema de análisis de imagen: el Primo Vision .....	13
6.2.1.- Software Primo Vision v. 4.2 .....	14
6.2.2.- Variables de estudio en el sistema de análisis de imagen .....	15
6.2.3.- Clasificación embrionaria .....	15
7.- Transferencia embrionaria .....	15
8.- Análisis de los datos .....	16
RESULTADOS .....	17
1.- Análisis descriptivo .....	17
2.- Análisis comparativo .....	17
2.1.- Calidad embrionaria en día 2 de desarrollo .....	17
2.2.- Transferencia embrionaria en día 2 y día 3 .....	18
2.3.- Tasa de blastocisto alcanzada, proporción de embriones no viables, vitriificados y transferidos .....	18
DISCUSIÓN .....	20
CONCLUSIONES .....	23
BIBLIOGRAFÍA .....	24

# INTRODUCCIÓN

## 1.- Fecundación *in vitro*: expectativas y limitaciones

Desde que en 1978 nació el primer “bebé-probeta” tras un procedimiento de fecundación *in vitro*, Louise Brown, las tasas de gestación en reproducción asistida han ido aumentando paulatinamente en todo el mundo (Machtinger & Racowsky, 2013). Diversos cambios introducidos en los centros de reproducción encaminados a mejorar la estimulación de la ovulación, las condiciones ambientales de los laboratorios o la composición de los medios de cultivo (Blanes *et al.*, 2008), junto con avances tanto en el área clínica como en investigación básica, han permitido que, hoy en día, el número de recién nacidos vivos tras procedimientos de fecundación *in vitro* suponga un 2-4% de los nacimientos anuales en Europa (Tejera *et al.*, 2013). Sin embargo, a pesar de las mejoras introducidas en este campo, un elevado porcentaje de los embriones obtenidos *in vitro* y transferidos ven interrumpido su desarrollo, lo que refleja cierta incapacidad para diferenciar eficazmente los embriones competentes de aquellos que no lo son (Cruz *et al.*, 2011).

Ante la incapacidad de garantizar el potencial implantatorio de los embriones transferidos y con el objetivo de aumentar las probabilidades de gestación, la transferencia de más de un embrión se ha convertido en una de las prácticas más comunes en la actividad diaria (Tejera *et al.*, 2013). Así, es frecuente que se transfieran dos e incluso tres embriones, con la esperanza de que alguno de ellos implante y de lugar a un recién nacido vivo (Wong, 2010); sin embargo, el aumento del número de embriones transferidos lleva asociado un aumento en las tasas de gestación múltiple, con los correspondientes efectos adversos y costes sanitarios que ello conlleva. Los embarazos múltiples suponen un riesgo para la salud tanto de la madre, como de los fetos, incluyendo parto prematuro, bajo peso del recién nacido, mortalidad perinatal y otras complicaciones obstétricas (Herrero *et al.*, 2009).

La transferencia selectiva de un único embrión, denominado eSET (*elective single embryo transfer*), es el método más eficaz para reducir la incidencia de embarazos múltiples (Paternot *et al.*, 2011), sin embargo, esta práctica podría suponer una disminución de las tasas de gestación, en comparación con la transferencia de dos o incluso tres embriones. La transferencia en el quinto día de desarrollo podría evitar esta disminución de las tasas de gestación asociada a las transferencias únicas. Numerosos estudios han demostrado que la transferencia en blastocisto eleva las tasas de implantación por embrión transferido, en comparación con la transferencia en el tercer día de desarrollo (Elgindy *et al.*, 2011; Rodríguez *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2014), debido probablemente a que la transferencia en día cinco refleja un carácter más fisiológico, al sincronizar el desarrollo embrionario con el recorrido por el tracto reproductor femenino; además, debido a que en el blastocisto ya se ha producido la activación del genoma embrionario, la selección de embriones con mayor probabilidad de implantación podría resultar más sencilla, al actuar como un filtro de “selección natural” en el conjunto de la cohorte embrionaria (Rodríguez *et al.*, 2013).

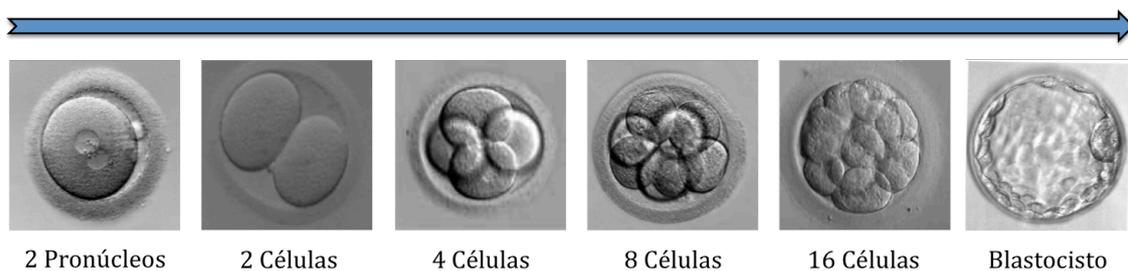


Figura 1. Desarrollo embrionario hasta estadio de blastocisto.

La rutina de los laboratorio de fecundación *in vitro* y el hecho de que, en la mayoría de los casos, el 50% de los embriones de una cohorte no alcancen el estadio de blastocisto (Levens *et al.*, 2008), ha contribuido a que la transferencia en el segundo o tercer día de desarrollo embrionario continúe siendo el procedimiento más habitual. Por ello, y debido a que la transferencia de un embrión único continúa siendo el objetivo de los clínicos, resulta especialmente importante conseguir una buena selección embrionaria, con el fin de identificar aquel embrión(es) con mayor potencial implantatorio para que una disminución en el número de embriones transferidos no implique un descenso en las tasas de embarazo.

## **2.- Selección embrionaria**

La selección embrionaria tiene como objetivo el uso de métodos que pueden dar una idea, directa o indirecta, sobre el potencial de implantación de un embrión dado. Estas metodologías se basan en procedimientos, tanto invasivos como no invasivos, que se aplican en diversas etapas del desarrollo, desde los ovocitos hasta la etapa de blastocisto, pasando por los embriones en estadio de división temprana (Montag *et al.*, 2013). Este procedimiento de selección embrionaria resulta fundamental para el éxito de la fecundación *in vitro* y, por ello, actualmente existen numerosos grupos de investigación que han intensificado sus esfuerzos para mejorar los métodos actuales de selección, con el fin de aumentar, o al menos mantener, las tasas de gestación con transferencias embrionarias electivas y únicas, reduciendo la posibilidad de embarazo múltiple (Tejera *et al.*, 2013).

### **2.1.- Métodos actuales de selección embrionaria**

A pesar de los avances relacionados con las técnicas de fecundación *in vitro*, la evolución de los métodos de observación embrionaria no ha experimentado grandes cambios en las últimas tres décadas (Cruz, 2012). Hasta la fecha, la selección de embriones se ha basado de forma rutinaria en las características morfológicas y cinéticas de los embriones, valoradas en momentos muy concretos (cortos y escasos) del desarrollo, ya que es necesario reducir al máximo el tiempo que los embriones pasan fuera del ambiente controlado del incubador y, además, compatibilizar la evaluación de los mismos con la rutina del laboratorio. Este método se conoce como clasificación convencional.

En esta clasificación convencional el embriólogo se basa en las observaciones realizadas al microscopio óptico durante el cultivo embrionario, para describir las características morfológicas de los embriones como indicadores potenciales de viabilidad, existiendo una amplia variedad de sistemas de clasificación y de puntuación (Cruz, 2011). Los parámetros evaluados mediante esta metodología se analizan en las distintas etapas del desarrollo de los embriones; así, se suele evaluar el número de pronúcleos y la posición relativa de los organizadores prenucleolares en los cigotos y en los embriones en división: el número de células, el grado de fragmentación, el tamaño y la simetría de las blastómeras, entre otros (Machtinger & Racowsky, 2013). De manera adicional, se han estudiado otros marcadores como la morfología ovocitaria o la división temprana (Rienzi *et al.*, 2005). Sin embargo, esta valoración estática de los ovocitos, cigotos y embriones, en la mayoría de los casos, no es un reflejo del desarrollo dinámico de los mismos y por ello, no resulta representativa del desarrollo global del gameto ni del embrión, al suponer una enorme pérdida de información de todo lo que ocurre antes y después del momento analizado. Este hecho podría explicar que las tasas de implantación continúen siendo relativamente bajas en relación con el número de embriones transferidos (Levens *et al.*, 2008).

La evaluación morfológica, como criterio para seleccionar los embriones a transferir, continúa siendo uno de los mecanismos más ampliamente utilizados en los laboratorios de reproducción asistida, al tratarse de un método sencillo, no invasivo y rápido. Sin embargo, presenta el inconveniente de ser poco preciso, altamente subjetivo, tener pocas esperanzas de estandarización y requerir además de formación especializada y cierto grado de experiencia (Cruz, 2012). Además, proporciona un reflejo limitado del estatus euploide de los embriones e incluso la selección del embrión con la “mejor calidad” en el segundo o tercer día del desarrollo, no nos asegura que éste sea cromosómicamente normal (Rodríguez *et al.*, 2013).

Todos estos inconvenientes, junto con el mencionado objetivo de conseguir transferencias embrionarias únicas, ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas herramientas para la selección de embriones de manera más efectiva que la mera clasificación morfológica.

