



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**MARCADORES MORFOCINÉTICOS PREDICTORES PARA LA FORMACIÓN
DE BLASTOCISTO.**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

PRESENTA:
DR CESAR REYNALDO CHAPA PINALES

TUTOR:
DR. JULIO CESAR ROSALES DE LEÓN
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

BIOL. GENARO GARCÍA VILLAFANA
JEFE DE LABORATORIO DE FERTILIZACIÓN IN-VITRO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

1.0 JUSTIFICACIÓN	4
2.0 MARCO TEÓRICO	6
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4.0 HIPÓTESIS.....	38
5.0 OBJETIVOS	39
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS	40
7.0 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	42
8.0 INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS	43
9.0 RESULTADOS	57
10.0 DISCUSIÓN	71
11.0 CONCLUSIONES	74
12.0 BIBLIOGRAFÍA.....	77
13.0 ANEXOS.....	81

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi esposa Elena y mis hijos por su paciencia y compensación, prefirieron sacrificar tu tiempo para que yo pudiera cumplir con el mio. Por su bondad y sacrificio me inspiran a ser mejor cada día, y ahora puedo decir que esta tesis lleva mucho de ustedes.

A **Dios**. . . Gracias por la salud y poner los medios para lograrlo.

A mis padres **Juan Reynaldo y Silvia**. . . quienes fueron los primeros en confiar en mi.

A mis **hermanos Grisel, Jhonny** y también a mi suegra por apoyarnos en el cuidar de mis hijos.

A las personas que se fueron en el caminar de estas etapas de mi vida, que fueron mis dos grandes ejemplos de vida y lucha para salir siempre adelante, siendo justo, honrado y con convicción, tu **abuela Herminia (Mina) y abuelo Francisco (Kiko)**, siempre estarán en mi corazón los amo. Y no menos importante a mi abuela que tengo en estos momentos **Esperanza (Pera)**, lo cual me llena de fuera y amor cada que puede.

A mis **Amigos** casi hermanos quienes aunque no entendían del todo mis jornadas siempre estuvieron dispuestos a sacarme una sonrisa.

Gracias a mis **Maestros** por sus enseñanzas. . . jamas olvidare sus consejos.

A mis **compañeros residentes** que juntos pasamos, sueño, sacrificios, alegrías, miedos, e incertidumbre de lo que vendrá.

1.0 JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la OMS la infertilidad tiene una incidencia cercana al 10% de las parejas en edad reproductiva. Esta cifra equivale a 80 millones de mujeres en el mundo, de las que más de 13 millones se encuentran en México y América latina.¹ La infertilidad es una enfermedad que crece a tasa constante y que provoca en las parejas un desgaste físico, económico y emocional muy importante. En México se registran 180.000 nuevos casos cada año, según datos del INEGI.²

Las técnicas de Fertilización in Vitro (FIV) han sido ampliamente utilizadas en las últimas décadas para el tratamiento de la infertilidad tanto masculina como femenina, y aunque el número de nacidos vivos se ha incrementado desde el nacimiento de la primera niña concebida por FIV en 1978, por ejemplo en Europa representa hoy en día entre 2-4% de los nacimientos anuales. Este porcentaje permanece relativamente bajo debido en gran medida a los fallos de implantación, ya que sólo dos de cada diez embriones lo logran¹.

A sí mismo, la incidencia de nacimientos gemelares en estas parejas es alta comparado con la población general. Un ejemplo es el Reino Unido, donde ésta alcanza el 10% para el año 2012 con las subsecuentes complicaciones clínicas tanto para la madre como para el recién nacido. Por tanto, uno de los principales objetivos actualmente en los laboratorios de FIV consiste en realizarla transferencia de solo un embrión, estrategia conocida como eSET (elective Single Embryo Transfer), sin que ésta afecte negativamente las tasas generales de gestación.³

No obstante, en la mayoría de los centros de Reproducción Humana Asistida la selección embrionaria se realiza teniendo en cuenta sólo los criterios morfológicos, los cuales son evaluados a través del microscopio con grandes

limitantes, la cual se puede encontrar la subjetividad debido a que depende directamente de la apreciación del embriólogo y por otra, el momento exacto en el que se lleva a cabo percibiéndose el desarrollo embrionario desde un punto de vista estático.⁴

Actualmente existe literatura reciente⁵, donde se hace alusión a la valoración morfocinética mediante la tecnología timelapse, con esta tecnología la cantidad de información en cuanto a los tiempos de división celular/morfología que se obtiene es mucho mayor y más objetiva y se pueden identificar eventos dinámicos irregulares, como reabsorción de fragmentos, divisiones anómalas o fallos en citocinesis^{6,7,8}.

Otros datos dinámicos que se pueden cuantificar por MTL son: formación y desaparición de los PN, tiempo exacto de cada división celular y duración de las diferentes citocinesis. De este modo, la evaluación embrionaria es más completa y puede mejorar las tasas de éxito de los ciclos de FIV.

Por lo anterior el presente estudio se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuáles marcadores embrionarios morfocinéticos, nos pueden predecir la formación de embriones en etapa de blastocisto?

Para poder establecer y comparar el ritmo de división embrionaria hacia blastocisto, en pacientes sometidas a tratamiento de reproducción asistida con la utilización de la tecnología timelapse y valorar el comportamiento morfocinético. También se desea determinar el perfil sociodemográfico y clínico relevante de las pacientes en estudio y evaluar los indicadores de estado y calidad clínica de las muestras utilizadas y las pacientes.

2.0 MARCO TEÓRICO

INTRODUCCION

Las técnicas de fertilización in Vitro (FIV) han sido ampliamente utilizadas en las últimas décadas para el tratamiento de la infertilidad tanto masculina como femenina y aunque desde el nacimiento de la primera niña concebida por FIV en 1978, el número de nacidos vivos se ha incrementado, por ejemplo en Europa representa hoy en día entre 2-4% de los nacimientos anuales, este porcentaje permanece relativamente bajo debido en gran medida a los fallos de implantación, ya que sólo dos de cada diez embriones lo logran así mismo, la incidencia de nacimientos gemelares en estas parejas es alta comparado con la población general⁹.

Por tanto, uno de los principales objetivos actualmente en los laboratorios de FIV consiste en realizar la transferencia solamente de un embrión, estrategia conocida como Eset (elective Single Embryo Transfer), sin que ésta afecte negativamente las tasas generales de estación. No obstante, en la mayoría de los centros de Reproducción Humana Asistida la selección embrionaria se realiza teniendo en cuenta sólo los criterios morfológicos evaluados a través del microscopio con las grandes limitantes que ésta lleva implícita por una parte, la subjetividad puesto que depende directamente de la apreciación del embriólogo y por otra, el momento exacto en el que se lleva a cabo percibiéndose el desarrollo embrionario desde un punto de vista estático.^{4,6}

TRATAMIENTOS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA Y LA MORFOLOGÍA EMBRIONARIA

La clasificación morfológica de los gametos y embriones ha sido empleada desde el comienzo de la FIV hasta la actualidad para definir el desarrollo embrionario y ha sido utilizada como herramienta para seleccionar el mejor embrión a transferir.^{10,11}

Aunque esta evaluación sirve como indicador general de la calidad en la mayoría de los laboratorios de reproducción asistida, no ha sido capaz de identificar el embrión con mayor competencia dentro de una cohorte, además la utilización de los diferentes sistemas de clasificación embrionaria por parte de los diferentes centros, dificulta la definición de las características con las que debe contar el embrión a transferir.

Por tal motivo se hace necesario la estandarización y validación de conceptos relacionados con la morfología del embrión, que a su vez facilitará la evaluación de los resultados de estas técnicas de una manera más eficiente. Es así, como en algunos países se han creado consensos nacionales como la Asociación de Embriólogos Clínicos (ACE) y la Sociedad Británica de Fertilidad (BFS) en el Reino Unido, así como la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR).

Ya que la morfología del embrión es actualmente el factor más importante para la predicción de la gestación, ASEBIR ha definido un sistema dinámico en el que se incluyen todas las etapas del desarrollo embrionario desde el gameto hasta el estadio de blastocisto. Este modelo ha sido evaluado en un ensayo multicéntrico en los laboratorios de FIV en España, que incluye 15 ciclos y fue presentado en el taller realizado en Estambul (Turquía) en el año 2010.

