



Universidad  
Zaragoza



# Determinación de parámetros morfocinéticos en embriones con alto poder de implantación

---

TRABAJO FINAL DE GRADO. BIOTECNOLOGÍA

Unidad de Reproducción Asistida Hospital QuironSalud Zaragoza

Autora: Laura Tomás Anadón

Director: Antonio Urries López

Ponente: María Milagros Medina Trullenque

# ÍNDICE

1. Resumen.....	Página 1
2. Abstract.....	Página 2
3. Antecedentes.....	Páginas 3-7
4. Objetivos.....	Página 7
5. Materiales y métodos.....	Páginas 8-11
6. Resultados y discusión.....	Páginas 12-21
7. Conclusiones.....	Páginas 21-22
8. Conclusions.....	Página 22
9. Bibliografía.....	Páginas 23-25
Anexo 1.....	Página 26
Anexo 2.....	Página 27

# 1. RESUMEN

El uso de técnicas de análisis embrionario no invasivos son claves para mejorar las tasas de implantación y poder dar a los pacientes de FIV información objetiva sobre sus posibilidades de embarazo.

El desarrollo de la técnica de incubación asociada a la tecnología *time-lapse* ha permitido el análisis de los embriones durante todo su desarrollo, es decir desde el momento de la fecundación hasta la transferencia embrionaria. Gracias a esta tecnología se ha comprobado que ciertos eventos y parámetros morfocinéticos ocurridos durante los primeros estadios del desarrollo embrionario pueden ser indicadores de la capacidad de implantación de los mismos.

El objetivo final de este trabajo es determinar los eventos morfocinéticos que definen un embrión de alto poder de implantación, de la forma más ajustada posible con el fin de aumentar las tasas de gestación.

Se ha realizado un estudio retrospectivo de 154 ciclos de pacientes del Hospital QuironSalud Zaragoza analizándose un total de 208 embriones transferidos.

Los parámetros de estudio fueron los tiempos de división, la fragmentación celular, el tamaño de las blastómeras y la multinucleación.

Este análisis nos ha permitido definir un embrión con alto poder de implantación como aquel con una fragmentación inferior al 25% que cumple los siguientes eventos cronológicos: realizan la primera división mitótica entre las 20 y las 25 horas; el segundo ciclo celular tiene una duración de 10-13 horas; el tiempo comprendido entre el estadio de 3 a 4 células es inferior a las 5 horas, siendo indicativo de sincronía en el ciclo celular y la diferencia temporal entre el estadio de 3 a 5 células se sitúa en el rango de 11 a 15 horas.

El análisis de la cinética, ha permitido la generación de un algoritmo que nos permite predecir el poder de implantación de cada embrión.

## 2. ABSTRACT

The use of non-invasive embryo analysis techniques is key to improving implantation rates and giving IVF patients objective information about their chances of pregnancy.

The development of the incubation technique associated with time-lapse technology has allowed the analysis of embryos throughout their development, that is, from the moment of fertilization to embryo transfer. Thanks to this technology, it has been proven that certain events and morphokinetic parameters that occurred during the early stages of embryonic development can be indicators of their implantation capacity.

The final objective of this work is to determine the morphokinetic events that define an embryo with high implantation power, in the most accurate way possible in order to increase gestation rates.

A retrospective study of 154 cycles of patients at the QuironSalud Zaragoza Hospital was carried out, analysing a total of 208 embryos transferred. The study parameters were division times, cell fragmentation, blastomere size and multinucleation.

This analysis has allowed us to define an embryo with high implantation power as one with a fragmentation of less than 25% that meets the following chronological events: they perform the first mitotic division between 20 and 25 hours; the second cell cycle has a duration of 10-13 hours; the time between the stage of 3 to 4 cells is less than 5 hours, indicating synchrony in the cell cycle and the temporal difference between the stage of 3 to 5 cells is in the range of 11 to 15 hours.

The analysis of embryo kinetics has allowed the generation of an enable that allows us to predict the implantation power of each one.

### 3. ANTECEDENTES

La Organización Mundial de la Salud define la infertilidad como una afección del sistema reproductor que deriva en una incapacidad de concebir. Se estima que alrededor de 186 millones de personas en el mundo están afectadas por problemas de infertilidad (1). Por este motivo, año tras año, las técnicas de reproducción asistida van ganando importancia en nuestra sociedad.

A nivel mundial los nacimientos producidos gracias a técnicas de reproducción asistida (TRA) rondan el 0,2%-4,3% de los nacimientos totales (2). España es el tercer país del mundo en el que mayor número de tratamientos de reproducción asistida se realizan por detrás de Estados Unidos y Japón. Además, según datos de Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), los tratamientos de reproducción asistida en España constituyen cerca del 15% de los tratamientos realizados en los 39 países miembros de esta sociedad (3).

Al hablar de TRA se incluyen todas las intervenciones relacionadas con la manipulación de los gametos y/o embriones para la consecución de un embarazo.

En los tratamientos de reproducción asistida es común la transferencia múltiple con la finalidad de aumentar las tasas de éxito de gestación, aunque en la actualidad, la tendencia es reducir el número de embriones a transferir para disminuir las tasas de gestación múltiple. El número máximo permitido de embriones transferidos es fijado por la legislación de cada país. En el caso de España, la Ley de Reproducción Asistida (Ley 14/2006) autoriza un máximo de tres embriones por transferencia. Los registros nacionales llevados a cabo por la Sociedad Española de Fertilidad señalan un mayor número de transferencias de dos embriones (67,4%). Esto provoca que, según el último informe publicado en 2016, las tasas de parto múltiple se sitúen en un 17,2% con ovocitos propios y un 20,3% con ovocitos de donante (4).

Los embarazos múltiples conllevan una serie de complicaciones tanto para la madre, como para los recién nacidos. Dentro de estas complicaciones encontramos trastornos hipertensivos, diabetes mellitus gestacional, partos prematuros, una mayor mortalidad perinatal o lesiones neurológicas (5).

Es por ello que las transferencias únicas están aumentando, de ahí, la importancia de la selección de embriones con mayor poder de implantación.

Tradicionalmente la selección embrionaria se ha basado en el análisis morfológico. La Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) desarrolló una clasificación para embriones tempranos que los relaciona con la probabilidad de implantación (6). La clasificación de ASEBIR fue publicada en 2007 y jerarquiza los embriones en cuatro categorías: A, B, C y D siendo estos últimos los que menor potencial de implantación tienen (Anexo 1, Ilustración 16).

La clasificación de ASEBIR valora morfológicamente cada uno de los estadios, desde el ovocito (Día inicial, D+0), cigoto y primera división celular (D+1) hasta el estadio de blastocisto (D+5).

A día de hoy la clasificación morfológica sigue siendo una herramienta útil para la categorización de los embriones. La principal desventaja de ésta recae en que el análisis es realizado por el embriólogo de manera completamente subjetiva.

En el cultivo convencional, los embriones se visualizaban diariamente utilizando un microscopio invertido. Al realizarse una única observación puntual se perdía una gran cantidad de información. Las horas de control de los embriones estaban bien caracterizadas y se recomendaba la siguiente cronología:

- En D+0 se debe realizar la observación morfológica del ovocito.

Las mujeres nacen con un número limitado de ovocitos en sus folículos primordiales. La ovogénesis en la mujer se inicia a partir de las células germinales primarias en el embrión, las cuales se diferencian a oogonias e inician la meiosis I, sin embargo, se detienen en profase I.

En la pubertad seguirán en profase I. Un pico hormonal será el encargado de producir el reclutamiento de los folículos donde, los ovocitos, reanudan la meiosis I hasta el inicio de meiosis II. Se forma así el ovocito secundario que tras la unión con el espermatozoide (fecundación) reanuda la meiosis II, dando lugar al óvulo.

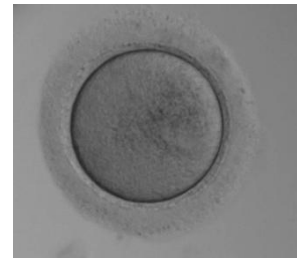


Ilustración 1. En la figura podemos observar el ovocito rodeado de la zona pelúcida y entre ellos, el espacio perivitelino. Imagen tomada con el incubador Geri.

El ovocito extraído en la punción se encontrará detenido, entonces, en metafase II hasta el momento de la fecundación. En el estadio de ovocito se deben analizar tanto alteraciones citoplasmáticas, como la vacuolización o la granulosidad, como extracitoplasmáticas de la zona pelúcida o el espacio perivitelino.

- En D+1 entre las 16 y 18 horas post-inseminación se debe realizar un control de fertilización.

Cuando se produce la fecundación se suceden una secuencia de acontecimientos que dan lugar a la aparición de nuevas estructuras nucleares, los pronúcleos. Si se ha producido con éxito la fecundación, deben observarse dos pronúcleos en el cigoto, el pronúcleo masculino y el pronúcleo femenino, ambos haploides. La fusión de ambos pronúcleos, denominada singamia, es el punto final de la fecundación. La singamia y la consiguiente desaparición de los pronúcleos se puede observar entre las 24 y 28 horas post-inseminación.