## **2.2.- Nuevos métodos de selección embrionaria**

A pesar de la gran cantidad de estudios publicados todavía no se ha alcanzado ningún consenso sobre cuál es el mejor sistema que describa la calidad embrionaria, lo que supone una dificultad añadida a la hora de decidir qué embrión(es) transferir. Además, tal y como se ha comentado previamente, los sistemas de clasificación convencionales continúan basándose en características morfológicas observadas por el embriólogo y, por tanto, están sujetos a cierto grado de variabilidad interobservador/intraobservador (Tejera *et al.*, 2013).

La solución a las limitaciones de los métodos de selección convencionales hace necesaria la implementación de nuevas técnicas que mejoren la capacidad de diagnóstico del potencial implantatorio de los embriones (Sánchez *et al.*, 2013). Con este objetivo, se están desarrollando prometedoras herramientas y nuevos marcadores de viabilidad embrionaria que aporten objetividad al proceso de selección y, en consecuencia, permitan mejorar los resultados de los tratamientos de reproducción asistida.

### **2.2.1.- Análisis metabólico**

En los últimos años muchas investigaciones se han centrado en desarrollar marcadores metabólicos no invasivos asociados a la capacidad de desarrollo del embrión, analizándose con especial interés el consumo de oxígeno en ovocitos y embriones, pues ha sido considerado como el mejor indicador de la actividad metabólica de los mismos, debido a su relación directa con la capacidad del embrión para producir ATP (Tejera *et al.*, 2011). La evaluación de dicho consumo se realiza mediante microsensors de oxígeno que evalúan el gradiente lineal generado a medida que el embrión consume el oxígeno del medio, el cual llega por difusión procedente de las capas superiores en contacto con el aceite mineral que los recubre (Herrero *et al.*, 2009).

Los estudios realizados a través de este mecanismo han permitido determinar la relación directa existente entre el consumo de oxígeno y la calidad embrionaria (Tejera *et al.*, 2011), sugiriendo que las mediciones de la actividad metabólica de ovocitos y embriones pueden ser unos buenos indicadores de la calidad y desarrollo embrionario. Esta mencionada correlación entre el consumo de oxígeno y la calidad embrionaria hace que el uso de marcadores del metabolismo ovocitario/embrionario, en combinación con los mecanismos convencionales de clasificación morfológica, suponga una prometedora herramienta en la selección embrionaria, al poder ofrecer información precisa y objetiva a la hora de elegir el embrión óptimo para la transferencia (Herrero *et al.*, 2009). Por este motivo se están introduciendo nuevas tecnologías no invasivas y altamente sensibles, capaces de realizar mediciones individuales tanto de manera continua como en etapas

concretas del desarrollo embrionario, sin influir negativamente en la viabilidad del embrión (Lopes *et al.*, 2007).

### 2.2.2.- Sistemas *time-lapse*

Debido a la rapidez con la que se producen los cambios en la morfología celular durante el desarrollo, la evaluación puntual de los embriones podría suponer la pérdida completa de algunos procesos efímeros que se harían evidentes si se visualizase el desarrollo de los mismos de manera continuada. La capacidad de registrar todo el desarrollo embrionario como un proceso dinámico, evitando así la pérdida de información asociada a la evaluación puntual, viene de la mano de los sistemas *time-lapse*, los cuales permiten predecir el potencial de desarrollo de un embrión en estadio de división a través de su monitorización continua (Conaghan *et al.*, 2013).

En estos sistemas, las muestras biológicas se cultivan directamente en un dispositivo que captura imágenes a intervalos de tiempo preprogramados, las cuales serán posteriormente procesadas y transformadas en una secuencia de vídeo, a partir de la cual se podrán extraer datos morfológicos, dinámicos y cuantitativos (Wong *et al.*, 2013). De este modo, se ven incrementados de manera considerable los datos y las observaciones morfológicas disponibles para que los embriólogos determinen la calidad de los embriones y seleccionen aquellos con mayor potencial implantatorio.

Además de proporcionar información objetiva y precisa (tanto cualitativa como cuantitativa), la nueva generación de sistemas que combinan incubador y microscopio ofrecen la oportunidad de cultivar los embriones de manera ininterrumpida bajo las condiciones estables del incubador, al poder ser evaluados sin sacarse del mismo. Dado que las variaciones en la temperatura y en el pH pueden tener efectos negativos en el desarrollo embrionario (Mesenguer *et al.*, 2012), los sistemas *time-lapse* suponen una gran mejora en este aspecto al no ser necesario sacar los embriones del incubador para su evaluación, mientras que, las variaciones a las que éstos son sometidos cuando se sacan del incubador para ser evaluados convencionalmente, tardan cierto tiempo en revertirse, lo que puede afectar a la calidad embrionaria. Como ventajas secundarias cabe destacar el ahorro de una gran cantidad de tiempo y la reducción de los costes al mejorar la eficacia de los ciclos de fecundación *in vitro*, además de la mencionada introducción de nuevos parámetros, no solo morfológicos sino también dinámicos, para la evaluación embrionaria (división temprana, reabsorción de fragmentos, etc.) (Tejera *et al.*, 2013; Basile *et al.*, 2014).



Figura 2. El sistema de análisis de imagen Primo Vision. Tomado y modificado de <http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/>

A pesar de sus múltiples ventajas, el uso de los sistemas *time-lapse* todavía plantea una serie de retos que deben ser superados con la mejora de los instrumentos actualmente disponibles. Por ejemplo, el mantenimiento de las muestras en la placa de cultivo y dentro del campo de visión del microscopio a lo largo de la toma de imágenes puede ser especialmente complicado, sobre todo durante la manipulación y el cambio de medio de las placas (Wong *et al.*, 2013); por otro lado, la aparición de burbujas puede dificultar también la toma de imágenes y poner en peligro el seguimiento del desarrollo embrionario. Se debe tener en cuenta también que, contar el número de células de los embriones en estadios avanzados o en aquellos que poseen cierto grado de fragmentación, puede resultar complicado en este tipo de sistemas (Tejera *et al.*, 2013), lo que implica el continuo desarrollo de la tecnología *time-lapse*.

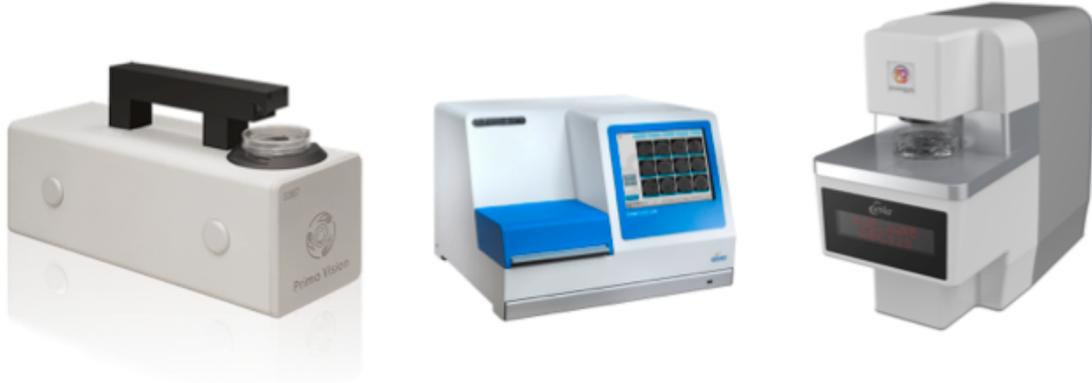
Otra de las limitaciones atribuibles a los sistemas *time-lapse* es la exposición de los embriones a la luz de manera periódica, cada vez que se adquieren las imágenes que darán lugar al vídeo analizado por los embriólogos. Conscientes de que la luz puede tener efectos negativos sobre los embriones (daños en el ADN, calentamiento localizado y generación de especies de radicales libres dentro de las células) (Wong *et al.*, 2013), se han realizado multitud de investigaciones, tanto en humanos como en otros mamíferos, para comprobar si dicha exposición periódica a la luz perjudicaba la calidad embrionaria. Estos estudios mostraron que los sistemas *time-lapse* no generan diferencias significativas en las tasas de embarazo (Mio & Maeda, 2008), tasas de fecundación (Nakahara *et al.*, 2010) ni en las tasas de llegada a blastocisto, porcentaje de embriones vitrificados, transferidos y no viables (Cruz *et al.*, 2011), en comparación con los sistemas convencionales. Por este motivo, se concluyó que los sistemas *time-lapse* no poseen un efecto perjudicial en el desarrollo embrionario, confirmando así su utilidad como herramienta de trabajo segura en los laboratorios de fecundación *in vitro* (Nakahara *et al.*, 2010).

### 3.- Tipos de sistemas *time-lapse*

En la actualidad existen varios dispositivos *time-lapse* disponibles en el mercado (Figura 3), los cuales difieren en la su estrategia de diseño, ya sea la construcción de una incubadora en torno a un microscopio convencional (Mio & Maeda, 2008), la inserción de un microscopio dentro de una incubadora convencional (Wong *et al.*, 2010), o aquellos que tienen todos los elementos integrados en una sola pieza de equipo (Mesenguer *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2013):

- **Primo Vision®** (Vitrolife): se trata de un microscopio invertido digital que ha de ser colocado dentro de un incubador y conectado a una unidad de control externa para la monitorización continua de embriones. A pesar de ser un instrumento menos flexible que otros sistemas, proporciona unas condiciones de cultivo óptimas y estables.
- **Embryoscope™** (Unisense Fertilitech): forma parte de los instrumentos diseñados para uso clínico que integran incubador y microscopio. Además de proporcionar condiciones de cultivo estables, cuenta con una gran capacidad, pudiendo adquirir automáticamente imágenes de hasta 72 embriones cultivados de manera individual.
- **Test EEVA o Embryo early viability assessment** (Auxogin): se trata, igual que en el caso anterior, de un microscopio diseñado para insertarse dentro de la mayoría de los incubadores convencionales, proporcionando una captura de imágenes con campo oscuro con el fin analizar información cuantitativa del desarrollo embrionario.