FERTILIZACIÓN Y VALORACIÓN DE CIGOTOS

Los parámetros morfológicos para la evaluación del cigoto son: la polarización, la presencia de un halo citoplasmático, el número de pronúcleos y

la aparición pronuclear. Se acordó que, dado que las características morfológicas están relacionadas con el tiempo después de la fertilización, la evaluación del cigoto debe realizarse dentro de un período de tiempo concreto después de la inseminación. Si el cigoto presenta un cuerpo polar y dos pronúcleos, debe descartarse, mientras que si presenta dos cuerpos polares pero un solo pronúcleo, es decisión del laboratorio si continúa o no con la evaluación de su desarrollo in vitro.¹²

ASPECTOS BÁSICOS DE LA FERTILIZACIÓN

La fertilización es un proceso complejo, que supone la unión de un ovocito y un espermatozoide para dar lugar a una nueva entidad genética. En condiciones naturales o tras realizar una fertilización in vitro (FIV) convencional, el espermatozoide capacitado atraviesa las células del cúmulo-corona y se une a la zona pelúcida del ovocito.¹² Esta unión desencadena la liberación del contenido del acrosoma del espermatozoide (reacción acrosómica), permitiendo que atraviese la zona pelúcida y se produzca la fusión entre la membrana del ovocito y el espermatozoide. La fusión entre ambas membranas provoca la activación del ovocito, lo que pone en marcha una serie de sucesos bioquímicos y físicos que dan lugar, por un lado, a la extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación del pronúcleo femenino y, por otro, a la descondensación de la cabeza del espermatozoide y posterior formación del pronúcleo masculino.¹²

En la mayoría de los casos aparece primero el pronúcleo masculino en posición central y, a continuación, lo hace el pronúcleo femenino cerca del segundo corpúsculo polar; es entonces cuando el pronúcleo femenino se acerca al masculino y ambos aumentan de tamaño. En su interior, se pueden distinguir los cuerpos precursores de nucléolos (CPN), los cuales se juntan y se dirigen hacia la zona de contacto de los dos pronúcleos. En la especie humana, el pronúcleo masculino tiene más CPN y es mayor que el femenino, aunque esto no siempre es fácil de apreciar.

Como se ha visto, el proceso de fertilización normal consta de una serie de sucesos que ocurren de una manera predefinida, aunque la cronología de dichos sucesos varía marcadamente entre ovocitos. Mediante grabaciones de vídeo con tecnología time-lapse, se ha observado que el segundo corpúsculo polar tarda como media en ser extruido alrededor de 2 horas y 39 minutos y que la aparición de los pronúcleos tras la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) ocurre entre 3 y 13 horas después de la microinyección. En el caso de la FIV convencional, este tiempo aumenta ligeramente, apareciendo los pronúcleos entre 8 y 14 horas después de la inseminación.

En la mayoría de los ovocitos, los dos pronúcleos juntos son visibles entre las 17 y las 20 horas posteriores a la inseminación, por lo tanto, se considerará que un ovocito está fecundado normalmente cuando, transcurrido este período de tiempo, se observe la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares. Los resultados obtenidos recientemente en los laboratorios de los centros del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) mediante el uso del Embryoscope® confirman estos datos, de forma que la media de aparición de los pronúcleos es de $9,3 \pm 2,3$ horas y la media de la desaparición de éstos, de $24,2 \pm 3,3$ horas.¹²

EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN TRAS FERTILIZACIÓN IN VITRO CONVENCIONAL

Se liberan los ovocitos de las células del cúmulo con ayuda de una pipeta de Pasteur estirada a la llama, o bien con un capilar Flexipet® de diámetro adecuado (140 µm). Se aspiran y se sueltan los ovocitos repetidamente a través de la pipeta, consiguiendo mediante una acción mecánica despojarlos por

completo de las células de la granulosa. Este paso se realiza en la misma gota de inseminación donde se encuentra cada ovocito.

Se lavan los ovocitos en la misma placa de inseminación, pasándolos por las tres gotas superiores de Fertilization Medium® (Cook Medical, Irlanda) o similar destinadas a tal fin.

Se evalúa con la lupa la presencia de dos pro-núcleos en el citoplasma del ovocito y dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino; ante cualquier duda (presencia de vacuolas, más de dos pronúcleos, etc.), se realiza dicha observación con el microscopio invertido a 400 aumentos.

Se trasladan los ovocitos fecundados correctamente a una placa de crecimiento preparada el día anterior (Cleavage Medium®, Cook Medical, Irlanda) y se deposita cada ovocito en una microgota. Previamente, cada ovocito se lava en las tres gotas de medio situadas en la parte superior de la placa.

Se clasifican los cigotos mediante observación a 400 aumentos con el microscopio invertido, equipado con óptica Hoffman®. Se evalúa el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos en las gotas de inseminación con el microscopio invertido a 200 y 400 aumentos.

EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN TRAS ICSI

Dado que los ovocitos ya han sido despojados de las células del cumulo, se puede proceder a valorar la fertilización directamente:

- Se identifican y clasifican los ovocitos correctamente fecundados con el microscopio invertido a 400 aumentos.
- Se trasladan estos ovocitos, uno a uno, a una placa de crecimiento preparada el día anterior, con cuidado de no confundir la numeración. De

esta manera, se asegura el seguimiento individual de cada uno de los ovocitos hasta el momento de la transferencia.

En ambos casos, una vez evaluada la fertilización, se dejan los cigotos en la placa de cultivo durante 24 horas a 37 °C y un 5 % de CO₂, intervalo durante el cual tendrán lugar las primeras divisiones embrionarias.

CLASIFICACIÓN DE LOS CIGOTOS

En los centros del IVI, la morfología pronuclear se utiliza como un criterio más que cabe tener en cuenta a la hora de elegir los embriones que se van a transferir, por eso, una vez identificados los ovocitos fecundados correctamente, es necesario evaluar cuidadosamente cada uno de los cigotos.

Los cigotos se clasificarán en distintos grupos según el tamaño pronuclear, los cuerpos precursores de nucléolos (CPN) y la presencia o ausencia de halo citoplasmático.

TAMAÑO Y POSICIÓN RELATIVA DE LOS PRONÚCLEOS

Se debe prestar especial atención al tamaño relativo de los pronúcleos, ya que los embriones procedentes de cigotos con distinto tamaño pro-nuclear (más de 4 pm de diferencia) han sido relacionados con una mayor tasa de bloqueo embrionario, una alta tasa de multinucleación en el segundo día de desarrollo y un mayor porcentaje de anomalías cromosómicas⁵⁻⁷. De esta forma, los embriones se clasifican en: **(figura 1)**

- **Grupo A:** pronúcleos de igual tamaño.
- **Grupo B:** pronúcleos de diferente tamaño.



Figura 1. Representación de cuerpos polares y pronúcleos.

En el protocolo de fertilización, también debe quedar reflejado si los pronúcleos presentan un tamaño mucho más grande o más pequeño de lo habitual, así como la presencia de un contorno difuso o poco definido.

CUERPOS PRECURSORES DE NUCLEÓLOS

Existen cuatro grupos en función del número de CPN, distribución (polarizados o dispersos) y sincronía de éstos (los CPN se distribuyen de distinta manera en los dos pro-núcleos):(Figura 2)

- **Grupo I:** de tres a siete CPN polarizados y sincrónicos, y con tres o menos de tres CPN de diferencia entre los dos pronúcleos.
- **Grupo II:** de siete a diez CPN dispersos y sincrónicos.
- **Grupo III:** alguno de los dos pronúcleos, o ambos, tiene únicamente uno o dos CPN.
- **Grupo IV:** cualquier otra combinación; por ejemplo: más de siete CPN polarizados o menos de siete sin polarizar, polarización asincrónica (un pronúcleo polarizado y el otro no), más de tres CPN de diferencia entre los dos pronúcleos, etc.

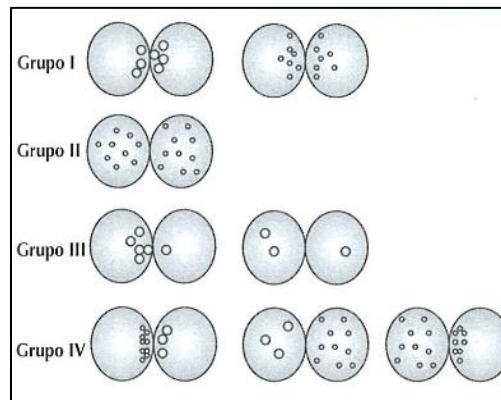


Figura 2. Representación esquemática de los cuatro grupos de cigotos en función al número y distribución de cuerpos

HALO CITOPLASMÁTICO

El halo citoplasmático es una zona cortical más clara que aparece en la mayoría de los ovocitos tras el proceso de la fertilización. Se sabe que este halo se produce durante el crecimiento pronuclear y parece estar asociado, principalmente, a una redistribución mitocondrial.

En recientes estudios realizados con cigotos humanos, se ha demostrado la relación existente entre distintos patrones pronucleares, el potencial de desarrollo hasta el estadio de blastocisto y la tasa de implantación, siendo la sincronía nucleolar (grupos I y II) y la presencia de un halo citoplasmático los patrones de mejor pronóstico. Según un análisis preliminar de los datos obtenidos por los autores, los cigotos con pronúcleos bien definidos, un tamaño pronuclear similar, halo citoplasmático positivo y un patrón de CPN distinto del tipo III (uno o dos CPN en alguno de los dos pronúcleos) dan lugar a mejores embriones en el segundo y tercer días de desarrollo y a una mayor tasa de formación de blastocistos. También encuentran diferencias estadísticamente significativas al estudiar transferencias puras del mismo tipo de cigotos con respecto al porcentaje de gestaciones evolutivas, siendo mayor en cigotos con tamaño pronuclear similar y con halo citoplasmático.¹²

Otros aspectos que cabe valorar de las características morfológicas de los cigotos son la apariencia del citoplasma, la presencia de vacuolas, cuerpos refringentes, etc..