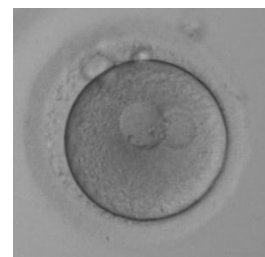


Ilustración 2. En la figura podemos observar los dos pronúcleos del cigoto en posición central. Imagen tomada con el incubador Geri.

- En D+2, la observación debe realizarse entre las 43 y las 45 horas post-inseminación. En este momento los embriones óptimos serán aquellos que tengan cuatro células.

- En D+3, se aconseja la observación de los embriones entre las 67 y 69 horas post-inseminación.

En este estadio, los embriones deben tener ocho células. Además del número de células tanto en D+2 como en D+3 se deben observar otros parámetros como la fragmentación celular, la simetría de las blastómeras (células individuales del embrión) y el grado de multinucleación.

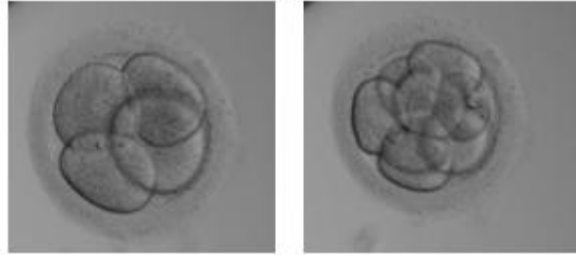


Ilustración 3. En la figura observamos el mismo embrión en estadio de cuatro células en D+2 y de ocho células en D+3. Imagen tomada con el incubador Geri.

- En D+4, la observación del embrión se aconseja entre las 90 y 94 horas post-inseminación. En D+4 el embrión alcanza el estadio de mórula.

En este estadio, las blastómeras son difícilmente diferenciables entre sí. El embrión se caracteriza por constituirse como una masa de células compacta en la que se pueden diferenciar los núcleos. Las células forman fuertes uniones estrechas lo que impide que se distingan los contornos de cada una de ellas. En este estadio las células del embrión dejan de ser totipotentes. En D+4 se controla que el embrión haya adquirido el estadio de mórula y el tipo de compactación que ésta tiene (parcial o total).

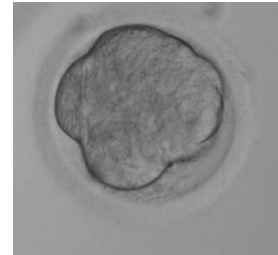


Ilustración 4. En la figura observamos en embrión en estadio de mórula. Imagen tomada con el incubador Geri.

- En D+5, la observación debe realizarse entre las 114 y las 118 horas post-inseminación.

En D+5 los embriones óptimos serán aquellos que hayan adquirido el estadio de blastocisto. Las células más cercanas a la zona pelúcida desarrollan uniones ocluyentes entre ellas, éstas darán lugar al trofoblasto (da lugar a la placenta). Por su parte, las células del interior establecen uniones en hendidura y forman una masa celular interna que será lo que dé lugar al feto. La entrada de agua en el blastocisto origina el blastocele (espacio acelular) que irá aumentando de tamaño. El aumento del blastocele dará lugar a un blastocisto expandido ya que en este caso sí aumenta de volumen al reducirse la zona pelúcida por acción de enzimas.

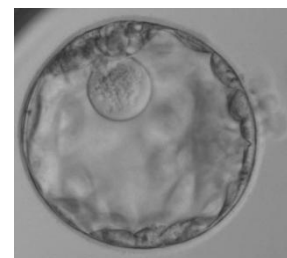


Ilustración 5. En la figura observamos en embrión en estadio de blastocisto. Imagen tomada con el incubador Geri.

Estas observaciones diarias, no solo tenían como inconveniente la pérdida de información dinámica del desarrollo embrionario. Cada vez que se realizaba el chequeo de los embriones se exponían al cultivo a cambios en la exposición a la luz, a cambios de temperatura, en el pH,

por la evaporación del CO<sub>2</sub> etc. Además cada vez que se abría el incubador, se producían oscilaciones en la temperatura y la concentración de gases en el interior (7).

Todos estos efectos son perjudiciales para el embrión y su correcto desarrollo. Estos factores unidos a la limitación del análisis por la subjetividad del embriólogo hacen necesario el desarrollo de nuevos métodos de incubación (8).

Para afrontar estos problemas se han desarrollado los sistemas *time-lapse* que además nos permiten ampliar la información obtenida a través del cultivo tradicional, al posibilitarnos un seguimiento continuado del desarrollo embrionario. Los primeros sistemas *time-lapse* datan de 1929 cuando se utilizaron para estudiar ovocitos de conejo (9) pero no fue hasta la década de los 90 cuando ésta técnica se implementó en embriones humanos. El sistema *time-lapse* acoplado al incubador constituye una metodología no invasiva que nos aporta información continua del desarrollo del embrión. Esta tecnología consiste en la toma de imágenes del embrión cada 5 minutos a diferentes planos focales, mediante la superposición de todas estas imágenes se crea un vídeo que nos permitirá el análisis continuado del proceso. Algunos autores han estudiado el impacto de este tipo de incubadores en las tasas de gestación obteniéndose diferencias de un 20,1% de embarazos por punción y un 15,7% por transferencia (10).

La gran ventaja de la tecnología *time-lapse* es que nos permite la observación continuada del embrión sin modificar sus condiciones de cultivo.

En la actualidad existen diferentes tipos de dispositivos *time-lapse*:

- Dispositivo no integrado: Se inserta un microscopio en un incubador convencional.
- Dispositivo integrado: El incubador y el microscopio constituyen un solo equipo.

Algunos autores han puesto de manifiesto posibles inconvenientes de esta técnica. En los sistemas *time-lapse*, los embriones están continuamente expuestos a la luz. Es necesario que la longitud de onda sea baja, una luz de determinada longitud de onda puede dañar el DNA y formar radicales libres que perjudiquen el desarrollo embrionario (11)(12). Asimismo la continua presencia de campos electromagnéticos encontrados en algunos sistemas *time-lapse* puede afectar al desarrollo embrionario (13).

Además esta técnica no permite la rotación de los embriones. Pese a poder realizar una observación en distintos planos, una elevada fragmentación o la superposición de las blastómeras puede dificultar el análisis. Pero la razón principal por la que el uso de este tipo de incubador no está completamente extendido es meramente económica, asociada al elevado coste del mismo (12).

Pese a todas estas teóricas desventajas, los beneficios de esta tecnología la hacen, a día de hoy, una herramienta fundamental en un laboratorio de reproducción asistida.

En 1997, Payne et al. estudiaron embriones humanos con un sistema *time-lapse* y establecieron una posible relación entre los eventos morfocinéticos con la formación de los pronúcleos y la posterior calidad embrionaria (14).

Este estudio sentó las bases de la tendencia actual en el estudio de la calidad embrionaria, la búsqueda de nuevos biomarcadores basándose en eventos morfocinéticos.



En 2011 el foro ALPHA de Científicos en Medicina Reproductiva y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) llevaron a cabo un consenso para estandarizar la validación de parámetros cinéticos del desarrollo embrionario, el conocido como consenso de Estambul (15). Adicionalmente, Ciray et al. desarrollaron una guía acerca de la nomenclatura y la anotación de la dinámica embrionaria la cuál va a ser utilizada en el presente trabajo (Anexo 2, Tabla 1)(16).

Pese a esta estandarización, se debe tener en cuenta que los intervalos temporales no son universales y deben de ser valorados dentro de cada laboratorio. Parámetros como el medio de cultivo utilizado, el método de fertilización o los intrínsecos de los propios gametos pueden influir en la velocidad de desarrollo del embrión (8). Este es el motivo por el cual no solo se analizan los tiempos de división de las blastómeras sino también las relaciones entre ellos.

## 4. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es estudiar los parámetros que definen un embrión con alta capacidad de implantación. Para ello realizamos:

- Análisis de diferentes parámetros morfológicos durante el desarrollo del embrión tales como la fragmentación celular, la multinucleación y la asimetría de las blastómeras y la relación de los mismos con las tasas de implantación.
- Anotación cronológica de las divisiones de las blastómeras y el análisis del impacto de las mismas así como el de la duración de los ciclos celulares.

Adicionalmente se ha desarrollado un algoritmo predictivo de la tasa de implantación, para poder aportar a los pacientes una información ajustada de sus probabilidades de embarazo.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha realizado un estudio retrospectivo de 154 ciclos de pacientes del Hospital QuironSalud Zaragoza entre febrero de 2017 y febrero de 2018. Para la realización de este trabajo no se ha tenido en consideración ni el tipo de esterilidad, ni la procedencia de los gametos (propios o donados), ni la técnica de fecundación utilizada, siendo únicamente objeto de estudio el desarrollo del embrión.