En el presente trabajo se ha utilizado el sistema *time-lapse* Primo Vision, cedido temporalmente por la empresa de material biomédico EMB, con el fin de realizar una valoración del sistema como herramienta en la rutina del laboratorio de reproducción asistida.



**Figura 3.** De izquierda a derecha se muestran tres de los sistemas *time-lapse* disponibles en el mercado: Primo Vision, Embryoscope y EEVA (Basile *et al.*, 2014).

## **OBJETIVO**

La microscopía *time-lapse* se ha convertido en una herramienta emergente para el estudio dinámico de los procesos biológicos acontecidos durante el desarrollo embrionario temprano. La capacidad de seguir el desarrollo de manera continuada aporta una mayor cantidad de información relevante que podría mejorar los procedimientos de selección embrionaria. Ante estas consideraciones el objetivo del presente trabajo ha sido valorar un sistema de análisis de imagen (Primo Vision) como herramienta en los tratamientos de reproducción asistida, para la observación del desarrollo embrionario *in vitro*, mediante el análisis comparativo de resultados clínicos obtenidos en el Primo Vision (sistema *time-lapse*) y un incubador convencional.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Para la realización del presente trabajo han sido analizados un total de 468 ovocitos procedentes de 72 ciclos aplicados a 38 pacientes sometidas a tratamientos de FIV, ICSI o FIV/ICSI en el Hospital Materno Infantil Teresa Herrera de A Coruña, durante los meses de Marzo, Abril y Mayo del año 2014.

Las 38 pacientes estudiadas, cuyas edades estaban comprendidas entre los 33 y 42 años. fueron divididas en dos grupos en función de si sus ovocitos habían sido evaluados mediante métodos convencionales o mediante el sistema de análisis de imagen Primo Vision. De este modo, el estudio fue realizado sobre dos grupos de pacientes: un grupo denominado "control" y un grupo denominado "time-lapse", cada uno de los cuales estaba constituido por 19 mujeres con sus respectivos ciclos.

### **1.- Estimulación ovárica de las pacientes y recuperación de ovocitos**

Las pacientes sometidas a tratamiento fueron estimuladas mediante la hormona FSH (Gonal-F®), cuya dosis varió en función de la edad de las mismas, su índice de masa corporal y la respuesta obtenida en ciclos previos. Una vez que se obtuvo una respuesta folicular adecuada y ecográficamente se detectaron 3 o más folículos de 18mm de diámetro, se desencadenó la ovulación con hCG (Ovitrelle®).

La recuperación de los ovocitos se realizó mediante punción folicular transvaginal bajo condiciones de asepsia, entre 35 y 36 horas después de haberse inducido la ovulación. Tras la sedación de la paciente y el lavado vaginal con suero fisiológico (Irrigation solution NaCl 0,9% B. Braun 500 ml), se puncionaron los folículos uno a uno mediante una aguja de punción ovárica (Ovarian Biopsy, Labotect) guiada ecográficamente, aspirando su contenido en tubos específicos para la recogida del líquido folicular (Falcon 2001).

A continuación, los tubos con el líquido folicular fueron trasladados al laboratorio de fecundación *in vitro* anexo al quirófano para proceder a la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito. Estos complejos fueron depositados en medio de lavado (Flusing medium, Origio) y transferidos individualmente a gotas de 40 µl en ISM1 Culture Medium (Origio), donde se dejaron estabilizar bajo las condiciones controladas de CO<sub>2</sub> y temperatura del incubador (Binder). En el caso de los ovocitos a los que se les iba a aplicar una ICSI, tras 2-3 horas de incubación, se procedió a su decumulación (eliminación de las células de la corona y el cúmulo) en una solución de hialuronidasa (HYASE-10X, Vitrolife) en proporción 1:10 con el medio de cultivo.

### **2.- Capacitación espermática**

Las muestras de semen previas a cualquiera de las técnicas de reproducción asistida deben ser procesada mediante la capacitación espermática, técnica que consiste en la selección de aquellos espermatozoides con mejor movilidad mediante la eliminación del plasma seminal (que contiene prostaglandinas e inhibidores de la movilidad) y de los espermatozoides inmóviles, además de las células inmaduras y los detritos (Sellés *et al.*, 2006). Mediante este procedimiento se consigue modificar la movilidad flagelar y de la cabeza del espermatozoide, lo que favorece la penetración en el óvulo, motivo por el cual, el lavado y posterior recuperación de los espermatozoides móviles, se relaciona con la adquisición de esta capacidad de fecundar (Mortimer *et al.*, 1998).

En este trabajo, todas las muestras de semen empleadas se capacitaron mediante la técnica de gradientes de densidad, basada en la selección de aquellos espermatozoides que pueden vencer la dificultad que presentan los gradientes de densidad de 90 y 45% (Puresperm Nidacom®) y llegar hasta el fondo del tubo, además de actuar como filtro

para el plasma seminal, células redondas, detritos y aquellos espermatozoides con movilidad no progresiva (Mortimer *et al.*, 1998).

### **3.- Técnicas de fecundación *in vitro***

#### **3.1.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)**

Tras haber decumulado los ovocitos sumergiéndolos durante 20-30 segundos en una solución 1:10 con hialuronidasa y aspirándolos repetidamente a través de una pipeta (Flexipet Denuding Pipette COOK Medical de 170 y 140  $\mu\text{m}$  de diámetro), se procedió a la preparación de las placas de ICSI (Falcon 1006). Cada placa de microinyección contenía: microgotas individuales de 10  $\mu\text{l}$  de medio Flusing (Origio) para cada uno de los ovocitos a microinyectar, varias gotas de una suspensión de PVP (polivinil pirrolidona) y, por último, 1  $\mu\text{l}$  de capacitado espermático, todo ello cubierto con aceite mineral atemperado. El PVP facilita la manipulación y captura de los espermatozoides al disminuir su movilidad, ayudando además al control del fluido en la aguja de inyección y evitando que los espermatozoides se queden pegados a la pipeta.

Una vez preparadas las placas de ICSI, se colocaron las micropipetas Holding y de ICSI (Origio) en un microscopio invertido Olympus con pletina móvil termostatzada de vidrio térmico. Una vez hecho esto, se colocaron los ovocitos en la placa de microinyección y se procedió inmediatamente a realizar la ICSI. Con la micropipeta Holding o de sujeción se mantuvo fijo al ovocito, mientras que con la pipeta de microinyección se inmovilizó y aspiró al espermatozoide. Para ello, se aspiró en primer lugar PVP (asegurando que el sistema respondía suavemente a la presión ejercida por el microinyector) y se seleccionó uno de los espermatozoide de la gota de PVP que tenía buena movilidad y morfología; a continuación, con un movimiento en sentido perpendicular al eje del espermatozoide, se dobló su flagelo hasta que éste quedó angulado para inmovilizarlo y se procedió a la aspiración del mismo a través de su cola. A continuación, con la pipeta de microinyección, se traspasó la zona pelúcida y la membrana del ovocito, aspirándose el citoplasma del mismo para cerciorarnos de que la membrana estaba rota y ponerlo en contacto con el espermatozoide. Mediante esta aspiración del ooplasma se consigue activar mecánicamente los gametos, lo cual resulta imprescindible para completar el proceso de microinyección y obtener unas tasas de fecundación idóneas. Los espermatozoides se fueron inyectando en los ovocitos siguiendo este procedimiento, teniendo en cuenta la posición del corpúsculo polar con el fin de evitar dañar el huso meiótico (Zulategui *et al.*, 2005).

#### **3.2.- Fecundación *in vitro* convencional (FIV convencional)**

Para la realización de la FIV convencional los ovocitos se incubaron en placas de cultivo de cuatro pocillos (Nunclon) con 0,5 mL de IVF Culture Medium (Origio) y se co-cultivaron con una dilución de espermatozoides capacitados ajustada a una concentración de 100000-150000 espermatozoides/ovocito.

### **4.- Valoración de la fecundación**

Entre 18 y 20 horas después de la inseminación de los ovocitos mediante cualquiera de los dos técnicas descritas en el apartado anterior, se procedió a evaluar si éstos habían sido correctamente fecundados con el fin de asegurar, en la medida de lo posible, su dotación diploide.

En el caso de la evaluación de la fecundación en los ovocitos sometidos a FIV convencional, fue necesaria la liberación de los mismos de las células del cúmulo; para ello se empleó una pipeta Stripper (Origio) con las que se aspiraron y soltaron los ovocitos repetidas veces, ejerciendo así una acción mecánica que permitió eliminar las células de la

granulosa. A continuación, los ovocitos se pasaron a una placa de crecimiento preparada del día anterior. Por otro lado, debido a que los ovocitos microinyectados ya habían sido despojados de las células del cúmulo antes de realizarse la ICSI, se pudo proceder a la valoración de la fecundación directamente.