FERTILIZACIÓN ANÓMALA

CIGOTOS CON UN SOLO PRONÚCLEO

La extrusión del segundo corpúsculo polar y la formación simultánea de un solo pronúcleo ocurre en el 2-5 % de los ovocitos humanos después de la FIV. Algunos de estos cigotos se dividen con apariencia de embriones normales y, en el 48-80 % de los casos, estos cigotos son diploides, aunque esta diploidía no se debe necesariamente a que haya ocurrido fertilización."El estado diploide de estos embriones con un solo pronúcleo puede ser generado por activación partenogenética, en caso de no haber ocurrido fertilización, o por asincronía en la aparición de los pronúcleos, en caso de que sí haya acontecido el proceso de la fertilización."

La fertilización verdadera puede distinguirse de la activación partenogenética identificando la presencia del cromosoma Y el análisis mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) del contenido genético de embriones unipronucleares procedentes de FIV reveló que la mayoría de ellos habían sido fecundados." En teoría, estos embriones podrían transferirse, ya que existe constancia de nacidos vivos tras la transferencia de embriones con un único pronúcleo." No obstante, dado que no existe un método práctico que permita diferenciar los embriones fecundados de los activados, en los centros del IVI, se prefiere no transferir cigotos unipronucleares.

Tras la ICSI, la incidencia de cigotos con un solo pronúcleo es ligeramente mayor (4-7 %) que tras FIV convencional. En estos casos, sólo el 9.5 % de los ovocitos posee una dotación genética diploide," siendo la mayoría de ellos consecuencia de la activación partenogenética del ovocito, la cual

resulta favorecida por el tratamiento con hialuronidasa durante la decumulación y por el mismo proceso de microinyección. Estos cigotos pueden dividirse normalmente, pero también deberán descartarse para la transferencia debido a su contenido cromosómico anormal.

CIGOTOS CON TRES O MÁS PRONÚCLEOS

La presencia tras FIV convencional de dos corpúsculos polares y tres pronúcleos es la anomalía de la fertilización más frecuente en la especie humana. En estos casos es probable que el ovocito haya sido fecundado por dos espermatozoides (cigotos dispérmicos) y, aunque estos cigotos tienden a dividirse dando lugar a embriones morfológicamente normales, mediante técnicas de FISH, se ha observado que, en su mayoría, son mosaicos y sólo muy pocos son verdaderos triploides. Los valores aceptables de poliploidía tras tratamientos de FIV son de menos del 10 %. Los valores superiores serán indicativos de fallos en los métodos de inseminación.¹²

Tras la ICSI, también es posible encontrar con tres pronúcleos y un solo corpúsculo polar; esto ocurre en aproximadamente un 4 % de los casos. En ellos, la aparición del tercer pronúcleo no se debe a la polipenetración, ya que únicamente se microinyecta un espermatozoide por ovocito, sino que puede explicarse por la ausencia de extrusión del segundo corpúsculo polar, lo que da lugar a cigotos monospérmicos digínicos. Estos cigotos son en su mayoría triploides perfectos y la extracción mediante técnicas de micromanipulación del pronúcleo cercano al corpúsculo polar puede restablecer la diploidía en estos cigotos anormales. En la actualidad, hay casos de niños nacidos mediante técnicas de diploidización, pero siguen siendo técnicas experimentales que no se aplican a la rutina del laboratorio de FIV.

En otras ocasiones, se identifican tres o más pronúcleos de tamaño inferior al normal; este hecho se justifica por los defectos degenerativos del

ovocitos secundarios al cultivo in vitro, que provocan la fragmentación de los cromosomas, de forma que éstos se dispersan en pequeños núcleos formando varios micronúcleos. En cualquier caso, todos ellos poseen dotaciones cromosómicas anómalas y no deben ser transferidos.

FALLOS DE FERTILIZACIÓN

Si tras las 17-20 horas posteriores a la inseminación no se observan los pronúcleos, se puede considerar que el ovocito no ha sido fecundado.

CRITERIOS DE SELECCIÓN EMBRIONARIA

En base a las características embrionarias que se tienen en cuenta para clasificar los embriones en el laboratorio en su tercer día de desarrollo y poder tomar una decisión sobre su destino. Los embriones pueden clasificarse según su potencial implantacional en:¹²

Embriones óptimos: Son los que tienen un desarrollo correcto y ninguna característica de mal pronóstico. Estos embriones serán siempre transferidos o criopreservados. También se hace referencia a ellos como embriones de buena calidad. En pacientes de buen pronóstico (mujeres menores de 36 años y ninguna enfermedad adversa o en receptoras de ovocitos), estos embriones suelen tener un 50 % o más de posibilidades de implantarse. Lo habitual es que este grupo de embriones tenga una tasa de implantación de un 25 % o más.

Embriones subóptimos: Son los embriones que presentan una serie de características que, si bien están asociadas a una menor viabilidad, no los hacen completamente descartables. Se transferirán si no se cuenta con otro de mejores características morfológicas. De la misma manera, se procederá a criopreservarlos si existen otros embriones óptimos en la misma cohorte que van

a ser criopreservados. Si no es así, se pueden dejar en observación hasta su quinto día de desarrollo (D5) y criopreservarlos si alcanzan el estadio de blastocisto de manera correcta. También se hace referencia a ellos como embriones acompañantes. Estos embriones suelen tener algo menos de la mitad de posibilidades de implantarse (hasta un 20 %), aunque siempre dependerá del tipo y extensión de las anomalías morfológicas que presenten.

Embriones no viables: Son los que serán descartados completamente. Éstos se conocen también como anormales. Incluyen tanto los embriones evolutivos in vitro cuyas características están relacionadas con una falta de potencial implantacional como los que están bloqueados. Obviamente, esta clasificación es subjetiva y, para catalogar un embrión como anormal, se debe contrastar con la experiencia de cada laboratorio, pero se estima su potencial implantacional en menos del 1 %.

EVALUACIÓN EMBRIONARIA

La Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) ha publicado unos criterios de valoración de embriones tempranos. En estos criterios, se clasifican los embriones en cuatro tipos A, B, C y D según sus características morfológicas. Los dos primeros grupos podrían corresponderse de forma general a los embriones óptimos de la clasificación empleada por los autores. El grupo C correspondería a los embriones subóptimos y el grupo D englobaría a los embriones subóptimos y no viables.

- Los embriones se observan en un microscopio invertido a 600 aumentos.
- La selección embrionaria debe ser dinámica. Los embriones no son estáticos y varían a lo largo del tiempo que están en cultivo.
- Los embriones de D2 deben evaluarse a las 42 ± 1 horas tras la inseminación o la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

- Los embriones de D3 deben evaluarse a las 66 ± 1 horas tras la inseminación o la ICSI.

Dentro de la evaluación embrionaria se debe valorar los siguientes aspectos:

- Número de células
- Velocidad de división y bloqueo embrionario
- Tamaño celular y simetría
- Aspecto del citoplasma
- Contacto intercelular y compactación
- Zona pelúcida
- Multinucleación
- Fragmentación, cantidad y distribución

VALORACIÓN Y CLASIFICACIÓN DEL BLASTOCISTO¹³

Una opción para realizar la transferencia es efectuarla cuando el embrión ha alcanzado el estadio de blastocisto, es decir, entre el quinto y sexto días de desarrollo embrionario. Esto permite:¹³

- Obtener embriones con mayor capacidad de implantación.
- Tener una mejor sincronía entre el embrión y el endometrio, ya que fisiológicamente el embrión se encuentra en la trompa de Falopio en los primeros estadios y es en el estadio de mórula cuando pasa al útero.
- Analizar la viabilidad embrionaria antes de realizar la transferencia, puesto que aproximadamente la mitad de los embriones se bloquean en el laboratorio, lo que permite seleccionar los embriones viables.¹³

EL BLASTOCISTO

Después de la compactación celular, en la que las células pierden su identidad celular, empieza a formarse una cavidad denominada blastocele y se produce la diferenciación celular. Esta nueva disposición morfológica del embrión recibe el nombre de blastocisto.¹²

Dentro del estadio de blastocisto, pueden diferenciarse cinco tipos:

- **Blastocisto temprano:** comienza a formarse la cavidad y empieza la diferenciación celular
- **Blastocisto cavitado:** el blastocele ocupa más del 50 % del volumen del embrión.
- **Blastocisto expandido:** se observa el blastocele rodeado por una monocapa celular o trofoectodermo, que formará la placenta, y una masa celular interna, que dará lugar al embrión.