No se han incluido en el ensayo aquellos embriones que fueron sometidos a un diagnóstico genético preimplantacional, al considerarse esta técnica como invasiva para el embrión y poder ser un factor de disminución de la viabilidad del mismo.

De la misma manera se han excluido del estudio aquellos ciclos de los que no se disponía de información acerca del número de vesículas o en su defecto, del número de nacidos vivos que probasen la implantación.

El número total de embriones estudiado fue de 208. Para que el grupo de estudio fuera homogéneo se estudiaron 104 embriones implantados que cumplieran con los requisitos para ser estudiados y 104 embriones no implantados.

Todos los embriones se han obtenido siguiendo los protocolos mencionados a continuación:

- **Estimulación ovárica**

El protocolo de estimulación ovárica varía en función de la paciente. Habitualmente consiste en la administración de agonistas o antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), para inhibir la ovulación y permitir la maduración de los folículos, conjuntamente con la hormona folículo estimulante (FSH).

Mediante ecografía se realiza el seguimiento del crecimiento de los folículos y cuando adquieren un tamaño igual o superior a los 18 mm se le administra a la paciente la hormona gonadotropina coriónica humana, HCG. Esta hormona desencadena la ovulación a las 36 horas posteriores a su administración y será entonces cuando el folículo haya madurado completamente.

- **Punción folicular**

La punción folicular consiste en un proceso quirúrgico en el cuál el contenido folicular en que se encuentran los ovocitos es aspirado gracias a una aguja transvaginal guiada por ecografía. El líquido folicular aspirado se vierte en condiciones de esterilidad en un tubo de recolección de 14ml.

El tubo recogido se transporta al laboratorio de fecundación *in vitro* y, dentro de la campana con la ayuda de una pipeta Pasteur se aspira el complejo cúmulus-ovocito. Dentro del folículo los ovocitos no se encuentran de manera aislada sino que se encuentran rodeados por células de la granulosa. Las células de la granulosa son necesarias para regular el pH en el ovocito y suministrarle nutrientes sin embargo, en cultivo *in vitro*, no son necesarias.

Para retirar esta capa de granulosa (aunque, parcialmente) y eliminar los restos de líquido folicular, los ovocitos se lavan en medio G-IVF PLUS™ de Vitrolife. Este mismo medio será el sustento de la fecundación posterior.

Tras este lavado, los ovocitos se depositan en una placa cubierta de este mismo medio atemperado desde el día anterior, en un incubador a 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>.

El medio G-IVF PLUS™ de Vitrolife está optimizado para mantener la funcionalidad de los gametos (17).

- **Procesado de la muestra seminal**

Previo al procesado de la muestra seminal se debe evaluar el volumen de eyaculado y la concentración, movilidad y morfología espermática. Éstos parámetros se analizan con una cámara Makler bajo microscopia óptica de contraste de fases a 40 aumentos.

En el plasma seminal los espermatozoides se mezclan con secreciones de diverso origen (del epidídimo, próstata, glándulas sexuales accesorias etc) y su capacidad fecundante queda enmascarada. Esto es debido, sobre todo a que en el plasma hay proteínas que se adsorben sobre la superficie de la membrana, la estabilizan y los mantienen en un estado descapacitado. La técnica de capacitación espermática utilizada en el proceso fue la centrifugación en gradientes de densidad. Los gradientes utilizados fueron los medios *PureSperm 40™* y *PureSperm 80™* de la casa comercial Nidacon. Estos medios están formulados para minimizar los repentinos cambios de pH y osmoralidad en los espermatozoides desde el plasma seminal hasta el medio de fertilización (18).

Este método también permite la selección de los espermatozoides viables y motiles. Sólo aquellos con estas características serán capaces de superar estos gradientes de densidad y formar un pellet tras la centrifugación.

Con una pipeta Pasteur se toma este pellet y se diluye en medio G-IVF PLUS™ de Vitrolife que, de nuevo, ha sido atemperado desde el día anterior, en un incubador a 37°C y un 6% de CO<sub>2</sub>.

- **Fecundación *in vitro***

El método de fecundación *in vitro* utilizado en cada ciclo, varía principalmente atendiendo a la concentración de espermatozoides móviles de la muestra seminal. Cuando la concentración espermática es superior a los 3 millones de espermatozoides móviles por mililitro, la técnica utilizada de preferencia es la fecundación *in vitro* convencional. Esta técnica consiste en la co-incubación en una misma placa de los ovocitos con 125.000 espermatozoides móviles por mililitro, para favorecer la fecundación, pero no la polipenetración de los ovocitos.

Cuando la muestra seminal de partida es de peor calidad la técnica utilizada es la inyección intracitoplasmática (ICSI). Para poder llevar a cabo esta técnica los ovocitos deben ser desnudados, es decir, deben ser aislados por completo de las células del cúmulus. Para ello, se realiza el pipeteo repetido en medio HYASE-10X™ que contiene hialuronidasa que favorecerá esta separación.

La ICSI es un proceso que se realiza en su totalidad fuera de la incubadora, es por ello, que el medio utilizado para el manejo de los gametos es un medio tamponado que mantiene estable el pH, el medio G-MOPS PLUS™, de la casa comercial Vitrolife. Este medio contiene amino ácidos, antibióticos y la misma osmoralidad que todos los demás medios de Vitrolife (19).

En la misma placa los espermatozoides se depositan en medio ICSI™ de Vitrolife. Este medio contiene PVP, polivinilpirrolidona, un polímero soluble empleado para disminuir la velocidad de los espermatozoides y facilitar así la captura de los mismos. Se debe tener especial cuidado a la hora de la inyección del espermatozoide en el ovocito de no introducir PVP.

La técnica ICSI tiene una variante denominada PICSI. Esta técnica está indicada para parejas en las que la muestra espermática presenta una elevada fragmentación del DNA y/o una baja concentración y mala morfología espermática. Además, esta técnica se realiza en aquellos pacientes que se han sometido previamente a una ICSI y se han obtenido embriones de mala calidad.

En la ICSI los espermatozoides son seleccionados de manera subjetiva en función de su morfología y motilidad. En la PICSI, se añade un método objetivo que permite seleccionar los espermatozoides maduros y con menor daño en su DNA. La placa en la que se depositan los espermatozoides contienen un material sintético muy similar al ácido hialurónico, sustancia principal de las células que rodean al ovocito. Los espermatozoides de buena calidad se adherirán a la placa por la cabeza, pero la cola seguirá manteniendo el libre movimiento permitiendo la identificación visual de los espermatozoides de mejor calidad.

- **Cultivo embrionario**

Tras el proceso de fecundación, los cigotos son introducidos en el incubador. En el caso de la fecundación mediante fecundación *in vitro* convencional, la coincubación se mantiene hasta el día siguiente. En este momento los cigotos serán transferidos desde el medio G-IVF PLUS™ al medio Gems Geri™. En cambio, en el caso de la inyección intracitoplasmática, esta transferencia se hace al finalizar el proceso. El medio Gems Geri™ es un medio universal que permite el mantenimiento de los embriones a lo largo de todo su desarrollo hasta el momento de la transferencia.

El incubador *time-lapse* en el que se ha realizado este estudio pertenece a la casa comercial *GeneaBiomedx (MERCK)* y recibe el nombre de Geri®. El incubador Geri® es un sistema *time-lapse* de tipo integrado compuesto por seis cámaras de incubación cada una de las cuales está acoplada a un cámara de grabación.

El incubador mantiene los embriones en cultivo bajo una concentración de CO<sub>2</sub> del 6% y una temperatura de 37°C. Tras la apertura del incubador, la brevedad en el tiempo de recuperación de las condiciones de temperatura y de CO<sub>2</sub> impide el daño al embrión.

Cada una de las cámaras de grabación realiza fotos cada 5 minutos en diferentes planos focales, con una resolución de 2 píxeles por μm (20).

Los embriones pueden ser analizados gracias al software Geri Assess acoplado al incubador desde un ordenador conectado a la red. Gracias a Geri Assess podemos valorar el desarrollo embrionario de forma dinámica. Este software nos permite anotar el tiempo en el que sucede cada evento y las características morfológicas del embrión.

Adicionalmente permite asociar cada evento o característica a una puntuación en concreto y clasificar así los embriones.

- **Transferencia embrionaria**

La transferencia embrionaria consiste en la introducción de los embriones en el útero materno con la ayuda de una cánula. La transferencia se realiza también en medio Gems Geri®.

- **Determinación de embarazo clínico**

Pasados 15 días de la transferencia embrionaria las pacientes se realizan un análisis de sangre. Esta prueba consiste en la medida de la concentración de gonadotropina coriónica humana sérica (HCG), una hormona producida por el embrión, en sangre. Valores superiores a 10UI/ l son indicativos de gestación.