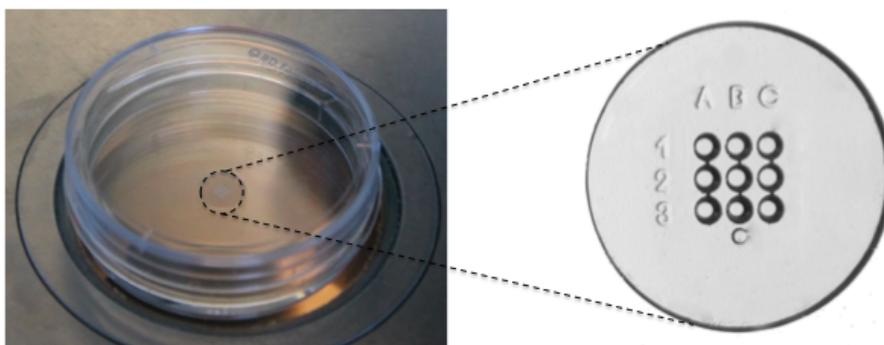
Para realizar la valoración de la fecundación se procedió a visualizar los dos pronúcleos (PN) y los dos corpúsculos polares (CP) en cada uno de los ovocitos, ya que se considera que un ovocito está fecundado normalmente cuando, transcurridas entre 17 y 20 horas después de la inseminación, es posible observar la presencia de los mismos (Gámiz *et al.*, 2005). Para ello se empleó un microscopio invertido Olympus con objetivo *plan fluor semi-apocromatic relief contrast (20X)*. Una vez valorada la fecundación, tanto en el caso de FIV convencional como en el de ICSI, los cigotos se dejaron en las placas de cultivo, para así proceder a su incubación y seguimiento del desarrollo embrionario, bien mediante el sistema convencional o bien mediante el sistema de análisis de imagen Primo Vision.

## 5.- Incubación de los embriones

Tanto los embriones analizados con sistema convencional como los analizados con el sistema *time-lapse*, fueron incubados a una temperatura de 37 °C, una concentración de CO<sub>2</sub> del 6% y un 95% de humedad; sin embargo, las placas de incubación fueron diferentes en función del tipo de sistema de seguimiento empleado ya que, el Primo Vision, precisa de unas placas especiales denominadas *Primo Vision Embryo culture dish*, cuyo diseño incluye 9 micropocillos individualizados donde se alojan los embriones y que coinciden con la posición de la cámara del *time-lapse* (Figura 4). Al igual que en el caso de los incubadores convencionales, las placas del Primo Vision se prepararon con un día de antelación para gasear y equilibrar correctamente los medios. Se aplicó el siguiente protocolo:

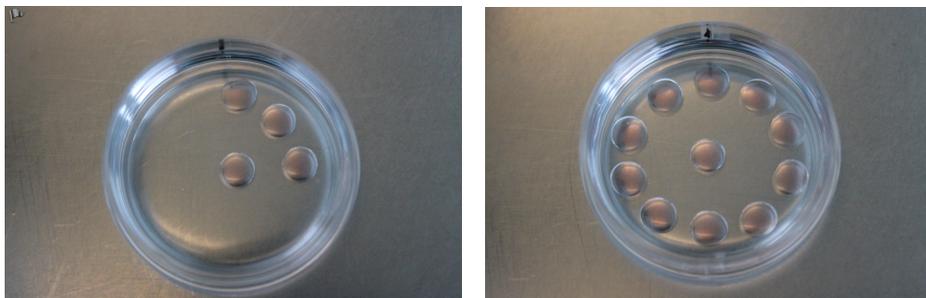
1. Lavado de la placa con 1,4 ml del mismo medio de cultivo que empleamos posteriormente para el cultivo embrionario. Es fundamental la eliminación de las burbujas que puedan formarse ya que, no solo impiden que el embrión se aloje correctamente en el micropocillo central, sino que también dificulta la toma de imágenes.
2. Eliminación del medio de la placa excepto la cantidad residual que queda en el micropocillo; posteriormente se colocó una gota de 50 µl que cubría la totalidad de los micropocillos, cohesionándolos y permitiendo el cultivo en grupo.
3. Adición de 1,2 ml de aceite mineral para minimizar problemas de evaporación.

El medio de cultivo se cambió periódicamente en día 1 y día 3.



**Figura 4. Placas especiales del sistema de análisis de imagen, *Primo Vision Embryo culture dish*.**

Por otro lado, la incubación de embriones mediante el sistema convencional se realizó en placas Petri estándar (Falcon 1008) preparadas con un día de antelación, las cuales contenían entre una y diez gotas (dependiendo del número de ovocitos obtenidos en la captación) de 40  $\mu$ l de medio de cultivo cubiertas de aceite mineral, con el fin evitar la evaporación y amortiguar los cambios en las condiciones de cultivo durante la manipulación fuera del incubador (Figura 5). El medio de cultivo empleado se cambió de forma secuencial en los diferentes días del desarrollo.



**Figura 5. Placas Petri estándar (Falcon 1008) de tres (izquierda) y diez (derecha) gotas para el cultivo de embriones mediante el sistema convencional.**

## **6.- Clasificación y selección embrionaria**

### **6.1.- Sistema convencional**

La evaluación morfológica de los embriones que iban a ser clasificados y seleccionados mediante el sistema convencional se realizó a las 48 (D+2) y 72 (D+3) horas después de la inseminación. Para ello, las placas de crecimiento fueron extraídas del incubador y colocadas en la pletina móvil termostatzada de vidrio térmico de un microscopio invertido Olympus con objetivo *plan fluor semi-apocromatic relief contrast (20X)*, mediante el cual se observaron y fotografiaron los embriones.

A partir de las fotografías tomadas de cada uno de los embriones, se procedió a su clasificación según los “Criterios ASEBIR de valoración morfológica de ovocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos”, la cual establece cuatro categorías diferentes en función el potencial implantatorio esperado:

- **Categoría A:** preembrión óptimo con máxima capacidad de implantación.
- **Categoría B:** preembrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- **Categoría C:** preembrión regular con una probabilidad de implantación media.
- **Categoría D:** preembrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja.

Para asignar los embriones evaluados a una de estas cuatro categorías se tuvieron en cuenta los siguientes parámetros:

- **Número celular y ritmo de división:** la clasificación se realizó según el número de células para el D+2 y el ritmo de división de D+2 a D+3. Así, el número de células que se consideró óptimo en los embriones de D+2 fue cuatro y, en D+3, siete u ocho.
- **Porcentaje y tipo de fragmentación celular:** el tratamiento de este parámetro fue aplicable tanto a D+2 como a D+3 y se diferenciaron cuatro grupos de calidad embrionaria según el porcentaje de fragmentación, 10%, 11-25%, 26-35% y >35%.

- **Simetría de las blastómeras:** se consideró como división simétrica aquella en la que la diferencia del diámetro de la blastómera mayor y la blastómera menor era inferior al 20%. Por otro lado, la división asimétrica fue considerada como indicadora de buena calidad embrionaria en caso de visualizarse dos células pequeñas y una grande (preembrión de tres células), dos células pequeñas y tres grandes (preembrión de cinco células), cuatro células pequeñas y dos grandes (preembrión de seis células) o seis células pequeñas y una grande (preembrión de siete células).
- **Vacuolización:** la presencia de vacuolas fue asociada a una disminución del potencial de desarrollo (degeneración y lisis del embrión), sin embargo, se consideró que las vacuolas menores de 5 µm de diámetro no comprometían al desarrollo del mismo.
- **Multinucleación:** la presencia de blastómeras multinucleadas (2 o más núcleos en una célula) en D+2 y D+3 se asoció con una menor tasa de implantación.

En función de los resultados obtenidos tras la evaluación de los parámetros citados, los embriones fueron clasificados en una de las cuatro categorías (A, B, C o D) del siguiente modo, pudiendo manifestar uno o varios de los parámetros analizados:

- **Embriones categoría A**
  - Embrión que en D+2 presentaba cuatro células y en D+3 siete u ocho.
  - Células iguales o semejantes.
  - Menos de un 10% de fragmentación.
  - Ausencia de vacuolas.
  - Ausencia de multinucleación.
- **Embriones categoría B**
  - Cualquier otra combinación de células, siempre que suponga un incremento de tres/cuatro células de D+2 a D+3.
  - Células iguales o semejantes.
  - Hasta un 25% de fragmentación.
  - Ausencia de vacuolas.
  - Ausencia de multinucleación.
- **Embriones categoría C**
  - Cualquier otra combinación de células, siempre que suponga un incremento de una, dos o tres células de D+2 a D+3.
  - Células desiguales.
  - Hasta un 35% de fragmentación.
  - Ausencia de (o pocas) vacuolas.
  - Ausencia de multinucleación.
- **Embriones categoría D**
  - Incremento de una única célula.
  - Células desiguales.
  - Más de un 35% de fragmentación.
  - Abundantes vacuolas
  - Presencia de multinucleación.