Con la expansión del embrión, se produce un aumento del volumen y una disminución del grosor de la zona pelúcida.¹²

- **Blastocisto eclosionando o hatching:** el blastocisto comienza a salir a través de la zona pelúcida." En este tipo, se puede diferenciar entre blastocisto eclosionando (cuando empieza la eclosión) y blastocisto eclosionando en 8 (cuando la mitad del blastocisto está fuera de la zona pelúcida).
- **Blastocisto eclosionado o hatched:** el blastocisto está completamente fuera de la zona pelúcida. Se observa la zona pe-lúcida vacía, aunque, en algunas ocasiones, es posible observar dentro fragmentos e, incluso, células que no compactaron y quedaron como células independientes en el espacio perivitelino.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar la eclosión:

- Mecánico
- Químico

Además del estadio del blastocisto, también se clasificará el tipo de masa celular interna (MCI) y el trofoectodermo (Tf).

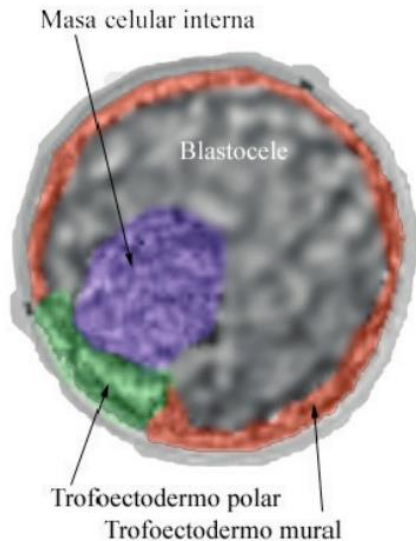


Figura 3. Blastocisto, blastocelo, masa celular interna, trofoectodermo.

Masa celular interna

Se clasifica por el número de células que se observa. Se diferencian cuatro tipos:

- **A:** compacta, con muchas células, redonda y bien definida.
- **B:** varias células agrupadas y de aspecto laxo.
- **C:** muy pocas células.
- **D:** ausente o degenerada.

Trofoectodermo

También se clasifica según el número de células que se observan. Se diferencian cuatro tipos:

- **A:** completo, formado por muchas células.
- **B:** incompleto, presenta alguna zona lineal.
- **C:** formado por pocas células.
- **D:** con células degeneradas.

De esta forma, el blastocisto quedará clasificado por tres características:

- Según su evolución.
- Según el tipo de MCI.
- Según el tipo de trofoectodermo.

NUEVAS TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DEL DESARROLLO EMBRIONARIO EVALUACIÓN DE PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS POR TIME LAPSE CICLO CELULAR Y MONITOREO TIME-LAPSE

Un ciclo celular consiste en una serie de eventos complejos que implican procesos celulares y nucleares a través de fases particulares que aseguran la división de las células en dos células hijas. La mitosis consiste en la división nuclear, la citocinesis y la secuencia de varias fases: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Estas fases son precedidas por la interfase que comprende las etapas GAP-1 (G1), síntesis de (S) y GAP-2 (G2) de lo que se conoce como el ciclo celular. La duración de los ciclos celulares en el embrión humano preimplantatorio parece estar en relación con la viabilidad embrionaria.¹ Los ciclos celulares prolongados o rápidos podrían estar asociados con la reparación del ADN, reordenamientos celulares, o el fracaso de un embrión al someterse a los puntos de control del ciclo celular. Ambos ciclos comprometen potencialmente desarrollo embrionario.¹⁴

El primer ciclo celular posterior a la fertilización, recientemente se describe de forma detallada en un estudio de Time-lapse por Aguilar y colaboradores. En su estudio, se describe la iniciación de la primera división celular al finalizar la segunda extrusión del cuerpo polar. La duración de la fase S (replicación del ADN) se definió como la duración de tiempo que tarda la desaparición de los dos pronúcleos. En este estudio, los embriones con la fase S prolongada demostraron tasas de implantación significativamente menores en comparación con los embriones con fases S en el rango de 5.7 a 13.8 horas. La finalización de la primera división celular puede ser definida como el tiempo en que el embrión alcanza el estadio de dos células.⁶

Las divisiones postinterfase correspondientes a blastomeras hermanas rara vez se producen al mismo tiempo, así que los usuarios de time-lapse pueden considerar la sincronización de las divisiones celulares dentro de un ciclo de mitosis, particularmente algunos de estos parámetros de sincronización se correlaciona con la viabilidad embrionaria. El valor óptimo reportado es menos de 0.76 horas.¹⁵

Esto se puede calcular por la sincronía de las divisiones celulares hermanas. Por ejemplo, la sincronía del segundo ciclo celular podría ser definido como la duración de la transición de un embrión de dos células a uno de cuatro células y se calcula restando el tiempo que el embrión alcanza el estadio de tres células (t_3) desde el momento en que llegó a la etapa de cuatro células (t_4). Con las imágenes continuas por time-lapse (por ejemplo, cada minuto), la duración de cada citocinesis es medida desde el momento en que se detecta la segmentación o división.⁵

La duración del ciclo celular se calcula utilizando las anotaciones del time-lapse, ya sea de acuerdo a una sola división celular o como un ciclo de la mitosis con lo que el número de blastómeras se duplica. Para el primer ciclo celular, el desarrollo comienza con una célula individual, estas son las mismas. Sin embargo, el segundo ciclo celular comienza con dos células, ambos de los cuales debe dividir posteriormente, formando dos células hijas cada uno. Por lo tanto, hay dos ciclos individuales de células (blastomeras), pero un ciclo celular de un solo embrión, y esto da lugar a la duplicación de dos a cuatro células.⁵

TECNOLOGÍA TIME-LAPSE

Se han diseñado diferentes sistemas de cinematografía ⁷:

1. El incubador se construye alrededor del microscopio (Tokay-hit, Japón).

- Utilizado más para investigación, debido a su calidad de imagen, flexibilidad y diferentes posibilidades de medir parámetros. Sin embargo, no es adecuado para uso clínico debido a las condiciones sub-óptimas de cultivo.
2. El microscopio se inserta en un incubador. Mantienen las condiciones de cultivo óptimas.
 - **Prymo-visionTM** (Cryoinnovations, Vitrolife).
 - **Eeva** (Auxogyn). Mediante imagen de campo oscuro captura las imágenes para analizar cuantitativamente la información del potencial de desarrollo del embrión de D+2, y seleccionar directamente los embriones de mejor pronóstico, basándose en los trabajos de Wong⁸.
 3. Un solo instrumento incorpora todas las aplicaciones (incubador+sistema de imágenes).
 - **Biostation-Nikon** (Japón): muy útil para avanzados proyectos de investigación, puesto que cuenta con numerosas opciones de imagen, incluso imágenes fluorescentes.
 - **Embryoscope TM** (Unisense Fertilitech, Dinamarca): Designado para uso clínico. Tiene capacidad para adquirir datos de hasta 72 embriones al mismo tiempo, y utiliza un software de análisis de imagen en el que todos los eventos embrionarios considerados se pueden interpretar fácilmente.

LIMITACIONES DEL TIME-LAPSE

1. Limitaciones técnicas: los embriones se pueden mover a lo largo del cultivo y pueden generarse burbujas de aire que hagan que se pierda la imagen durante algún tiempo.

2. Limitaciones metodológicas: Se considera tiempo cero (t_0) a la media del tiempo en la que se ha realizado el ICSI, y no el momento exacto en el que se microinyecta cada ovocito. Además, los intervalos de toma de imágenes oscilan entre 5 a 20 minutos, por lo que los tiempos de división no son absolutos, sino que se engloban en un rango.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que la cinética embrionaria varíe en función del tipo de medio de cultivo empleado¹⁶. Sin embargo, hay artículos que no encuentran diferencias^{15,16}. Otros factores que pueden variar los resultados son: el cultivo de embriones a bajas concentraciones de Oxígeno (O_2), la técnica de fertilización empleada, el día en el que se realiza la transferencia, etc¹⁷. Hay que destacar que las variables cinéticas que más oscilan son los tiempos de división celular, no los intervalos que duran las citocinesis.

PARÁMETROS CINÉTICOS TEMPRANOS DE VIABILIDAD EMBRIONARIA

Los parámetros cinéticos hacen que la selección embrionaria sea mucho más potente, puesto que dos embriones de 4 células en un mismo ciclo, que pueden parecer semejantes en una observación convencional, son sustancialmente diferentes en una evaluación dinámica, dependiendo de cómo y cuándo han sido sus divisiones celulares.¹⁸

Desarrollando los parámetros cinéticos identificados por time-lapse como predictores de desarrollo embrionario e implantación, podemos encontrar:

OVOCITO A CIGOTO

El primer trabajo publicado con time-lapse reflejó que embriones de buena calidad parecían proceder de ovocitos con tiempo uniforme desde el ICSI a la desaparición de pronúcleos (PN), y tendían a exhibir ondas citoplasmáticas con periodicidad ligeramente más larga¹⁹. Estudios posteriores de MTL evaluando la aparición, singamia y desaparición de los PN no encuentran

diferencias entre embriones que implantan y aquellos que no lo hacen^{20,21}. Sin embargo, los resultados obtenidos por Azzarello sí muestran que el tiempo de desaparición de los PN es significativamente mayor en aquellos embriones que resultan en un niño nacido (24.9 vs 23.3 h) y que la desaparición de los mismos antes de 20.45 h implica no implantación o aborto²². En este sentido, otros autores han encontrado que la capacidad de implantación disminuye en aquellos cigotos en los que los PN desaparecen antes de 22.2 h o después de 25.9h tras ICSI, así como cuando ocurre una rápida extrusión del 2º Corpúsculo Polar (CP) (1-3.2h)⁶.