Estos resultados se deben confirmar mediante ecografía y la visualización de las vesículas. El saco vitelino es la primera estructura visualizable por ultrasonido indicadora de embarazo.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

Para el análisis estadístico de los datos se ha realizado con el programa R commander, versión 2.5-3.

Para describir la distribución de probabilidades de implantación las variables cuantitativas fueron transformadas en variables cualitativas. El estudio se basa en probar la asociación entre dos variables cualitativas realizando el test de Chi cuadrado de Pearson.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un análisis tanto desde el punto de vista morfológico como desde el punto de vista morfocinético.

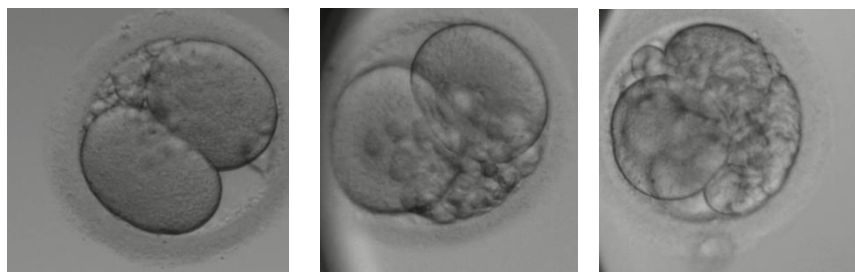
### ANÁLISIS MORFOLÓGICO

- Fragmentación

Durante la división mitótica de las mismas es frecuente la externalización de pequeñas porciones citoplasmáticas anucleares envueltas en membrana celular denominados comúnmente fragmentos celulares (21).

Es difícil evaluar la incidencia de la fragmentación. Por un lado, es necesario diferenciar los fragmentos de las propias células. Por otro lado, se debe estimar la proporción de fragmentación con respecto al tamaño del embrión de manera subjetiva.

Pese a parecer clara la afectación de la tasa de implantación con una mayor fragmentación, estos embriones no son necesariamente anormales cromosómicamente (22). Solo cuando la fragmentación celular supera el 25% del volumen del embrión se ha visto un aumento en estas anomalías. Dentro de estas anomalías encontramos un aumento de mosaicismos, poliploidias y haploidías pero no así de aneuploidías (23) (6).



**Ilustración 6.** En las figuras encontramos representados los diferentes grados de fragmentación celular. El embrión de la izquierda presenta una fragmentación inferior al 10% de su volumen, el embrión del centro una fragmentación entre el 11 y el 25% de su volumen y el embrión de la derecha presenta más del 25% de fragmentación.

De los 208 embriones analizados 157 tenían una fragmentación celular inferior al 10% del volumen del embrión, siendo este el rango perteneciente a la mayor tasa de implantación (57,78%). El número de embriones analizados con una fragmentación superior al 25% de su volumen fue menor, un total de 11 embriones. Se debe tener en cuenta que la transferencia de este tipo de embriones se restringe a aquellos ciclos en los que no se dispone de otra alternativa dada su conocida relación con una menor tasa de implantación. Como era esperable para este porcentaje de fragmentación celular el poder de implantación es menor. De estos 11 embriones solamente 1 implantó (9,09%).

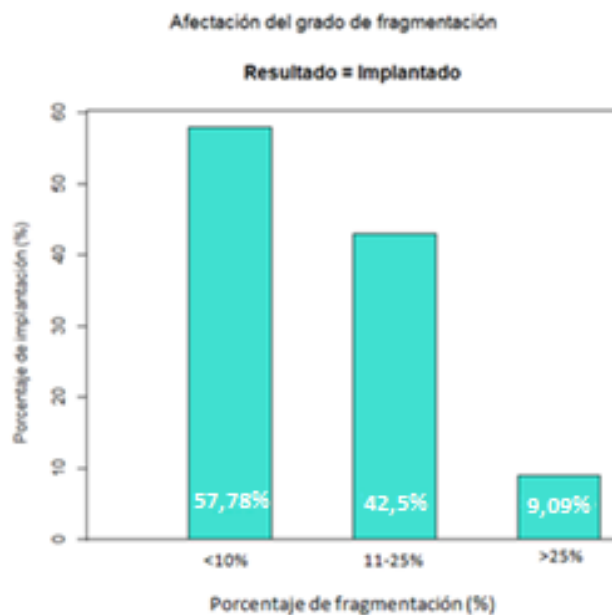


Ilustración 7. Representación, mediante una gráfica de barras de los porcentajes de implantación en función de la fragmentación celular de los embriones. Gráfica realizada con el programa estadístico R commander.

Los resultados obtenidos acerca de las tasas de implantación fueron estadísticamente significativos al comparar los embriones con un porcentaje de fragmentación inferior al 25% con aquellos que tenían una fragmentación mayor ( $p$ -valor=0,003). En cambio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los embriones con una fragmentación inferior al 10% y los que tenían entre un 11 y un 25%.

- Multinucleación

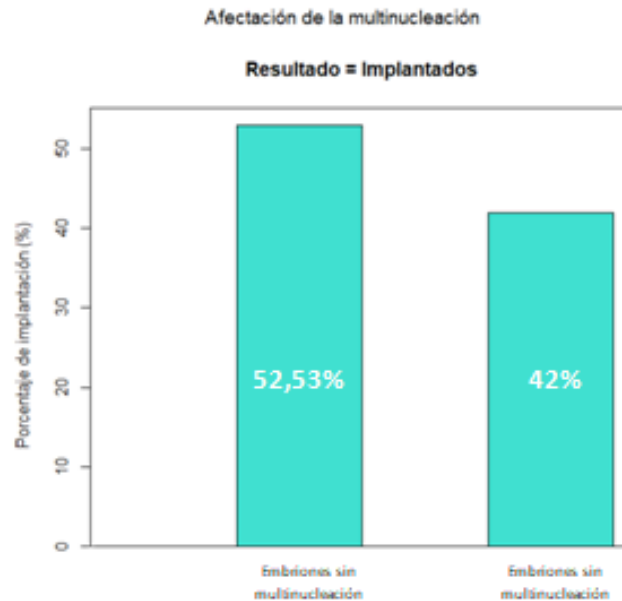
La presencia de más de un núcleo por blastómera es frecuente en los embriones, la incidencia varía mucho en función del estudio incluso entre observadores (24).

La observación en estadios posteriores a día tres se ve dificultada debido al tamaño menor de los blastómeras y al mayor número de células.

Se ha determinado que en el caso de que la binucleación en día dos y tres solamente la presente una de las blastómeras la multinucleación no afecta a la posterior tasa de implantación. Por este motivo en el presente trabajo únicamente se consideró la multinucleación en el caso que ambas células presentaran dos núcleos (en día dos) o alguna de ellas más de dos núcleos.

El fenómeno de la multinucleación no tiene un origen claro, podría deberse a mitosis defectuosas, alteraciones en la membrana nuclear (25), al mal funcionamiento del huso mitótico o a que se haya producido una cariocinesis sin citocinesis (26). También se ha relacionado la incidencia de la Multinucleación con el medio de cultivo utilizado y un inapropiado control de la temperatura, sobretodo en relación a la punción folicular (27)(28).

El consenso de Estambul aconseja, siempre que sea posible, no transferir embriones multinucleados a pesar de que se han publicado nacimientos de niños sanos a partir de los mismos (6).



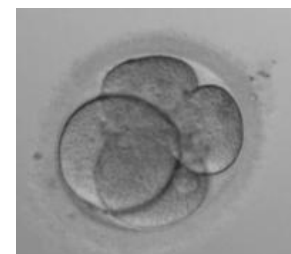
**Ilustración 8.** Representación, mediante una gráfica de barras de los porcentajes de implantación de embriones con o sin multinucleación. Gráfica realizada con el programa estadístico R commander.

De los 208 embriones estudiados, un total de 50 presentaban multinucleación en sus blastómeras. Al estudiar la tasa de implantación de los embriones multinucleados (42%) y la tasa de los embriones no multinucleados (52,53%) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor= 0,1943).

Este resultado parece indicar una baja afectación de la multinucleación a las tasas de gestación. Sin embargo, como la incidencia de la multinucleación varía en función del estudio y del observador (24) para la verificación de estos resultados se precisaría llevar a cabo un estudio mayor, incluso, multicéntrico.