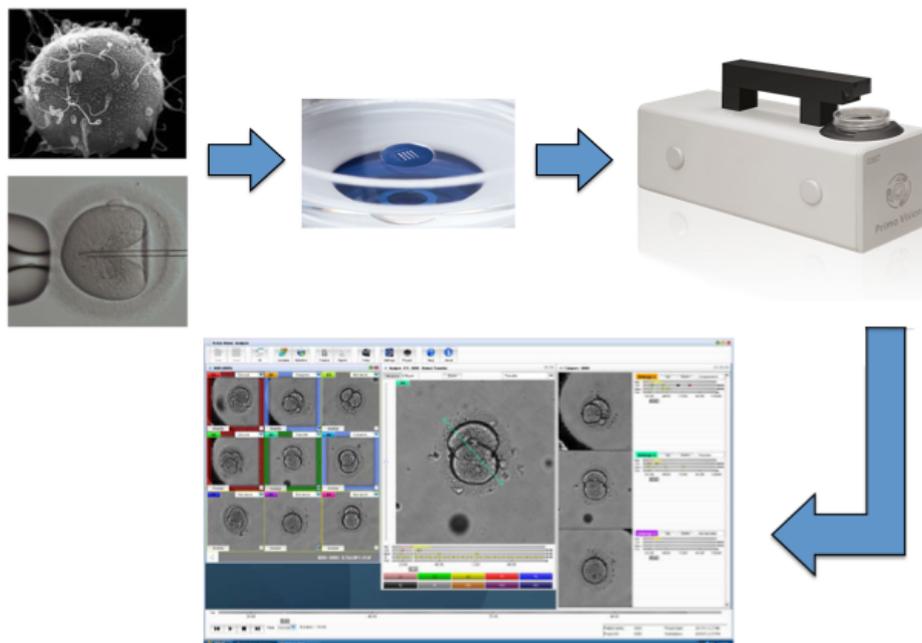
Cualquier otra combinación o en caso de que no hubiese incremento alguno en el número de células de D+2 a D+3 se consideró como embrión no viable.

## 6.2.- Sistema de análisis de imagen: el Primo Vision

Para realizar la evaluación del desarrollo embrionario de las pacientes pertenecientes al grupo “*time-lapse*” se empleó el sistema de análisis de imagen Primo Vision® (Vitrolife). Se trata de un dispositivo que incluye una cámara CCD 5 Megapíxeles monocroma con resolución de 0,8 micras/píxel e iluminación de tipo LED verde de 550nm con intensidad ajustable.

Tal y como se mencionó anteriormente, la principal ventaja de este sistema de análisis de imagen es la combinación de las condiciones de cultivo controladas y seguras del incubador, con la monitorización continua del desarrollo embrionario. Con el Primo Vision es posible tomar imágenes de alta calidad a intervalos de tiempo prefijados en un plano focal y permite la incubación simultánea de hasta 9 embriones cultivados en grupo. El cultivo de embriones en grupo posibilita un mejor desarrollo que en el caso de embriones cultivados individualmente (Tao *et al.*, 2013) debido, probablemente a las modificaciones que tienen lugar en el microambiente de cultivo en el que se encuentran los embriones, fruto de la secreción y/o agotamiento de diversos factores en el medio (Reed *et al.*, 2011). Así, el sistema de análisis de imagen Primo Vision, además de posibilitar el cultivo en grupo de los embriones, permite registrar un conjunto de parámetros fundamentales del desarrollo embrionario sin necesidad de manipular a los embriones ni alterar sus condiciones de cultivo.

En este caso, la evaluación del desarrollo se basó en la monitorización continua de los embriones bajo las condiciones de cultivo controladas y seguras del incubador, en el cual se mantuvieron hasta el día de la transferencia embrionaria (D+2 o D+3); para ello, el sistema captó imágenes de alta calidad a intervalos de tiempo predeterminados de 10 minutos y éstas fueron analizadas con la ayuda del software adjunto al sistema *time-lapse*.

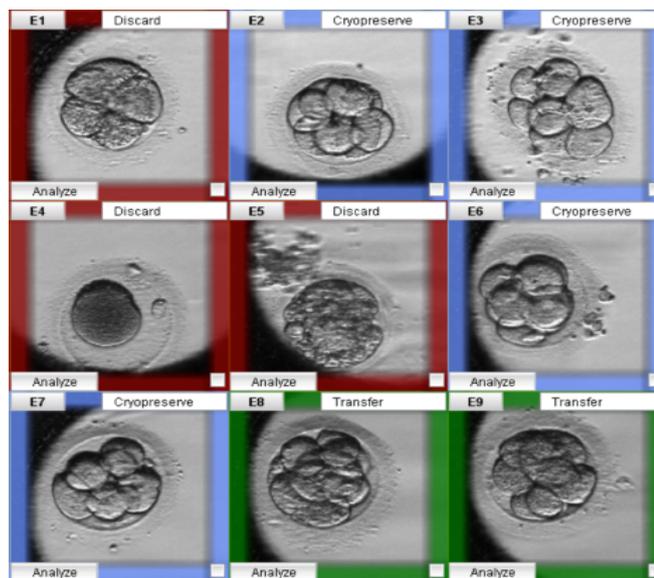


**Figura 6. El Primo Vision en el laboratorio de fecundación *in vitro*. Tomado y modificado de <http://www.vitrolife.com/en/Fertility/Products/Primo-Vision-Time-Lapse-System/>**

### 6.2.1.- Software Primo Vision v. 4.2

El soporte informático adjunto al Primo Vision, el software Primo Vision v. 4.2, consta de dos programas: el sistema de captura Primo Vision v. 4.2 y el sistema de análisis de embriones Primo Vision v. 4.2. La utilización de este software ayudó a la selección de los embriones de “mejor calidad”, al permitir comparar y analizar las imágenes obtenidas gracias a los microscopios del interior del incubador. En este punto, es importante tener en cuenta que este programa informático no realiza diagnósticos, sino que ofrece un registro de los datos y variables derivados del Primo Vision.

Dicho software fue programado previamente por los embriólogos para que clasificara los embriones analizados en varias categorías en función de una serie de parámetros que se deseaban medir (división temprana, tiempo en completar la segunda división...). Esta clasificación se realizó mediante un código de colores en el que cada uno de los embriones era resaltado en un color determinado en función de la categoría a la que perteneciese (Figura 7). Así, los embriones resaltados en verde fueron aquellos considerados como aptos para la transferencia y los embriones resaltados en rojo fueron los embriones que se consideraron como excluidos. Aquellos embriones que no podían ser clasificados dentro de ninguna de las dos categorías anteriores fueron resaltados en naranja, quedando en manos del embriólogo establecer, en base a la información de la que dispone, la calidad del embrión. En caso de que los embriones vayan a ser vitrificados, éstos aparecerán resaltados en azul.



**Figura 7. Clasificación de los embriones mediante código de colores.**

Para que este soporte informático clasificase a los embriones en una de estas dos categorías, las series de imágenes tomadas por el Primo Vision tuvieron que ser analizadas una vez registradas, es decir, el embriólogo marcaba aquellos momentos del vídeo en los que tenían lugar los eventos de interés y, si éstos se encontraban dentro del rango que se había programado previamente, el software resaltaba los embriones en verde; es caso contrario, los embriones eran resaltados en rojo.

Cabe destacar además que, el software Primo Vision v. 4.2, cuenta con una serie de aplicaciones que permiten comparar los tiempos de división de diferentes embriones, además de proporcionar cuadros y gráficos con los datos que pueden ser exportados para su posterior análisis.

### **6.2.2.- Variables de estudio en el sistema de análisis de imagen**

Las variables que fueron estudiadas mediante el sistema de análisis de imagen para la posterior selección embrionaria fueron:

- Tiempo de aparición de la segunda blastómera (división temprana).
- Tiempo en completar la segunda división.
- Tiempo de la división hacia un embrión de cinco células (en el caso de embriones incubados hasta D+3).

Los rangos de tiempo, fijados previamente, que se consideraron óptimos fueron definidos de la siguiente manera: tiempo de aparición de la segunda blastómera: 24-25 horas; tiempo en completar la segunda división: <12 horas; tiempo de la división hacia un embrión de cinco células: 48-56 horas (Meseguer *et al.*, 2012).

Se consideró que los embriones cuyos tiempos de división se encontraron dentro de estos intervalos, tenían más probabilidades de implantación que aquellos embriones cuya cinética de desarrollo estaba fuera de dichos rangos. Así, el software resaltó en verde aquellos embriones que cumplían con dichos intervalos de tiempo, siendo éstos considerados como embriones aptos para la transferencia.

### **6.2.3.- Clasificación embrionaria**

La clasificación realizada tras el registro de las variables anteriormente citadas comenzó con un examen morfológico de todos los embriones, con el fin de descartar aquellos que claramente no eran viables. En el siguiente paso, se excluyeron los embriones que no cumplían con los criterios cinéticos mencionados en el apartado anterior y que, por tanto, estaban resaltados en rojo. Finalmente, sobre los embriones considerados aptos para la transferencia (embriones resaltados en verde o naranja), se aplicó un criterio de clasificación en el que se tuvo en cuenta el número de células, el porcentaje de fragmentación, la simetría de las blastómeras, la vacuolización y la multinucleación, clasificándolos en las categorías A, B, C o D establecidas en sistema de clasificación convencional.

## **7.- Transferencia embrionaria**

Este último paso del ciclo de reproducción asistida se llevó a cabo en condiciones de asepsia en el quirófano anexo al laboratorio, con el fin de garantizar unas óptimas condiciones.