En cuanto al patrón de nucléolos y PN, los autores sugieren evaluarlo justo antes de que desaparezcan, al ser un proceso dinámico. También parece que una asincronía en el tiempo de desaparición de los PN puede afectar al desarrollo embrionario. Sin embargo, ningún artículo refleja relación entre patrón de PN e implantación. Parece ser por tanto que las variables dinámicas propias de estos estadios no tienen gran poder de predicción de implantación, aunque patrones demasiado rápidos o demasiado lentos en la desaparición de PN podrían considerarse como factores negativos.

PRIMERA DIVISIÓN MITÓTICA O DIVISIÓN TEMPRANA

Con las técnicas de time-lapse se ha correlacionado la División Temprana (DT) positiva (primera división mitótica entre 25-27 h post microinyección) con un mayor número de células en D+2 (4 ó más), así como con mejores tasas de implantación si la aparición de los núcleos del embrión de 2 células es sincrónica²³. Uno de los nuevos parámetros aparecidos con MTL es la duración de la primera división mitótica⁸; es decir, el tiempo que transcurre desde el inicio del surco de división del cigoto hasta la escisión completa de las 2 células.

Se ha relacionado positivamente con la formación de blastocisto, pero no

con la implantación²¹. Sin embargo, en muchas ocasiones no se puede medir correctamente, debido a que los intervalos de tiempo en los que se toman las imágenes para time-lapse suelen ser de unos 15-20 minutos, y este proceso dura escasamente 30 minutos. Al igual que la desaparición temprana de PN, parece ser que cuando el cigoto se divide a 2 células antes de 24,3 h, presenta menores tasas de implantación²⁴.

ESTADIOS TEMPRANOS DE DIVISION: D+2 Y D+3

Con los sistemas time-lapse se abre un nuevo método de evaluación de los embriones, porque se puede medir cuándo ocurren las diferentes divisiones y cuánto duran los ciclos celulares.

TIEMPOS DE DIVISIÓN

Sabemos que determinados estadios a tiempos concretos tienen mejores tasas de formación de blastocisto e implantación, pero ahora podemos conocer el momento en el que se ha de producir cada división embrionaria. Analizando un total de 9530 embriones de ciclos de ICSI, Herrero y colaboradores midieron los tiempos medios en los que los embriones se dividen a 2, 3, 4, 5, 8 células (t₂, t₃, t₄, t₅, t₈), así como t_M (tiempo de observación de Mórula) y t_B (tiempo de observación de blastocisto) y los relacionaron con división a 8 células, formación de blastocisto e implantación. Observaron que durante las primeras divisiones (t₂, t₃, t₄) la mayoría de los embriones se dividen en un rango estrecho de tiempo, mientras que en las mitosis posteriores (t₅, t₆, t₇, t₈) hay una mayor dispersión de datos, probablemente debido a la presencia de embriones de diferente calidad y al comienzo del imprinting genómico. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

Variable	Media de observación time-lapse (embriones sin división directa)	Media de observación time-lapse (implantación)	Tiempos de observación recomendados (ALPHA-ESHRE)
t2	26.4	25.8	26 ± 1
t4	39.7	38.6	44 ± 1
t8	58.7	57.1	68 ± 1
tM	89.3	85.1	92 ± 2
tB	104.1	102.0	116 ± 2

Tabla 1. Comparación de las medias entre división embrionaria e implantación con respecto al consenso de evaluación embrionaria ALPHA-ESHRE. Horas psst-ICSI. Herrero. Morphokinetic characteristics of embryo. Fertility and sterility 2013.

Varios trabajos han relacionado los tiempos de división tempranos con la formación de blastocisto en general y/o con la tasa de blastocisto de buena calidad, encontrando que un desarrollo rápido favorece el desarrollo óptimo a D+5^{20,25,26,27}. Parece ser que la división lenta en estadios tempranos compromete más el desarrollo hasta D+3, mientras que tiempos demasiado rápidos a 8 células favorecen el bloqueo embrionario posterior. Los autores concluyen por tanto que parámetros tempranos (t2, t3, t4) están relacionados con el desarrollo hasta D+3, y se necesitan además t5 y t8 para predecir la formación de blastocisto²⁷. Otros autores concluyen que embriones que se bloquean en estadios avanzados de desarrollo se dividen hasta 6 células con una cinética similar a embriones que se desarrollan a blastocisto, pero se produce un retraso significativo en t8¹⁸. De todos modos, todavía no se ha encontrado un modelo reproducible y con elevados porcentajes de sensibilidad y especificidad que, teniendo en cuenta los tiempos de división de eventos tempranos de desarrollo embrionario, prediga la formación de blastocisto.

Las divisiones celulares son todavía más rápidas cuando se relacionan con implantación^{18,25,27}. Se puede decir por tanto, que la capacidad del embrión de alcanzar el estadio de blastocisto, expandirse e implantar está asociada a

cada vez menores tiempos de división durante los primeros ciclos de mitosis, como se muestra en el. Estos autores concluyen que las divisiones de 2 a 8 células ocurren progresivamente antes que los tiempos de observación consensuados por la comunidad científica, y recomiendan revisarlos. El tiempo de división t_5 se ha postulado como un parámetro dinámico fundamental para predecir implantación²⁴. Sin embargo, otros artículos no encuentran diferencias^{20,21}.

INTERVALOS DE DIVISIÓN Y SINCRONÍA CELULAR

Otro parámetro dinámico que se ha estudiado es el tiempo que dura cada división mitótica, especialmente el intervalo entre 2-3 células, 3-4, 4-5 y 5-8. A lo largo de la división embrionaria temprana, se pueden definir dos tipos de ciclos: el que corresponde a un ciclo celular de división, como $cc_2=t_3-t_2$ y $cc_3=t_5-t_3$; y los ciclos que reflejan la sincronía entre células, como transición de 2 a 4 células ($s_2= t_4-t_3$) o de 4 a 8 ($s_3=t_8-t_5$). **Figura 4.**

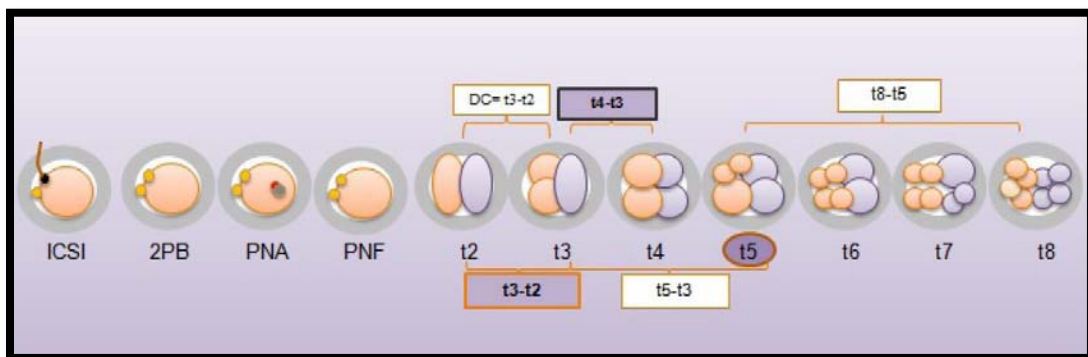


Figura 4. Nomenclatura propuesta para marcadores morfocinéticos en el desarrollo embrionario en humanos. (Castello, 2017)

La duración de cc_2 (t_3-t_2) es ligeramente menor (11.6h) que la de cc_3 (t_5-t_3) (13.6h). Sin embargo, s_2 (t_4-t_3) es mucho más corta (0.75h) que s_3 (t_8-t_5) (7.02h) (Herrero et al., 2013). Los autores atribuyen este hecho a las posibles

diferencias acumuladas en la duración de los ciclos celulares entre embriones, o al resultado de las diferencias en términos de competencia de gametos que pueden influir en los mecanismos de control del ciclo celular y en los genes responsables de la citocinesis⁸.

Los eventos dinámicos de las primeras 48 horas de cultivo correlacionados positivamente con la formación de blastocisto son **cc2 y s2**^{28,21,29,8}. Otros artículos incluyen parámetros medidos en D+3, como **s3 (t8-t5)** para ajustar aún más la predicción tanto de blastocisto como de blastocisto de buena calidad^{20,5,25,26}. De hecho, el uso de Eeva en combinación con la clasificación morfológica clásica en D+3 aumenta hasta en un 38% la habilidad de identificar embriones que se van a desarrollar de forma óptima a D+5³⁰, disminuyendo además la variabilidad intraobservador.