- Asimetría celular

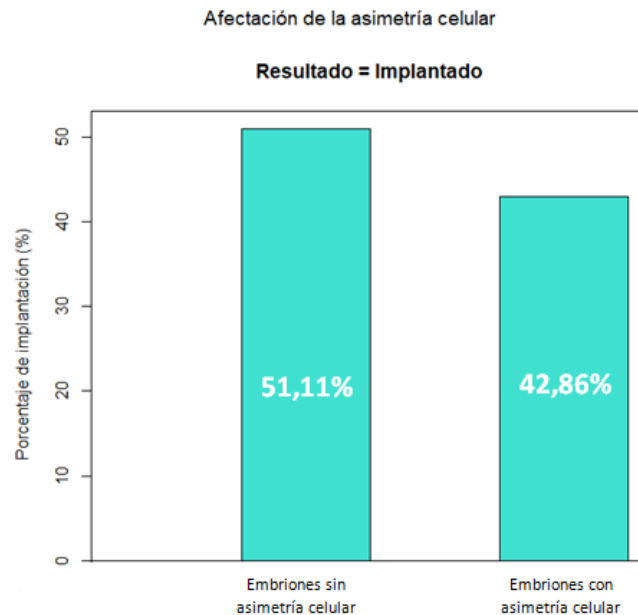
Durante las primeras divisiones mitóticas, las células no siempre se dividen de manera simétrica y sincrónica. Cada una de las células hijas debe contener el material citoplasmático necesario para mantener la línea celular. Cuando la división es asimétrica, se producen células hijas de diferente tamaño. Según las anotaciones de Hardarson et al. se considera que dos blastómeras tienen diferente tamaño cuando sus diámetros difieren en más de un 20%. De esta forma, embriones con divisiones simétricas y sincrónicas presentarán dos, cuatro, ocho o dieciséis células de tamaño similar siendo despreciables los tiempos de estadios intermedios.



**Ilustración 9.** En la figura encontramos representado un embrión asimétrico en estadio de 4 células.



Cuando se observen células desiguales durante los estadios intermedios (por ejemplo tres o cinco células) se considera un embrión “estadio específico” y no un embrión asimétrico (6). En estos casos las blastómeras de mayor tamaño se corresponden con células que todavía no han dividido. Por el contrario, si durante estos estadios intermedios el embrión contiene células de tamaño semejante se considera asimétrico.



**Ilustración 10.** Representación, mediante una gráfica de barras de los porcentajes de implantación de embriones con o sin asimetría celular. Gráfica realizada con el programa estadístico R commander.

De los 208 embriones estudiados, solamente 28 presentaban asimetría celular y de éstos 12 dieron lugar a una gestación. La diferencia en la tasa de implantación para embriones asimétricos (42,86%) respecto a la tasa de implantación para embriones simétricos (51,11%) no es estadísticamente significativa ( $p$ -valor=0,4164).

Sin embargo, la afectación de la asimetría celular al poder implantacional ha sido ampliamente estudiada (29) por lo que, al igual que en el caso de la multinucleación, para la validación de los resultados de este trabajo se requeriría de un mayor número de embriones afectados de este fenómeno.

## ANÁLISIS MORFOCINÉTICO

Se ha llevado a cabo la anotación cronológica de los eventos del desarrollo del embrión utilizando el software de análisis de imagen Geri Assess 1.0. Entre los eventos descritos encontramos el tiempo de la primera división celular (abreviado como T2), segunda (a 3 células, T3), tercera (a 4 células, T4) y cuarta (a 5 células, T5). Para la medida de los tiempos de división se ha tomado como referencia el momento en el cual las nuevas blastómeras se han formado completamente.

Gracias a la anotación de estos tiempos, se han analizado la duración del segundo ciclo celular (cc2), como el tiempo transcurrido entre la primera división celular y la segunda (T3-T2) y la sincronía del segundo ciclo celular (s2, T4-T3).

Igualmente se ha llevado a cabo un análisis combinatorio de la duración del ciclo celular y de la sincronía analizando la diferencia temporal entre T5 y T3 (cc3).

Cada uno de estos parámetros se ha analizado inicialmente por separado para determinar el posible carácter predictivo de implantación de cada uno de ellos.

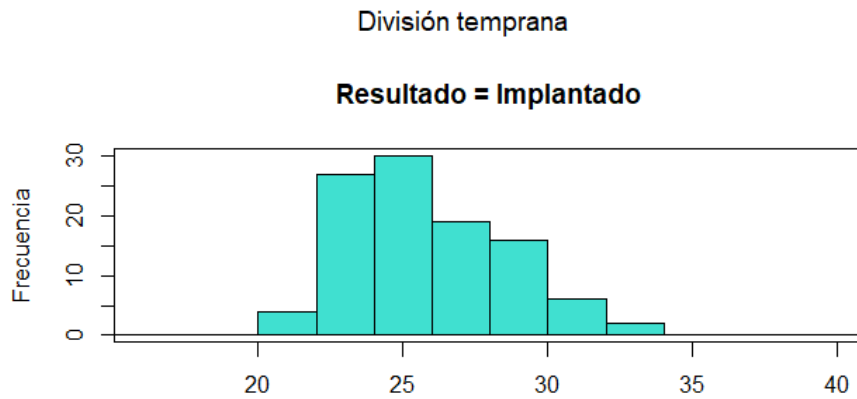
- Tiempo de la primera división celular

La importancia de T2 recae en el concepto conocido como división temprana embrionaria.

Se considera que el cigoto realiza una división temprana cuando ésta ocurre entre las 25 y las 27 horas post-inseminación (6). La división temprana se ha relacionado como predictor de buena calidad embrionaria y de unas mejores tasas de implantación (30,31).

La vinculación entre la división temprana con embriones de mejor calidad no es un concepto biológicamente claro. Este fenómeno se cree que podría estar relacionado con las condiciones de cultivo o con factores intrínsecos del ovocito y el espermatozoide como su grado de maduración, metabolismo o su genética. Además, según el consenso de Estambul basándose en los estudios de Hardarson et al., 2001 la división temprana está relacionada con una menor tasa de anomalías cromosómicas.

Para el análisis de este parámetro debemos de considerar que el rango definido entre las 25 y las 27 horas post-inseminación se remonta a los tiempos en los que el embrión debía ser extraído del incubador para ser visualizado al microscopio. En la actualidad con la llegada de la tecnología time-lapse se puede conocer con exactitud la cronología de la primera división. De esta forma, en este ensayo, se ha partido de la premisa de que el rango establecido para la división temprana es aquel en el que las tasas de implantación son superiores.



**Ilustración 11.** Tiempo que tarda post-inseminación en realizar el embrión implantado la primera división. Histograma obtenido con el programa estadístico R commander.

Como se puede apreciar en la ilustración 11 el tiempo de división sigue una distribución normal. Comparando ambas gráficas, el pico máximo de frecuencias en los embriones implantados se encuentra desplazado en el tiempo siendo este el correspondiente al rango de división situado entre las 22 y las 25 horas post-inseminación.

El test de Chi cuadrado de Pearson fue utilizado para comparar entre diferentes rangos para poder establecer el intervalo con mayor ratio de implantación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los rangos 20-25 horas y 22-25 horas, pero en cambio ambos presentaban un porcentaje de implantación significativo ( $p\text{-valor} < 0.0011$ ).

En este estudio se decidió tomar el intervalo comprendido entre las 20 y 25 horas como el determinante de una división temprana embrionaria, al considerarlo más exacto al tener un tamaño muestral más elevado. 79 embriones de los 208 analizados realizaban su primera división mitótica entre las 20 y 25 horas. De estos 79 embriones, 51 de ellos implantaron, lo que se traduce en un porcentaje de implantación del 64,55%.

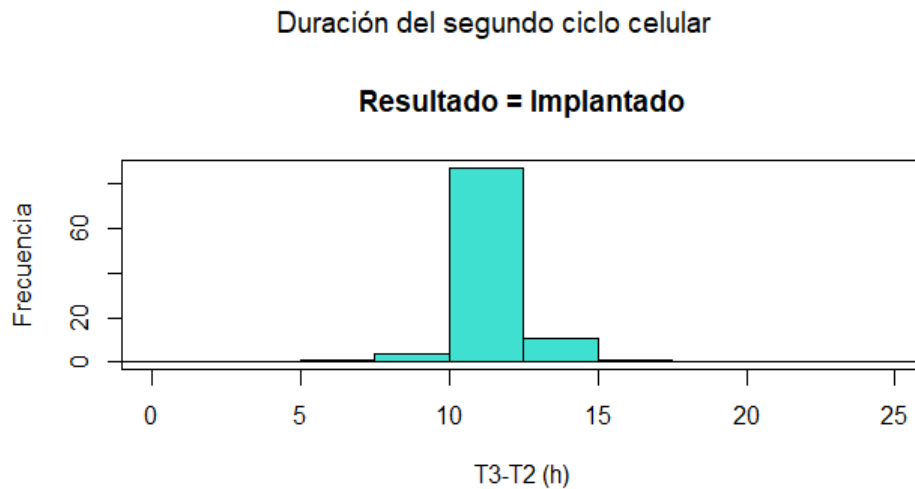
- Duración del segundo ciclo celular (cc2)

La duración del ciclo celular es una secuencia ordenada de eventos en los que una célula duplica su contenido y se divide en dos. La duración del ciclo celular es indicativa de una futura viabilidad del embrión. Ciclos celulares muy prolongados pueden estar causados por un retraso en el desarrollo para permitir la reparación del DNA o la reorganización celular antes de la división.