Todas las transferencias fueron realizadas en D+2 o D+3, tanto en el caso de las pacientes "control" como en el caso de las pacientes "time-lapse". La selección de los embriones a transferir se realizó en base a los criterios convencionales (morfológicos y cinéticos) ya comentados, aunque la información adicional procedente del sistema de monitorización *time-lapse* pudo ser empleada de manera complementaria a la hora de realizar la selección. Teniendo esto en cuenta, siempre que fue posible se transfirieron los embriones pertenecientes a las categorías A o B, por ser considerados como aquellos de óptima y mejor calidad, respectivamente, además de presentar, teóricamente, un potencial implantatorio mayor respecto a los embriones pertenecientes a las categorías C o D.

Una vez consensuado el número de embriones a transferir (ginecólogo y pacientes), éstos fueron depositados a través de la vagina de las pacientes, canalizando el cérvix con ayuda de un catéter (Embryo Transfer Catheter, Labotec) hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial, donde se descargaron. Por último, se comprobó en el laboratorio mediante un microscopio estereoscópico Olympus con rango de aumentos 8X-56X encastrado en la cabina de flujo laminar termostaticada, que los embriones no habían quedado retenidos en la cánula.

## **8.- Análisis de los datos**

Los distintos parámetros de desarrollo embrionario analizados en este trabajo se compararon empleando el *software* libre R, versión 3.0.2 (*The R Foundation for Statistical Computing Platform*), junto con el paquete estadístico R-Commander, versión 2.0. Mediante este paquete estadístico se realizó un test Chi-cuadrado para comparar la calidad de los embriones en día 2 de desarrollo y el día en el que se realizó la transferencia en cada uno de los dos sistemas estudiados. Por otro lado, se realizó una comparación de proporciones para dos muestras que permitió testar la existencia o no existencia de diferencias significativas entre ambos sistemas en la proporción de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, la proporción de embriones transferidos, la proporción de embriones no viables y la proporción de embriones vitrificados. Se consideró presencia de significación estadística cuando el p-valor obtenido fue inferior a 0,05.

## RESULTADOS

### 1.- Análisis descriptivo

Se analizaron 468 ovocitos procedentes de 38 pacientes sometidas a tratamientos de FIV, ICSI o FIV/ICSI, en los cuales se estudió la calidad de los mismos en día 2 de desarrollo (clasificándolos en las cuatro categorías mencionadas con anterioridad, A, B, C y D), la tasa de blastocisto alcanzada, la proporción de embriones no viables, vitrificados y transferidos y, por último, el día de la transferencia embrionaria (día 2 o día 3 de desarrollo). Los resultados obtenidos para cada uno de los sistemas empleados se resumen en las tablas 1, 2 y 3, en las cuales se indican los valores medios obtenidos de cada una de las variables analizadas por ciclo.

Tabla 1. Número medio de embriones de calidad A, B, C y D en día 2 de desarrollo obtenidos en el grupo de pacientes control y en el grupo de pacientes *time-lapse*.

	A	B	C	D
Control	0,43	1,14	1,71	0,46
<i>Time-lapse</i>	2,10	2,00	1,36	0,63

Tabla 2. Número medio de embriones que alcanzaron el estadio de blastocisto, embriones no viables, vitrificados y transferidos en el grupo de pacientes control y en grupo de pacientes *time-lapse*.

	Blastocisto	No viables	Vitrificados	Transferidos
Control	0,00	3,25	0,20	2,51
<i>Time-lapse</i>	0,42	5,63	0,84	2,57

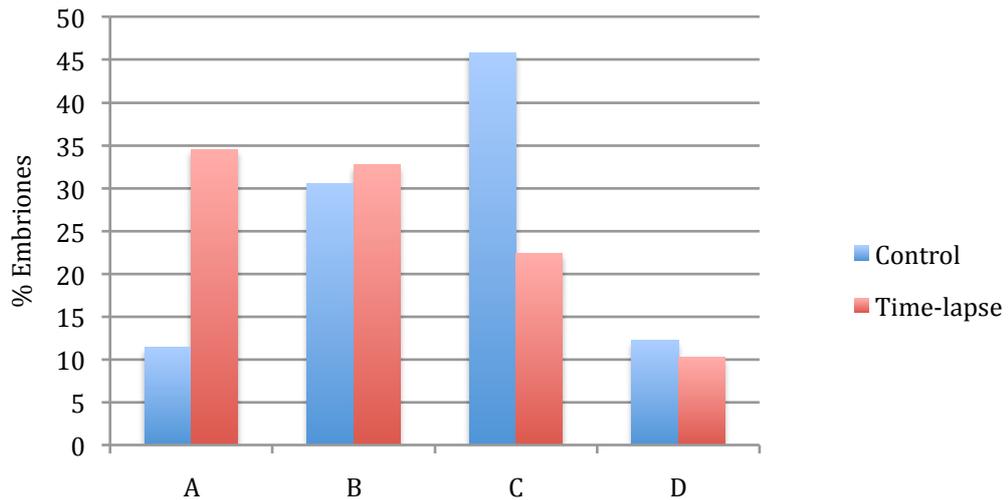
Tabla 3. Número medio de embriones transferidos en día 2 y día 3 de desarrollo en el grupo de pacientes control y en el grupo de pacientes *time-lapse*.

	Transferencia en D+2	Transferencia en D+3
Control	1,31	1,20
<i>Time-lapse</i>	1,10	1,47

### 2.- Análisis comparativo

#### 2.1.- Calidad embrionaria en día 2 de desarrollo

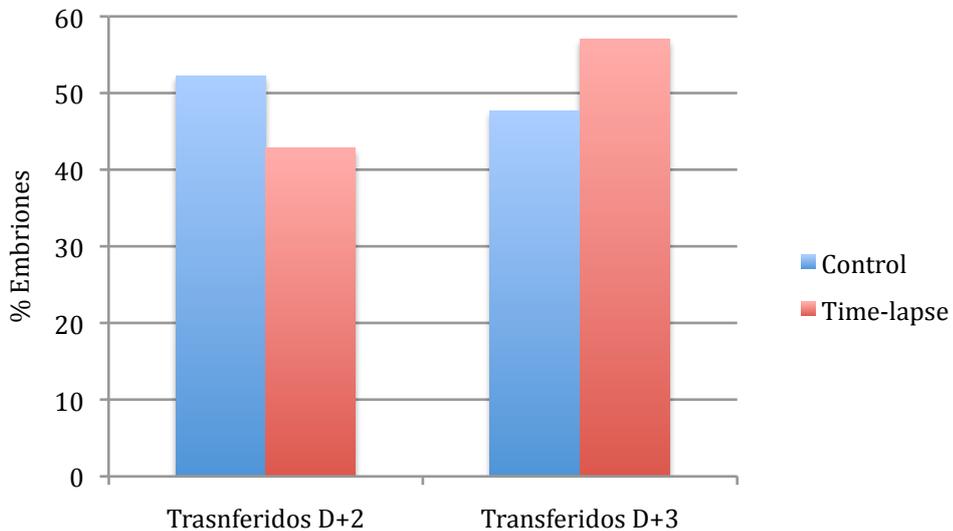
El análisis comparativo de la calidad embrionaria en día 2 de desarrollo entre ambos grupos de estudio, control y *time-lapse*, mostró resultados diferentes entre el Primo Vision y el sistema convencional ( $p$ -valor= 1,865e-05). Estas diferencias residen en el porcentaje de embriones de tipo A y de tipo C obtenidos en cada sistema (Figura 8).



**Figura 8. Calidad embrionaria en día 2**

### 2.2- Transferencia embrionaria en día 2 y en día 3:

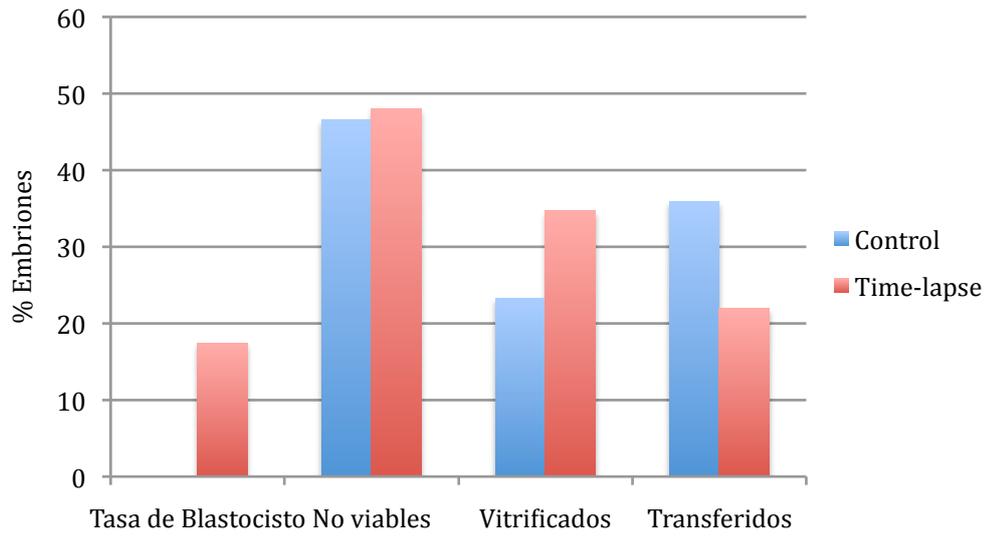
Al comparar el porcentaje de embriones transferidos en día 2 (D+2) y en día 3 (D+3) de desarrollo para cada uno de los sistemas a estudiar, no se obtuvieron diferencias significativas (p-valor= 0,2906) (Figura 9).