En cuanto a parámetros relacionados con implantación medidos por time-lapse, los resultados son más controvertidos. Parece ser que marcadores dinámicos de formación de blastocisto difieren de los que predicen implantación, puesto que también la duración de los ciclos de división se va reduciendo en aquellos embriones con mayor capacidad de implantar^{18,26,27}. Las variables **cc2, s2 y cc3** se correlacionan positivamente con implantación^{20,24}, aunque otros autores no encuentran diferencias en ningún parámetro dinámico observado^{25,21}.

MODELOS PREDICTIVOS DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTO E IMPLANTACIÓN

Dos trabajos fundamentales se han publicado como modelos de predicción de formación de blastocisto e implantación, en función de los eventos dinámicos de división de embriones tempranos: los de Wong en 2010⁸ y Meseguer en 2011²⁴.

En 2010, Wong y colaboradores estudian 242 cigotos descongelados de FIV combinando MTL y tecnologías de expresión génica⁸. Un 39% de los 100 embriones cultivados a D+5-6, alcanzan el estadio de blastocisto. En cuanto a los registros cinéticos, encuentran 3 parámetros que son fundamentales para el desarrollo embrionario completo:

Parámetro 1: duración de la primera citocinesis: 14.3 ± 6.0 min.

Parámetro 2: tiempo entre primera y segunda mitosis ($cc2=t3-t2$): 11.1 ± 2.2 h.

Parámetro 3: sincronía entre segunda y tercera mitosis ($s2=t4-t3$): 1.0 ± 1.6 h.

En función de estos datos, establecen un **algoritmo de predicción de formación de blastocisto** que presenta una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93%, de manera que todos los embriones cuyos tiempos de división entran dentro de los valores: 0-33 min para el **parámetro 1**, 7.8-14.3h para el **parámetro 2** y 0-5.8 h para el **parámetro 3** alcanzan el estadio de blastocisto. Los embriones bloqueados presentan patrones de citocinesis aberrantes, necesitan más tiempo para completar las divisiones celulares y los procesos de reabsorción de fragmentos raramente se producen. Además, cuando el desarrollo se detiene antes de 8 células, el perfil de expresión génica es anómalo, lo que indica problemas en la reserva materna de mRNA, y apoya la teoría de estos autores de que el destino de los embriones puede ser predeterminado en el desarrollo temprano. Este modelo no se puede aplicar a resultados de implantación, puesto que en el trabajo los blastocistos resultantes no se transfieren. Tampoco hacen referencia los autores a ninguna clasificación de la calidad embrionaria en D+5. Otros estudios también encuentran al menos una variable similar para predecir la formación de blastocisto^{7,18,26,21}.

Los parámetros morfocinéticos muestran una gran simetría y pequeña dispersión en el grupo de embriones que llegan a D+5²⁹. Para estos autores, la utilización de $t2$, $t5$ y $cc2$ en un score combinado predice la formación de blastocisto hasta en un 90% (AUC=0.806 (95% C.I.:0.747-0.864). Sin embargo, al

igual que Wong, no diferencia entre buena o mala calidad embrionaria. Cetinkaya y colaboradores sí estudian la formación de blastocisto de buena calidad, y encuentran que el mejor valor predictivo en D+3 es la sincronía entre t2-t8, alcanzando un 80% de éxito ³¹.

En 2011, Meseguer y colaboradores²⁴ desarrollan un **algoritmo predictivo de implantación** para transferencias de D+3 en ciclos de pacientes de ovocitos propios, analizando un total de 247 embriones transferidos con implantación conocida. **Figura 5.** El algoritmo de estos autores se basa en una **primera selección morfológica** de los embriones. Aquellos no viables se clasifican como **F**. La clasificación **E** corresponde a los que presentan asimetría severa en el estadio de 2 células, división directa de cigoto a 3 células, y/o multinucleación en el estadio de 4 células.

Después de estos dos procesos se aplican los 3 criterios dinámicos que según estos autores son predictivos de implantación:

Parámetro 1: tiempo de división a 5 células (t5): 48.8-56.6h

Parámetro 2: tiempo entre primera y segunda mitosis (cc2=t3-t2): ≤11.9h.

Parámetro 3: sincronía entre segunda y tercera mitosis (s2=t4-t3): ≤0.76

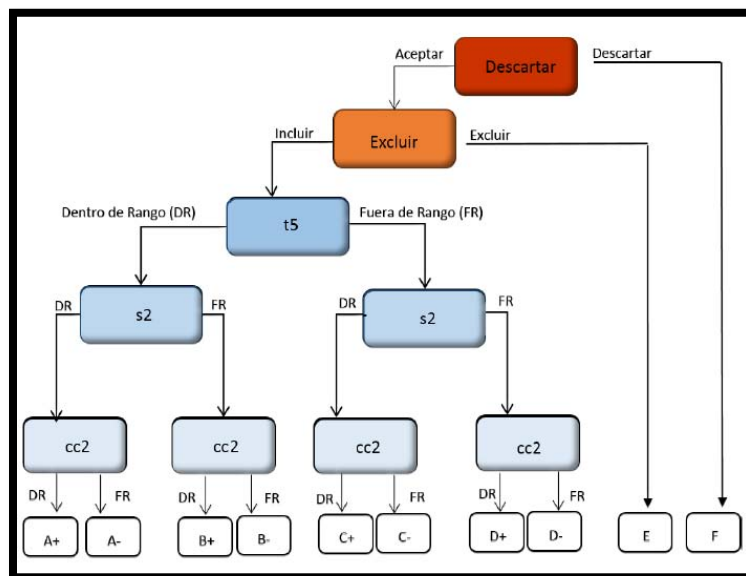


Figura 5. Clasificación gerárquica de embriones (Meseguer 2011)

Aplicando los 3 parámetros predictivos de implantación a la formación de blastocisto, se confirma que en los intervalos óptimos establecidos para t5, cc2 y s2 hay mayor proporción de blastocistos y de blastocistos de buena calidad que fuera de ellos²⁸. Se concluye también en este estudio que los tiempos de desarrollo se acortan a medida que mejora la calidad embrionaria.

Este mismo grupo comprobó que la tasa de gestación clínica en curso mejora un 16.9% por transferencia en los ciclos que utilizan la selección morfocinética, frente a la valoración morfológica de los incubadores tradicionales²⁸. Los datos reflejan el incremento de los resultados clínicos como consecuencia de una mayor estabilidad en las condiciones de cultivo, así como de la implementación de un sistema de selección embrionaria en D+2 y D+3 más efectivo.

ANEUPLOIDÍAS Y ANÁLISIS MORFOCINÉTICO

Hay varios artículos que utilizan MTL para intentar seleccionar embriones cromosómicamente normales. Parece ser que solamente un 30% de embriones aneuploides se encuentran dentro de los valores de división óptimos hasta el estadio de 4 células³². El resto se caracterizan por una gran variabilidad en los ciclos celulares, presentando además mayor incidencia de fragmentos que contienen material genético y que pueden persistir o reabsorberse a lo largo del desarrollo embrionario. Variaciones en el tiempo de desaparición de PN, t2, t5, CC2, CC3 y t5-t2 reflejan anomalías cromosómicas^{15,5}. Otros estudios no encuentran diferencias en estadios tempranos, pero sí en el inicio de compactación, blastulación y tiempo de expansión del blastocisto, que es más lento en embriones genéticamente incorrectos.⁵

No obstante, otros artículos no hallan este valor predictivo de aneuploidías en los eventos dinámicos de desarrollo embrionario. De hecho, los

intentos por encontrar un algoritmo que relacione dinámica embrionaria con anomalías cromosómicas han dado una probabilidad de éxito no muy alta (AUC 0.634; 95% C.I 0.581-0.687)¹⁵. Podemos concluir pues, que con los datos actuales la clasificación morfocinética que proporcionan las técnicas de time-lapse no es suficiente para pronosticar que un embrión sea euploide o no, por lo que no debería considerarse como un reemplazo de las técnicas de screening genético preimplantacional. Sin embargo, la combinación de las dos técnicas sí proporciona mejores tasas de gestación e implantación cuando se comparan ciclos de biopsia embrionaria en D+3 donde la mitad de los ovocitos se cultivó en un incubador convencional y la otra mitad en uno cinematográfico.

TIME LAPSE Y BLASTOCISTO

Existen pocos artículos que estudien parámetros dinámicos más allá de D+3^{28,25,28}, debido probablemente a que uno de los objetivos fundamentales de los diferentes trabajos ha sido intentar predecir la formación de blastocisto, blastocisto de buena calidad y embrión que implanta, en un intento de equiparar los resultados clínicos de las transferencias de embriones tempranos con las realizadas en D+5. Otra posible razón es que la medición exacta de parámetros como compactación o expansión del blastocisto no es tan objetiva como los publicados hasta la fecha, por lo que establecer modelos predictivos de implantación puede resultar complicado.