En el caso concreto del ciclo celular de las blastómeras, las divisiones celulares se suceden sin fases de crecimiento entre ellas. La mitosis dura aproximadamente una hora y la fase de replicación del DNA entre 6 y 8 horas (32).

La división directa hace referencia a una escisión irregular de las blastómeras en la que divide directamente a tres o más células hijas. Estas divisiones aberrantes están causadas por errores en el huso mitótico. Este patrón de división tiene una gran repercusión en la calidad embrionaria pero especialmente si se produce en la primera o segunda división mitótica (33).

Al analizar la duración del segundo ciclo celular identificamos las divisiones directas del cigoto. Se considera que el embrión sufre una división directa de una a tres o más células cuando la duración de cc2 es inferior a las 5 horas.



**Ilustración 12.** Representación de la duración del segundo ciclo celular de embriones implantados en horas Histograma obtenido con el programa estadístico R commander.

Cabe reseñar que, dada la conocida relación entre la división directa y la baja calidad embrionaria, el número de embriones transferidos que sufren este fenómeno se ve muy reducido. De los 208 embriones transferidos analizados solamente 18 de ellos tienen un cc2 inferior a las 5 horas. De estos 18 embriones ninguno de ellos implantó. En estos casos se trataban de transferencias en las que solamente se había obtenido un embrión.

Por lo tanto, la tasa de implantación obtenida para los embriones afectados de división directa es de un 0%. Con estos datos se realiza el test de Chi cuadrado de Pearson obteniendo un p-valor de 0.0000 lo que indica una gran significancia estadística para estos valores.

Pese a este resultado no podemos asegurar completamente que ningún embrión con división directa sea capaz de dar lugar a un embarazo. Para llegar a esta conclusión se requiere de un tamaño muestral superior procedente de un estudio multicéntrico.

Adicionalmente se observó que la mayor tasa de implantación se relacionaba con una duración del segundo ciclo celular comprendida entre las 10 y 13. En este rango 94 embriones implantaron frente a 62 que no lo hicieron correspondiéndose con un porcentaje de implantación del 60,25%.

- Sincronía del segundo ciclo celular (s2)

La sincronía del segundo ciclo celular hace referencia al tiempo que tarda el embrión en duplicar todas sus blastómeras. Puesto que todas ellas llevan a cabo el mismo ciclo celular, una mayor sincronización entre blastómeras hermanas nos indica una mayor calidad embrionaria.

Esto lo podemos apreciar en la figura 13. Todos los embriones implantados analizados tienen un  $s2 < 5$  horas. En este intervalo de tiempo la tasa de implantación es de 55,03%.

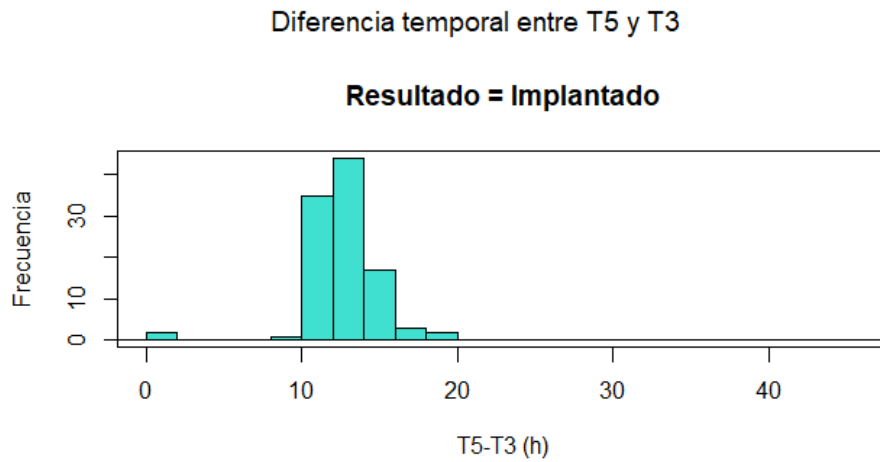


Ilustración 13. Representación de la sincronía del segundo ciclo celular en horas en embriones implantados. Histograma obtenido con el programa estadístico R commander.

- Diferencia temporal entre T5 y T3 (cc3)

En el presente estudio se ha analizado la diferencia temporal entre T5 y T3 al considerarlo un parámetro combinatorio de los anteriormente citados, duración y sincronía del ciclo celular (10).

Analizando los resultados obtenidos, el rango de mayor tasa de implantación (58,16%) es el comprendido entre las 11 y 15 horas. Realizando el test de Chi cuadrado de Pearson para valorar este rango obtenemos un p-valor de 0,0006.

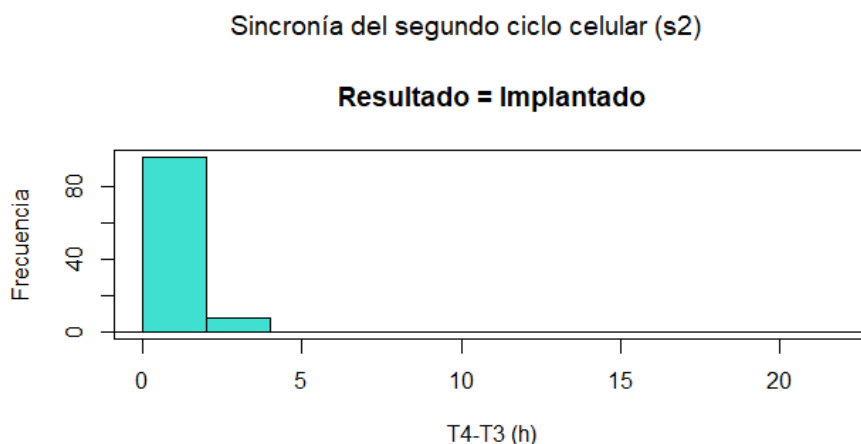


Ilustración 14. Representación de la diferencia temporal de T5 y T3 en horas en función del resultado: implantado o no implantado. Histograma obtenido con el programa estadístico R commander.

- Creación de un algoritmo

Adicionalmente con los resultados anteriormente relatados se ha llevado a cabo la creación de un algoritmo predictivo de la tasa de implantación de cada embrión. En este algoritmo no tenemos en consideración los parámetros morfológicos analizados debido a que previamente al análisis cinético los embriones han sido seleccionados en función de su morfología y hablamos de embriones de categoría Ay B según los criterios de ASEBIR (Anexo 1, Ilustración 16).

El orden de elección de los parámetros se basa en el tamaño muestral de cada uno de ellos.

Embriones con división directa (n=18) tienen un 0% de probabilidades de implantación. Además, todos los embriones implantados tienen un s2 dentro de rango (n=186).

En total de 154 embriones que cumplen con los anteriores requisitos presentan una duración del segundo ciclo celular entre 10 y 13 horas. Aquellos que no lo cumplen (n=32), tienen una tasa de implantación del 31,25%.

Dentro de los embriones que tienen una duración del segundo ciclo celular óptima, 118, cumplen con el rango de 11 a 15 horas de cc3.

Por último, los embriones que cumplen estas premisas han sido clasificados en función de si presentaban o no división temprana (t2 entre 20 y 25 horas), al ser considerado éste el parámetro más significativo. De éstos, los embriones con mayor tasa de implantación son aquellos que presentan división temprana, un 77,08% (n= 48). Los embriones que cumplen los anteriores requisitos, pero no presentan división temprana tienen una tasa de implantación del 54,28% (n=70).

Dado el impacto de una primera división entre las 20 y las 25 horas se ha incluido el cómo influye la división temprana en aquellos embriones cuyo cc3 está fuera de rango. En este caso la tasa de implantación para embriones con división temprana se sitúa en un 61,11% (n= 18) y para embriones sin división temprana en un 44,44% (n=18).

Esta subdivisión no se ha analizado en los embriones que no se encontraban dentro del rango óptimo establecido para la duración del segundo ciclo celular puesto que el número de embriones con división temprana es demasiado bajo (n=7) como para obtener resultados fiables.

Tras este análisis el algoritmo generado se encuentra representado en la figura 15.