**Figura 9. Porcentaje de transferencia embrionaria día 2 vs. día 3 de desarrollo.**

### 2.3- Tasa de blastocisto alcanzada, proporción de embriones no viables, vitrificados y transferidos:

La tasa de desarrollo a blastocisto así como el porcentaje de embriones transferidos varió significativamente entre los dos sistemas (p-valor= 0,01574 y p-valor= 0,001884, respectivamente). Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la proporción de embriones no viables (p-valor= 0,681) ni en la proporción de embriones vitrificados (p-valor= 0,2882) entre el sistema convencional y el sistema de análisis de imagen Primo Vision (Figura 10).



**Figura 10. Tasa de blastocisto alcanzada, proporción de embriones no viables, proporción de embriones vitrificados y proporción de embriones transferidos en cada uno de los dos sistemas.**

## DISCUSIÓN

El estudio del desarrollo embrionario a través de la microscopía convencional ha contribuido significativamente al éxito de la fecundación *in vitro*; sin embargo, las tasas de gestación por transferencia continúan siendo relativamente bajas con valores cercanos al 30% (Basile *et al.*, 2014) debido, fundamentalmente, a la baja probabilidad de que un embrión transferido al útero materno de lugar a un recién nacido vivo (Cruz, 2012). Por este motivo y con la finalidad de maximizar las probabilidades de embarazo, a menudo se opta por la transferencia de más de un embrión de manera simultánea, lo que supone un incremento significativo de la proporción de embarazos múltiples, con las complicaciones que éstos conllevan tanto para la madre como para el feto en desarrollo (Kirkegaard *et al.*, 2012).

Las bajas tasas de gestación por transferencia junto con la urgente necesidad de disminuir el número de embarazos múltiples, hacen que los embriólogos se vean obligados a mejorar los métodos de selección embrionaria, con el fin de identificar aquellos con mayor potencial de implantación y reducir el número de embriones transferidos en cada ciclo (Basile *et al.*, 2014). La transferencia selectiva de un único embrión o eSET (*elective single embryo transfer*) es la mejor estrategia para evitar estos embarazos múltiples, pero podría suponer una disminución de las tasas de gestación si no se realiza una buena selección embrionaria (Tejera *et al.*, 2013), pudiendo poner en peligro las tasas globales de éxito de los programas de fecundación *in vitro*.

Con el fin de poder seleccionar aquel embrión(es) con mayor potencial implantatorio, se han realizado numerosas investigaciones buscando nuevos marcadores de viabilidad que mejoren los actuales criterios de selección, como el consumo de oxígeno, el análisis del perfil metabólico, etc. (Kirkegaard *et al.*, 2012). Además de estos nuevos marcadores, se han propuesto nuevas estrategias para la evaluación del desarrollo embrionario como el *screening* cromosómico a través de la hibridación genómica comparada (CGH), el cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto y, más recientemente, el estudio de la cinética embrionaria a través de los sistemas *time-lapse* (Basile *et al.*, 2014).

El desarrollo embrionario es un proceso dinámico que de manera convencional se ha descrito a partir de observaciones estáticas y, aunque ha permitido obtener una gran cantidad de conocimiento, puede suponer una pérdida sustancial de información valiosa (Meseguer *et al.*, 2012). Esta limitación, derivada de la evaluación embrionaria en momentos muy concretos del desarrollo, se ha visto reflejada al observarse que la puntuación que se le otorga a un embrión en función de su calidad, puede variar enormemente en pequeños períodos de tiempo (Montag *et al.*, 2011). Así mismo, la evaluación convencional de la calidad embrionaria está sujeta a cierto grado de variabilidad interobservador/intraobservador (Tejera *et al.*, 2013), además de implicar la manipulación y exposición de los embriones a cambios de temperatura, humedad y gases cuando son extraídos del incubador para evaluarlos (Kirkegaard *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2012). Todo ello establece un dilema a la hora de lograr un balance entre la necesidad de evaluar el desarrollo embrionario y la necesidad de limitar el tiempo durante el que los embriones están expuestos a condiciones subóptimas.

La microscopía *time-lapse* puede superar estas limitaciones al tratarse de un sistema no invasivo que combina incubador y microscopio y que permite realizar un seguimiento continuo del desarrollo embrionario mediante la adquisición de imágenes a intervalos de tiempo predeterminados, sin necesidad de extraer a los embriones de las condiciones estables y controladas del incubador. Estos sistemas *time-lapse* aportan una gran cantidad de información relacionada con el crecimiento y evolución embrionaria, en comparación con las prácticas convencionales de observación intermitente y, además, el hecho de no necesitar extraer a los embriones del incubador, reduce el estrés ambiental

experimentado por los mismos, lo que puede conducir a una mejoría en la calidad embrionaria y, en consecuencia, en las tasas de gestación. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el objetivo definido en este trabajo fue valorar la utilidad del sistema de análisis de imagen Primo Vision® (Vitrolife) como herramienta en los tratamientos de reproducción asistida.

Cuando se comparó la calidad embrionaria en día dos de desarrollo (D+2) entre los dos sistemas, convencional y *time-lapse* (Primo Vision), se observaron diferencias significativas en la proporción de embriones pertenecientes a la categoría A y la proporción de embriones pertenecientes a la categoría C entre ambos grupos de estudio. Así, los embriones sometidos a monitorización continua fueron, de manera general, de mejor calidad que aquellos embriones en los que la evaluación del desarrollo se realizó de manera convencional. Así mismo, la tasa de desarrollo a blastocisto fue superior en el caso de embriones evaluados mediante el sistema de análisis de imagen Primo Vision. Estas observaciones pueden ser explicadas por el hecho de que, en el sistema *time-lapse*, las condiciones de cultivo son estables, están estrictamente controladas y, además, la manipulación de los embriones fuera del incubador es mínima, factores de especial importancia si tenemos en cuenta que variaciones en la temperatura y el pH pueden afectar enormemente a la calidad y el desarrollo embrionario (Meseguer *et al.*, 2012).

Por otro lado, la proporción de embriones transferidos, resultó ser mayor en el caso de las pacientes pertenecientes al grupo “control” que en el caso de las pacientes del grupo “*time-lapse*”, lo que podría ser un indicativo de que la mayor cantidad de información aportada por el Primo Vision para la evaluación morfológica del desarrollo embrionario y la utilización de parámetros morfocinéticos para la selección embrionaria, podrían contribuir a la reducción del número de embriones transferidos en cada ciclo de reproducción asistida; es decir, el sistema *time-lapse* puede proporcionar al embriólogo la información necesaria para una toma de decisiones más objetiva, pudiendo ser así más estricto durante la valoración del número de embriones a transferir. Cabe destacar también que, el mantenimiento de unas condiciones de cultivo más estables en los embriones pertenecientes al grupo “*time-lapse*” puede contribuir, como se dijo anteriormente, a una mayor calidad de los mismos, justificando también los resultados obtenidos.

A pesar de que los sistemas de análisis de imagen minimizan las perturbaciones del medio de cultivo al integrar la incubación y la valoración embrionaria en un mismo dispositivo, los embriones se ven expuestos de manera periódica a la luz cada vez que se adquieren las imágenes que se analizarán posteriormente en forma de vídeo, lo que puede tener efectos negativos sobre los embriones (daños en el ADN, calentamiento localizado y generación de especies de radicales libres dentro de las células) (Wong *et al.*, 2013). No obstante, el porcentaje de viabilidad embrionaria observada en este trabajo fue similar en ambos sistemas de cultivo, por lo que se podría asumir que no existe un efecto negativo en los embriones sometidos a un sistema *time-lapse*, lo que demostraría su utilidad como herramienta de trabajo segura en los laboratorios de fecundación *in vitro*.

Al igual que el caso de la viabilidad embrionaria, tampoco se encontraron diferencias significativas cuando se comparó el porcentaje de embriones transferidos en día 2 (D+2) y en día 3 (D+3) de desarrollo para cada uno de los sistemas a estudiar. La similitud de ambas variables en cada uno de los dos sistemas empleados se corresponde con los resultados obtenidos por trabajos recientes (Cruz, 2012) que realizan la validación clínica de un sistema *time-lapse* y analizan su aplicación en el desarrollo de nuevos marcadores morfocinéticos de selección embrionaria. Descartando las diferencias metodológicas entre este trabajo y los resultados del presente estudio, en ambos casos se pone de manifiesto la utilidad de la tecnología *time-lapse* como herramienta, tanto de investigación como en los diversos tratamientos de reproducción asistida.

De los resultados obtenidos podemos concluir que la incorporación de los sistemas de análisis de imagen, en este caso del Primo Vision, a la práctica habitual en los laboratorios de Embriología supone una magnífica oportunidad de observar la actividad celular y el desarrollo embrionario de una manera ininterrumpida, proporcionando una información extra muy valiosa que permite identificar marcadores dinámicos asociados a una mayor tasa de implantación, a la vez que se permiten detectar eventos anormales y emplearlos como criterios de exclusión. Por este motivo, a pesar de que los laboratorios de reproducción asistida pueden funcionar, y de hecho funcionan, sin la utilización de este tipo de sistemas de análisis de imagen, toda la información adicional que va siendo obtenida a partir de los diferentes estudios realizados en este campo, debe ser implementada paulatinamente a la rutina diaria de los laboratorios de fecundación *in vitro*. No obstante, implementar la tecnología *time-lapse* a la rutina de dichos laboratorios requiere de una serie de mejoras, tanto en la óptica como en el propio análisis de las imágenes que, en el caso de llevarse a cabo, convertirán a este tipo de sistemas en poderosas herramientas para los embriólogos a la hora de la toma de decisiones en reproducción asistida.