Los resultados obtenidos en los artículos mencionados señalan de nuevo que tiempos de división más rápidos favorecen la llegada a mórula, blastocisto, blastocisto de buena calidad y embrión que implanta.¹⁵ Parece ser que los parámetros tempranos de desarrollo no son capaces por sí mismos de predecir qué embrión va a implantar con la suficiente especificidad y sensibilidad. Además, en estos estadios de hasta 5 células, los embriones son gobernados fundamentalmente por el genoma materno, así que es cuestionable que sean representativos de una correcta evolución, puesto que la activación del genoma

embrionario humano ocurre más tarde²⁷.

Tampoco los parámetros cinéticos tempranos hasta el estadio de 2 células son iguales dependiendo de si la técnica de fertilización es FIV o ICSI. Según los artículos publicados, la cinética inicial de los ovocitos de FIV es más lenta que la de ICSI, debido muy probablemente al que supone la entrada del espermatozoide en el ovocito, frente a la introducción directa del mismo en la microinyección^{7,18}, aunque después los tiempos se equiparan.

Como se ha explicado anteriormente, la transferencia embrionaria en D+5 es una herramienta importante en las transferencias de un único embrión. Hay autores que proponen aplicar los parámetros cinéticos conocidos a la selección del mejor blastocisto para transferir¹⁸. En relación a los eventos dinámicos anómalos, el cultivo a blastocisto puede ayudar a decidir si el embrión es finalmente viable o no.

PARÁMETROS CINÉTICOS DE NO VIABILIDAD EMBRIONARIA

CICLOS CORTOS DE DIVISIÓN: La duración de un ciclo celular suele ser de unas 10-12 h, tiempo suficiente para la duplicación del DNA y citocinesis posterior. Tiempos cortos de división pueden estar relacionados con distribución anormal de DNA entre las blastómeras o errores en su replicación. Con los sistemas de time-lapse se pueden identificar divisiones anómalas en los embriones que se corresponden con una disminución significativa de llegada a blastocisto e implantación^{7,21}.

OTRAS APLICACIONES DE TIME-LAPSE

Con MTL podemos además cuantificar y medir otros eventos dinámicos que ocurren en el desarrollo embrionario, y que suelen modular la clasificación o score asignado a un embrión en base a sus características morfológicas.

El volumen que ocupan los **fragmentos** en el embrión y su distribución es uno de los 3 pilares básicos de cualquier clasificación embrionaria convencional (Balaban et al., 2011; *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir*, 2015). Con MTL Se puede ajustar mejor la clasificación embrionaria en función de la aparición y reabsorción de fragmentos.

La **compactación** celular es otro evento dinámico que ocurre en el desarrollo embrionario. Estudios de time-lapse muestran que la compactación temprana (antes de 8 células) es indicador de baja probabilidad de desarrollo óptimo a D+5 (18,8% tasa de blastocisto de buena calidad), y está relacionada con mayor número de células multinucleadas, debido a la asincronía en la división celular por fallos en la citocinesis. El 86,1% de embriones comienzan a compactar a partir de 8 células, y es en este estadio donde más frecuentemente comienza (22,6%). La tasa de blastocisto de buena calidad en este grupo de embriones es de un 49.5%.

Con este nuevo método para evaluar calidad embrionaria, se pueden también abordar otros aspectos de la morfología que hasta ahora eran relativamente complicados de valorar, debido por un lado a su aparición en momentos muy puntuales del desarrollo, y por otro a que su comportamiento dinámico los hace difíciles de clasificar correctamente. En este trabajo vamos a analizar dos de estos nuevos aspectos: la **contracción del blastocisto** y la **aparición de vacuolas**.

3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen pocos artículos que estudien parámetros dinámicos más allá de D+3^{28,25, 27}, debido probablemente a que uno de los objetivos fundamentales de los diferentes trabajos ha sido intentar predecir la formación de blastocisto, blastocisto de buena calidad y embrión que implanta, en un intento de equiparar los resultados clínicos de las transferencias de embriones tempranos con las realizadas en D+5. Otra posible razón es que la medición exacta de parámetros como compactación o expansión del blastocisto no es tan objetiva como los publicados hasta la fecha, por lo que establecer modelos predictivos de implantación puede resultar complicado.

Los resultados obtenidos en los artículos mencionados señalan de nuevo que tiempos de división más rápidos favorecen la llegada a mórula, blastocisto, blastocisto de buena calidad y embrión que implanta.

Parece ser que los parámetros tempranos de desarrollo no son capaces por sí mismos de predecir qué embrión va a implantar con la suficiente especificidad y sensibilidad. Además, en estos estadios de hasta 5 células, los embriones son gobernados fundamentalmente por el genoma materno, así que es cuestionable que sean representativos de una correcta evolución, puesto que la activación del genoma embrionario humano ocurre más tarde²⁷.

Tampoco los parámetros cinéticos tempranos hasta el estadio de 2 células son iguales dependiendo de si la técnica de fertilización es FIV o ICSI. Según los artículos publicados, la cinética inicial de los ovocitos de FIV es más lenta que la de ICSI, debido muy probablemente al decalaje que supone la entrada del espermatozoide en el ovocito, frente a la introducción directa del mismo en la microinyección^{7,18}, aunque después los tiempos se equiparan.

Como se ha explicado anteriormente, la transferencia embrionaria en D+5 es una herramienta importante en las transferencias de un único embrión. Hay autores que proponen aplicar los parámetros cinéticos conocidos a la selección del mejor blastocisto para transferir¹⁸. En relación a los eventos dinámicos anómalos, el cultivo a blastocisto puede ayudar a decidir si el embrión es finalmente viable o no.

4.0 HIPÓTESIS

Hipotesis Alterna

Es posible pronosticar con base a los tiempos de división celular y cambios morfocinéticos cual embrion evoluciona a blastocisto.

Hipotesis Nula

No se puede pronosticar con base a los tiempos de división celular y cambios morfocinéticos cual embrion evoluciona a blastocisto.

5.0 OBJETIVOS

PRINCIPAL

Establecer y comparar el ritmo de división embrionaria a blastocisto, en pacientes sometidas a tratamiento de reproducción asistida con la utilización de la tecnología timelapse, para valorar el comportamiento morfocinético en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey en período de enero 2013 a noviembre 2016.

SECUNDARIOS

- Determinar el perfil sociodemográfico y clínico relevante de las pacientes en estudio.
- Evaluar los indicadores de estado y calidad clínica de las muestras utilizadas y las pacientes.

6.0 MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio clínico, replicativo, observacional, longitudinal, ambispectivo, analítico y comparativo.

POBLACIÓN Y MUESTRA

El presente estudio incluyó a todos los embriones que estuvieron bajo la utilización de la tecnología timelapse, en el Centro de Fertilidad IECH Monterrey, en el periodo comprendido entre Enero 2013 a Noviembre 2016, por lo que el presente estudio es de carácter poblacional y no aplica la determinación de un tamaño de muestra.

ANÁLISIS DE ESTUDIO

HERRAMIENTAS

IBM SPSS v24 ° R STUDIO 1.0.136 – 3.3.2 ° 2016 MSO Excel 16.0.6925

ANÁLISIS INICIALES

Se determinaron valores de tendencia central, desviación estándar, análisis de normalidad e histogramas de frecuencia para variables cuantitativas. Se determinó proporción de frecuencia, porcentaje en relación al total de entradas además de proporción de frecuencia para escalas al estudiar variables categóricas.

ANÁLISIS DE POBLACIÓN

Se evaluaron datos demográficos y antecedentes que prevalecieron en la muestra que pudieran ser de interés.

ANÁLISIS COMPARATIVO E INFERENCIAL

Se agrupó a los embriones según Categoría de Donador o no donador para valorar los cambios morfocinéticos en base a la división celular, para poder obtener las variaciones de tiempo en los ciclos celulares y también poder determinar la sincronía celular, y posteriormente de acuerdo a morfología, a partir de este punto de comparación se estudiaron las relaciones entre las variables paramétricas y no paramétricas. Para las variables de tendencia central se compararon con t de Student ajustado a normalidad de dos colas los grupos de interés a tomar como significativos valores de P menor a 0.05, en caso de no ser paramétrica se estudió con la prueba pertinente de acuerdo a cantidad de categorías presentes en la variable. Otros resultados fueron interpretados por el autor reportándose datos interesantes para el estudio. En caso de requerirse se realizó GLM para múltiples variables a comprar en función de la varianza.

Para los muestreos categóricos a comparar se empleó prueba de Fisher o la distribución χ^2 según la característica de la contingencia, para describir las diferencias entre los grupos de comparación, se tomó significativo P menor a 0.05.

Se elaboró dispersión y regresión para datos significativos correlacionables. Se estudió la muestra para observar factores de riesgo/beneficio al analizar grupos y subgrupos (Coeficiente de Momios OD, Riesgo Relativo RR, Numero Necesario a Tratar).