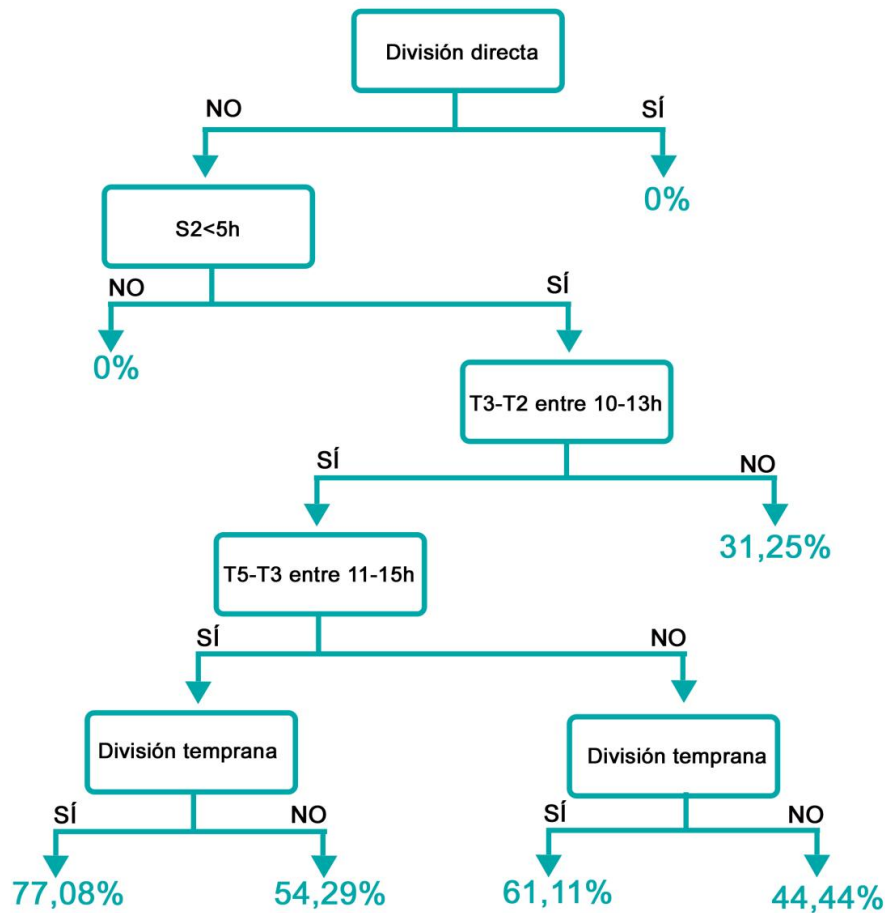


Ilustración 15. Algoritmo generado en base a los resultados de tasas de implantación obtenidos. Este algoritmo representa las probabilidades de gestación en función de si los embriones cumplen con los referidos parámetros.

## 7. CONCLUSIONES

- Una fragmentación celular superior al 25% del volumen del embrión afecta negativamente a las tasas de implantación.
- La multinucleación y la asimetría en las blastómeras no ha arrojado diferencias estadísticamente significativas que permita su identificación como parámetros perjudiciales en la consecución de un embarazo. Para poder obtener resultados concluyentes se precisaría de un estudio de mayor tamaño muestral.
- Los embriones que realizan su primera división entre las 20 y 25 horas post-inseminación tienen un mayor poder de implantación (64,55%).
- La duración del segundo ciclo celular inferior a las 5 horas (división directa) afecta significativamente a la tasa de implantación (0%). En cambio, si se sitúa entre las 10 y 13 horas, la probabilidad de implantación aumenta (60,25%).
- La sincronía del segundo ciclo celular ( $s_2 < 5$  horas) es un indicativo del correcto desarrollo embrionario (55,03%).
- Aquellos embriones con una mayor tasa de implantación tienen un cc3 de entre 11 y 15 horas (58,16%).

- Destacar que, en ningún caso, deberíamos descartar únicamente un embrión evolutivo por una baja tasa de implantación debido a que no podemos garantizar que pueda generar una gestación.

Remitiéndonos al título del presente trabajo y, teniendo en cuenta las conclusiones anteriormente mencionadas, los embriones con alto poder de implantación se caracterizan por, desde el punto de vista morfológico tener un porcentaje de fragmentación inferior al 25% sin multinucleación ni asimetría en las blastómeras pese a no haber obtenido resultados estadísticamente significativos. Desde el punto de vista morfocinético, presentan un  $s_2$  inferior a las 5 horas, una duración del segundo ciclo celular entre las 10 y las 13 horas, un  $cc_3$  entre las 11 y 15 horas y un  $t_2$  entre las 20 y las 25 horas. Ello nos va a permitir una mejor elección de los embriones a transferir, permitiéndonos mejorar las tasas de embarazo, disminuyendo el riesgo de un embarazo múltiple. En ningún caso es descartado ningún embrión por tener una baja tasa de implantación.

## 8. CONCLUSIONS

- Cell fragmentation of more than 25% of the embryo volume affects negatively implantation rates.
- The multinucleation and asymmetry in the blastomeres have not yielded statistically significant differences that allow their identification as detrimental parameters in the attainment of a pregnancy. In order to obtain conclusive results, a larger sample size study would be required.
- Embryos that perform their first division between 20 and 25 hours post-insemination have greater implantation power (64.55%).
- The duration of the second cell cycle less than 5 hours (direct cleavage) significantly affects the implantation rate (0%). On the other hand, if it is between 10 and 13 hours, the probability of implantation increases (60.25%).
- The synchrony of the second cell cycle ( $s_2 < 5$  hours) is an indication of correct embryonic development (55.03%).
- Those embryos with a higher implantation rate have a  $cc_3$  of between 11 and 15 hours (58.16%).
- It should be noted that, in no case, should we discard only an evolving embryo due to a low implantation rate because we cannot guarantee that it can generate a gestation.

Referring to the title of the present work and taking into account the aforementioned conclusions, embryos with high implantation power are characterized, from a morphological point of view, by having a fragmentation percentage lower than 25% without multinucleation or asymmetry in blastomeres despite not having obtained statistically significant results. From a morphokinetic point of view, they present an  $s_2$  shorter than 5 hours, a duration of the second cell cycle between 10 and 13 hours, a  $cc_3$  between 11 and 15 hours and a  $t_2$  between 20 and 25 hours. This will allow us a better choice of embryos to transfer, allowing us to improve pregnancy rates, decreasing the risk of a multiple pregnancy. In no case is any embryo discarded because it has a low implantation rate.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem*. 2018;62(February):2–10.
2. Navarre (Spain). Departamento de Salud. M, Guerra-Martín MD. Anales del sistema sanitario de Navarra. [Internet]. Vol. 41, Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Gobierno de Navarra, Departamento de Salud; 2018 [cited 2019 Jun 22]. 107-116 p. Available from: <https://recyt.fecyt.es/index.php/ASSN/article/view/60117/39305>
3. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, et al. ART in Europe, 2014: results generated from European registries by ESHRE†. *Hum Reprod* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2019 Jun 22];33(9):1586–601. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/33/9/1586/5055580>
4. Sociedad Española de Fertilidad (SEF). Registro Nacional de Actividad 2016-Registro SEF. Informe estadístico de Técnicas de Reproducción Asistida 2016. 2018;1–82.
5. Wei J, Wu Q-J, Zhang T-N, Shen Z-Q, Liu H, Zheng D-M, et al. Complications in multiple gestation pregnancy: A cross-sectional study of ten maternal-fetal medicine centers in China. *Oncotarget* [Internet]. 2016 May 24 [cited 2019 Jun 22];7(21):30797–803. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27127170>
6. Asebir | 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 [Internet]. [cited 2019 Jun 26]. Available from: <https://asebir.com/>
7. Aparicio B, Cruz M, Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2013 Dec [cited 2019 Jun 23];27(6):654–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24135156>
8. Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2019 Jun 23];27(5):1277–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22419744>
9. Lewis WH, Gregory PW. CINEMATOGRAPHS OF LIVING DEVELOPING RABBIT-EGGS. *Science* [Internet]. 1929 Feb 22 [cited 2019 Jun 23];69(1782):226–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17789322>
10. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2019 Jun 23];26(10):2658–71. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/der256>
11. Schenk M, Groselj-Strele A, Eberhard K, Feldmeier E, Kastelic D, Cerk S, et al. Impact of polar body biopsy on embryo morphokinetics-back to the roots in preimplantation genetic testing? *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 2018 Aug [cited 2019 Jun 23];35(8):1521–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29790071>
12. OMIDI M, FARAMARZI A, AGHARAHIMI A, KHALILI MA. Noninvasive imaging systems for gametes and embryo selection in IVF programs: a review. *J Microsc* [Internet]. 2017 Sep