En resumen, la tecnología *time-lapse* se ha convertido en una herramienta de gran utilidad gracias a los avances que han tenido lugar en este campo desde su aplicación por primera vez al estudio de embriones de mamíferos en el año 1924 (Lewis & Gregory, 1929). En el futuro, esta tecnología podrá ahorrar tiempo al embriólogo al ofrecerle 24 horas de observación continua; además, tiene el potencial de mejorar la eficacia de los ciclos de fecundación *in vitro*, reducir costes y aumentar la capacidad de identificar embriones con una mayor viabilidad y potencial de implantación (Tejera *et al.*, 2013). Las mejoras que continúan realizándose en este campo científico pueden llegar a ser muy importantes en la aplicación de una política de transferencia de un solo embrión (eSET), al considerarse como un sistema para la toma de decisiones más potente y que está basado no sólo en el estado del embrión en un momento concreto, sino también en una visión más dinámica de todo el proceso del desarrollo embrionario. Por último, cabe destacar que en el futuro, la tecnología *time-lapse*, podría brindar las herramientas necesarias para facilitar la transición de la subjetividad a la objetividad en los laboratorios de fecundación *in vitro*.

## CONCLUSIONES

La selección embrionaria resulta fundamental para el éxito de la fecundación *in vitro*. Los criterios convencionales de clasificación embrionaria para la selección de embriones se basan en la morfología y en la cinética de los mismos valoradas en momentos muy concretos del desarrollo, por lo que su precisión está lejos de ser la ideal. Las técnicas de análisis de imagen permiten la realización de un seguimiento continuo del desarrollo embrionario, proporcionando una gran cantidad de información adicional que añade objetividad a los procesos de selección embrionaria y, en consecuencia, puede mejorar los tratamientos de reproducción asistida al perfeccionar nuestro conocimiento acerca del desarrollo embrionario temprano y conducir hacia sistemas de clasificación más sofisticados.

Ante estas consideraciones se planteó el objetivo de evaluar un sistema *time-lapse* como herramienta en los tratamientos de reproducción asistida, para la observación del desarrollo embrionario *in vitro*. Las conclusiones extraídas de este trabajo son:

1. La ausencia de diferencias significativas obtenidas en la viabilidad embrionaria confirma la posibilidad de incorporar esta herramienta de análisis de imagen de manera segura en los laboratorios de fecundación *in vitro*.
2. Se demuestra que tanto la calidad embrionaria como la proporción de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto es mayor en los embriones sometidos a monitorización continua dentro del incubador.
3. Los sistemas *time-lapse* proporcionan la información necesaria para una toma de decisiones más objetiva por parte de los embriólogos, pudiendo ser más estrictos en la selección embrionaria y, en consecuencia, reducir el número de embriones transferidos en cada ciclo de reproducción asistida.

## BIBLIOGRAFÍA

Ardoy, M. & Calderón, G. (2007). *Criterios de valoración morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*. 1ª Edición. Ed. Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Basile, N., Tejera, A., Aparicio-Ruiz, B. & Meseguer, M. (2014). Marcadores morfológicos embrionarios mediante vídeo *time lapse*. En García-Velasco, J.A. & Simón, C. *Cuadernos de Medicina Reproductiva: Biomarcadores*, 9-23.

Blanes, R., Vaca, R., González, J. & Alberto J.C. (2008). Influencia de la cohorte ovocitaria y embrionaria en las tasas de gestación en FIV/ICSI. *Fertilidad*, 25(3): 147-152.

Conaghan, J., Chen, A.A., Willman, S.P., Ivani, K., Chenette, P.E., Boostanfar, R., Baker, V.L., Adamson, D., Abusief, M.E., Gvakharia, M., Loewke, K.E. & Shen, S. (2013). Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and Sterility*, 100(2): 412-419.

Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K., Martínez, M., Pérez-Cano, I., Muñoz, M. & Meseguer, M. (2011). Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28: 569-573.

Cruz, M. (2012). Validación clínica de un sistema de análisis de imagen. Aplicación del time-lapse en el análisis de marcadores morfocinéticos de desarrollo a blastocisto e influencia del método de fecundación y calidad seminal sobre la cinética de desarrollo embrionario. Tesis Doctoral, España: Universidad de Valencia.

Elgindy, E.A., Abou-Setta, A.M. & Mostafa, M.I. (2011). Blastocyst-stage versus cleavage-stage embryo transfer in women with high oestradiol concentrations: randomized controlled trial. *Reproductive BioMedicine Online*, 23: 789-798.

Gámiz, P., Romero, J.L., Zulategui, J.F., Gadea, B., Albert, C. & de los Santos, M.J. (2005). Valoración de la fecundación. En Remohí, J., Cobo, A., Romero, J.L., Pellicer, A. & Simón, C. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*, 392-402.

Herrero, J., Tejera, A., de los Santos, M.J., Garrido, N., Ramsing, N. & Meseguer, M. (2009). Nuevos métodos de selección embrionaria: una nueva tendencia para transferencias únicas. *Fertilidad* 26(5): 393-402.

Kirkegaard, K., Agerholm, I.E. & Ingerslev, H.J. (2012). Time-lapse monitoring as tool for clinical embryo assessment. *Human Reproduction*, 10: 1-9.

Levens, E.D., Whitcomb, B.W., Hennessy, S., James, A.N., Yauger, B.J. & Larsen, F.W. (2008). Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertility and Sterility*, 90: 2138-2143.

Lewis, W.H. & Gregory, P.W. (1929) Cinematographs of Living Developing Rabbit-Eggs. *Science*, 69: 226-229.

Lopes, A.S., Greve, T. & Callesen, H. (2007). Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology*, 67(1): 21-31.

Machtinger, R. & Racowsky, C. (2013). Morphological Systems of human embryo assessment and clinical evidence. *Reproductive BioMedicine Online*, 26: 210-221.

Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J. & Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and Sterility*, 98(6): 1481-1489.

- Mio, Y. & Maeda, K. (2008). Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199: 660.e1-660.e5.
- Montag, M., Liebenthron, J. & Koster, M. (2011). Which morphological scoring system is relevant in human embryo development?. *Placenta*, 32: 252-256.
- Montag, M., Toth, B. & Strowitzki, T. (2013). New approaches to embryo selection. *Reproductive BioMedicine Online*, 27: 539-546.
- Mortimer, S.T., Swan, M.A. & Mortimer, D. (1998). Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13: 2139-2146.
- Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M. & Ienaga, H. (2010). Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27: 93-96.
- Paternot, G., Debrock, S., D'Hooghe, T. & Spiessens, C. (2011). Computer-assisted embryo selection: a benefit in the evaluation of embryo quality? *Reproductive BioMedicine Online*, 23: 347-354.
- Reed, M.L., Woodward, B.J. & Swain, J.E. (2011). Single or group culture of mammalian embryos: the verdict of the literature. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*, 2:77-87.
- Rienzi, L., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Romano, S., Minasi, M.G., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E. & Greco, E. (2005). Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive BioMedicine Online*, 10: 669-681.
- Rodríguez, M., Prats, L., Cairó, O., del Río, F., Brassesco, A. & Brassesco, M. (2013). Ventajas e inconvenientes de la transferencia embrionaria en +3 y en blastocisto. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 30(3): 3-13.
- Sánchez, I., Simón, C. & Domínguez, F. (2013). La metabolómica en la selección embrionaria. En García-Velasco, J.A & Garrido, N. *Cuadernos de Medicina Reproductiva: Investigación translacional en reproducción humana*, 105-113.
- Sellés, E., Moliá, M., Nicolás, M., Santa, A., Gómez, E., Garda, A.L. & Ballesteros, A. (2005). Capacitación espermática. En Remohí, J., Cobo, A., Romero, J.L., Pellicer, A. & Simón, C. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*, 283-287.
- Tao, T., Robichaud, A., Mercier, J. & Ouellette, R. (2013). Influence of group embryo culture strategies on the blastocisto development and pregnancy outcome. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30: 63-68.
- Tejera, A., Herrero, J., de los Santos, M.J., Garrido, N., Ramsing, N. & Meseguer, M. (2011). Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertility and Sterility*, 96: 618-623.
- Tejera, A., Aparicio-Ruiz, B. & Meseguer, M. (2013). La morfocinética en la selección embrionaria. En García-Velasco, J.A & Garrido, N. *Cuadernos de Medicina Reproductiva: Investigación translacional en reproducción humana*, 79-93.
- Wong, C.C., Loewke, K.E., Bossert, N.L., Behr, B., De Jonge, C.J., Baer, T.M. & Reijo-Pera, R.A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology* 10(28): 1115-1122.
- Wong, C., Chen, A., Behr, B. & Shen, S., (2013). Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reproductive BioMedicine Online*, 26: 120-129.
- Zulategui, J.F., Cobo, A., Romero, J.L., Galán, A., Albert, C., Fernández, A. & de los Santos, M.J. (2005). Inyección intracitoplasmática de espermatozoides-ICSI. En Remohí, J., Cobo, A., Romero, J.L., Pellicer, A. & Simón, C. *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana*, 382-391.