- [cited 2019 Jun 23];267(3):253–64. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/jmi.12573>
13. Beraldi R, Sciamanna I, Mangiacasale R, Lorenzini R, Spadafora C. Mouse early embryos obtained by natural breeding or in vitro fertilization display a differential sensitivity to extremely low-frequency electromagnetic fields. *Mutat Res [Internet]*. 2003 Jul 8 [cited 2019 Jun 23];538(1–2):163–70. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834765>
  14. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod [Internet]*. 1997 Mar 1 [cited 2019 Jun 23];12(3):532–41. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/12.3.532>
  15. Alpha Scientists in Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online [Internet]*. 2011 Jun [cited 2019 Jun 26];22(6):632–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21481639>
  16. Ciray HN, Campbell A, Agerholm IE, Aguilar J, Chamayou S, Esbert M, et al. Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Hum Reprod [Internet]*. 2014 Dec 1 [cited 2019 Jun 23];29(12):2650–60. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/deu278>
  17. Vitrolife - G-IVF™ [Internet]. [cited 2019 Jun 25]. Available from:  
<https://www.vitrolife.com/products/ivf-media--oil/g-ivf/>
  18. Mousset-Siméon N, Rives N, Masse L, Chevallier F, Mace B. Comparison of Six Density Gradient Media for Selection of Cryopreserved Donor Spermatozoa. *J Androl [Internet]*. 2004 Nov 12 [cited 2019 Jun 25];25(6):881–4. Available from:  
<http://doi.wiley.com/10.1002/j.1939-4640.2004.tb03157.x>
  19. Vitrolife - IVF media & oil [Internet]. [cited 2019 Jun 25]. Available from:  
<https://www.vitrolife.com/products/ivf-media--oil/>
  20. Geri- Embryo Development [Internet]. [cited 2019 Jun 25]. Available from:  
<https://www.geneabiomedx.com/Products/Geri>
  21. Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. The cleavage stage embryo. *Hum Reprod [Internet]*. 2012 Aug 1 [cited 2019 Jun 25];27(suppl 1):i50–71. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752610>
  22. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos [Internet]. Vol. 12, *Reproductive BioMedicine Online*. 2006 [cited 2019 Jun 22]. Available from: [www.rbmonline.com/Article/](http://www.rbmonline.com/Article/)
  23. Munne S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update [Internet]*. 1998 Nov 1 [cited 2019 Jun 25];4(6):842–55. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098475>
  24. Paternot G, Devroe J, Debrock S, D’Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. *Reprod Biol Endocrinol [Internet]*. 2009 Sep 29 [cited 2019 Jun 26];7(1):105. Available from:

<https://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-7-105>

25. Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. *J Cell Sci* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2019 Jun 26];122(Pt 10):1477–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19420234>
26. Pickering SJ, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. Diagnosing and preventing inherited disease: An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 1995 Jul [cited 2019 Jun 26];10(7):1912–22. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article/621273/Diagnosing>
27. Winston NJ, Braude PR, Pickering SJ, George MA, Cant A, Currie J, et al. The incidence of abnormal morphology and nucleocytoplasmic ratios in 2-, 3- and 5-day human pre-embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 1991 Jan [cited 2019 Jun 26];6(1):17–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1874952>
28. Pickering SJ, Braude PR, Johnson MH, Cant A, Currie J. Transient cooling to room temperature can cause irreversible disruption of the meiotic spindle in the human oocyte\*\*Supported by program grant PG 8302273 to P.R.B, and M.H.J, from the Medical Research Council of Great Britain, Cambridge, England. *Fertil Steril* [Internet]. 1990 Jul [cited 2019 Jun 26];54(1):102–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028216536449>
29. Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* [Internet]. 2001 Feb 1 [cited 2019 Jun 24];16(2):313–8. Available from: <https://academic.oup.com/humrep/article-lookup/doi/10.1093/humrep/16.2.313>
30. Hesters L, Prisant N, Fanchin R, Méndez Lozano DH, Feyereisen E, Frydman R, et al. Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and in vitro fertilization-embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil Steril* [Internet]. 2008 Jun [cited 2019 Jun 26];89(6):1677–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028207010138>
31. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2008 Dec 1 [cited 2019 Jun 26];199(6):660.e1-660.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002937808008053>
32. ASEBIR 2017. Time-lapse. Parámetros citocinéticos. [Curso]. Clasificación embrionaria clásica vs time-lapse [Internet]. [cited 2019 Jun 26]. Available from: <https://mail.google.com/mail/u/0/#search/TFG+ANT/FMfcgxwBWTDMBQNbmTFBgIMvBjSrZFB?projector=1&messagePartId=0.1>
33. Borini; FPL, Lagalla C, Borini A. Embryo morphokinetic characteristics and euploidy. *Curr Opin Obstet Gynecol* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Jun 22];30(3):185–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29664791>

# ANEXO 1

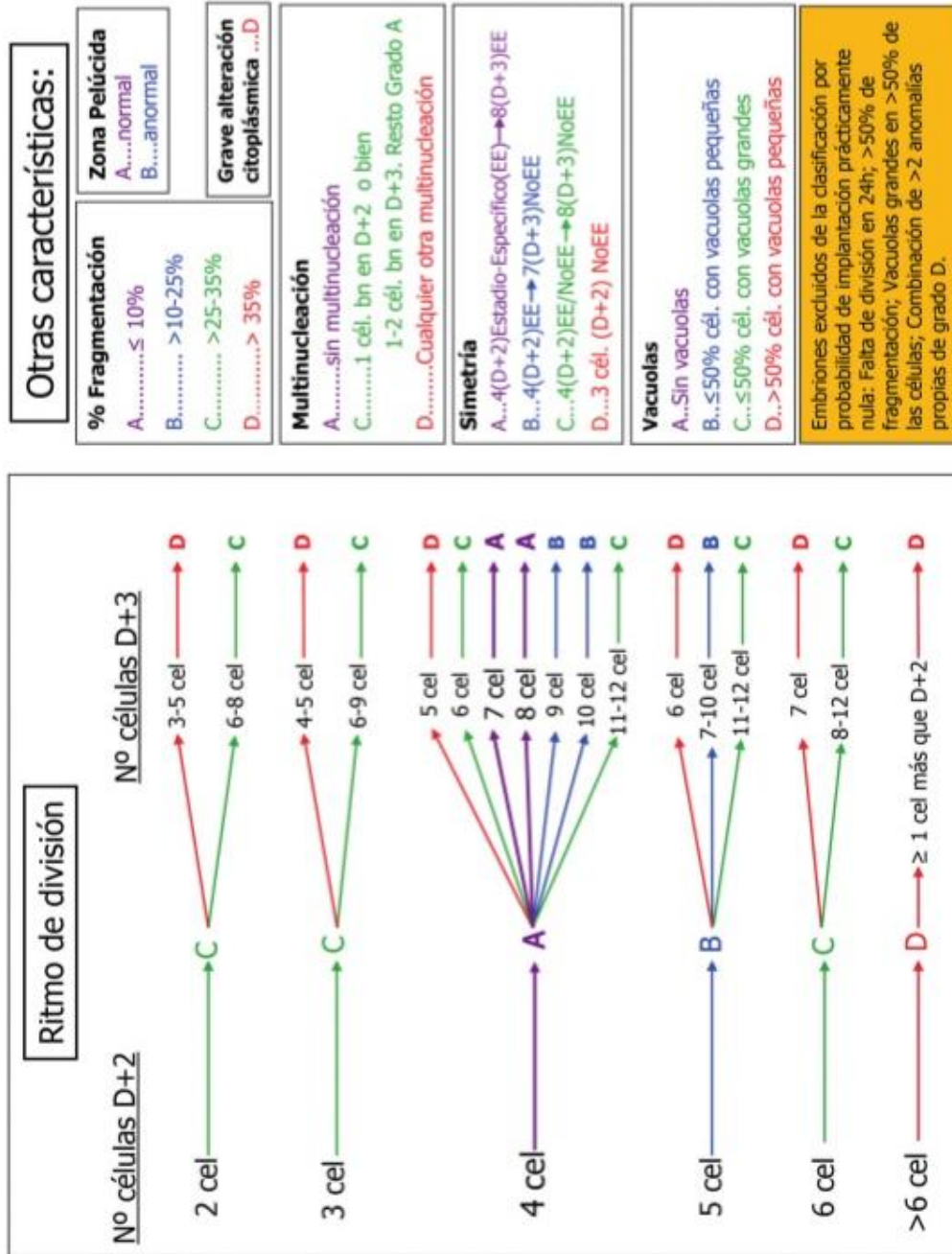


Ilustración 16. Categorización embrionaria propuesta por ASEBIR atendiendo al ritmo de división, el porcentaje de fragmentación, la multinucleación, la simetría celular, la presencia de vacuolas y la apariencia de la zona pelúcida y el citoplasma. (6)

## ANEXO 2

Tabla 1. Adaptada del artículo de Ciray et al. *“Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group”* (2014) (16).

Anotación	Definición de los eventos
t0	Tiempo en que se realiza el proceso de fecundación.
t2	Tiempo en que el embrión se divide a 2 células.
t3	Tiempo en que el embrión se divide a 3 células.
t4	Tiempo en que el embrión se divide a 4 células.
t5	Tiempo en que el embrión se divide a 5 células.
cc2	Duración del Segundo ciclo celular,
cc3	Tiempo que tarda el embrión en dividirse de tres a cinco células, $t_5 - t_3$
s2	Sincronía de las divisiones celulares $t_4$ y $t_3$