7.0 CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Pacientes entre 18-47 años de edad.
- Pacientes con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria, que hayan presentado ≥ 1 ciclo previo de FIV fallido.
- Pacientes sin antecedentes de factor uterino.
- Parejas con indicación de FIV.
- Pacientes del programa bebe seguro.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes con presencia de hidrosalpinx.
- Pacientes con anomalías cromosómicas ya conocidas.
- Pacientes con endometriosis severa.
- Embriones con ausencia de fertilización.
- Embriones con 3 pronucleos.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

- Pacientes que no hayan estado bajo la técnica de valoración con tecnología time-lapse.

8.0 INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS

Las pacientes fueron manejadas según los criterios internacionales de abordaje terapéutico, Una vez hecho el diagnóstico correspondiente, la paciente fue estimulada de tal forma que se logró conseguir un desarrollo folicular múltiple el cual nos permitió obtener un mayor número de óvulos de los cuales se seleccionaron los de mejor calidad:³³

ASPIRACIÓN FOLICULAR

Esta se realizo mediante una punción de aspiración guiada por ecografía transvaginal de 34-36 hrs. después de la administración de la HGC. El líquido folicular aspirado se deposito en los tubos y fue llevado al laboratorio, donde se vertió su contenido en placas de petri (1029 FALCON) que se encuentran en una placa calefactora a 37.0 C para luego proceder a la identificación y captura de los complejos cúmulos-ovocitos mediante la ayuda de un estero-microscopio utilizando un pipeta Pasteur, todo bajo una campana de flujo laminar para mantener así y asegurar un ambiente estéril.³³

PROCEDIMIENTO DE RECEPCIÓN DE OVOCITOS ASPIRADOS

El día anterior a la aspiración folicular se dejaron preparadas las cajas de 65X15mm. (Nuclon) Y posterior a la recepción fueron incubadas hasta el día siguiente a 37.0Cy CO2 al 5.0%.

CAPTURA OVULAR

Una vez obtenidos los óvulos se depositaron en caja petri de 60X15mm (NUNC 150326) conteniendo 4 gotas de 0.3 ml de medio G-MOPS PLUS (Vitro life, G111 series). En la gota numero 1 se realizó el primer lavado, y en las gotas 2, 3 y 4 se clasificaron los óvulos, la incubación no fue mayor a 15 minutos en este medio.³³

CLASIFICACIÓN DE LA MADUREZ SOMÁTICA DEL COMPLEJO CÚMULO-CORONA –OVOCITO (CCO)³³

La clasificación del CCO se realiza atendiendo al:

- 1.-Tamaño y filancia del cúmulo.
- 2.-Grado de dispersión de las células del cúmulo y de la corona.

Sobre la base de estos criterios se puede realizar la siguiente clasificación:

Madurez 1, o inmaduro (M1): cúmulo pequeño o grande, con poca filancia.
Corona compacta formando una capa densa alrededor del óvulo .

Madurez 2, o intermedio (M2): Cúmulo grande, disperso y filate.
Corona con inicio de dispersión (con pequeños espacios entre sus células).
Pero aún formando una capa densa alrededor del óvulo.

Madurez 3, o Maduro (M-3): Cúmulo grande, disperso y filate.
Corona radiada característica, con espacios entre las células en forma de rayos,
pudiéndose observar los límites del óvulo.

Madurez 4, o Post-Maduro (M-4): Cúmulo muy disperso. Grande o pequeño
Por fragmentación del mismo. Muy filate, Corona inexistente. El ovocito se
puede observar con nitidez e identificar el primer cuerpo polar.

INSEMINACIÓN

En la FIV convencional, la inseminación de los óvulos se realizó en las placas donde permanecieron los gametos femeninos hasta el momento de ser inseminados (3 ó 4 horas de incubación). El número de espermatozoides que generalmente se usan para la fertilización in Vitro, varía entre 50,000 y 100,000/ml. por óvulo.³³

Inseminación bajo aceite mineral

Materiales:

Caja de 60 x15 mm.(Nuclon 150336)

Medio HTF 12% HSA.

Aceite mineral

Pipeta automática 10,0 μ

Pipetas Pauster.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Bajo la campana de flujo laminar, preparar las cajas para la inseminación
- 2.- Concentrar la muestra de espermatozoides a una concentración de 50X10/ml.
- 3.- Colocar 1.0 μ de la muestra en las gotas, 2, 3, 4, 5.
- 4.- Depositar un máximo de 4 óvulos por gota.
- 5.- Incubar a 37.0°C 5.0% de CO₂.

EVALUACIÓN DE LA FERTILIZACIÓN D+1³³

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Observar los óvulos inseminados a las 15 ò 18 horas post- inseminación.
- 2.- Comprobar la total disociación de las células del cúmulo ooforo.
- 3.- Disociar, bajo el microscopio, las células de la corona radiada con ayuda de una pipeta Pasteur estirada en la llama del mechero. La punta de la pipeta debe quedar con un diámetro de 150 μ m.
- 4.- Con la pipeta Pasteur estirada aspirar y botar repetidamente el óvulo hasta que la corona se desprenda, también se utiliza el stripper tips para este fin.
- 5.- Evaluar la fertilización indicando la presencia de 2 pronúcleos (PN) en el citoplasma del óvulo y de 2 cuerpos polares en el espacio perivitelino.
- 6.- Observar los PN con aumento mayor del estéreo microscopio. Para una mejor definición de los PN y de los cuerpos polares, observar con aumento 20X del microscopio invertido.
- 7.- Lavar por 3 veces los cigotos y transferirlos a una caja con medio de Crecimiento (ONE 12.0% HSA)

EVALUACIÓN DE LA MORFOLOGÍA EN ESTADÍO DE PRONUCLEOS

La morfología de los cigotos en estadio de pronúcleos consiste en el número y distribución o alineación de los nucleolos en el pronúcleos.

EVALUACIÓN EMBRIONARIA

Tras la observación de los dos pronúcleos los pre embriones se incuban a 37.0°C y 5.0% de CO₂ hasta el momento de la transferencia. Los embriones humanos se dividen cada 12-14 horas. Así, a las 48 -72 horas pos- aspiración, momento en el que se transfieren habitualmente los embriones pueden encontrarse en estadios de crecimiento que van de los 2 o 8 blastómeros. Entre 72 y 96 horas los embriones pasan de 8 a 16 células. Iniciado la compactación. El estadio de blastocisto se desarrolla hasta 120 horas aproximadamente. Las sucesivas divisiones mitóticas que se reproducen en el prembrión suponen una continua reorganización de las células que lo componen y en este proceso se pueden generar pequeños fragmentos citoplasmáticos. La importancia de estos fragmentos, junto con la morfología que presentan los blastómeros, son los criterios empleados en la evaluación de los embriones. Esta gradación de los embriones se basa en el sistema de clasificación descrito por Veek y consiste en lo siguiente (Veek, 1990).³³

Tipo I. los blastómeros son de igual tamaño, regulares y no hay fragmentos citoplasmático.

Representa la morfología perfecta.

Tipo II. Los blastómeros son de igual tamaño, pero aparecen pequeños fragmentos citoplasmáticos que ocupan aproximadamente el 20% del espacio del embrión.

Tipo III. Presenta blastómeros de tamaño claramente desigual y no aparecen fragmentos.

Tipo IV. Los blastómeros pueden ser de igual tamaño desiguales, pero en cualquier caso de fragmentación es significativa (superior al 40-50%).

TipoV. La fragmentación es total o casi total y los blastómeros son de cualquier tamaño.

DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO DE UN D+1 a D+2
DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO DE UN D+2 A D+3
DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO DE UN D+3 A D+4
DESARROLLO EMBRIONARIO IN VITRO DE UN D+4 A D+5
DESARROLLO EMBRINARIO IN VITRO DE UN D+5 A D+6

TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

Es importante tener en cuenta la calidad de los embriones, puesto que parece claro que la evolución o no del embarazo está íntimamente relacionada con la transferencia de embriones calificados como embriones de buena o mala calidad (copperman, 1995). Pero si la calidad de los embriones es importante, el numero de los embriones, y la edad de la paciente son factores que se deben tomar en cuenta para valorar las posibilidades de implantación y el riesgo de embarazo múltiple (Svendsen, 1996). De esta forma, valorando los antecedentes reproductivos, la calidad de los embriones que se transfieren y el número total de embriones de que se disponen se decide una transferencia de 2 o 3 embriones.³³

TÉCNICAS DE TRANSFERENCIA

La técnica Habitual es la intrauterina, transcervical. Mediante un catéter de plástico se depositan los embriones seleccionados cerca del fondo del uterino, con medio de transferencia al 50% SSS. Volúmenes mayores de líquido favorecen el embarazo ectópico. La técnica se debe realizarse en condiciones estériles. Se aconseja conocer previamente la longitud de la cavidad uterina para situar los embriones lo mas cerca del fondo sin llegar a tocar éste.³³

Es habitual mantener durante 2 horas a la paciente en decúbito supino, y aconsejable reposo relativo durante las siguientes 24 horas.

El tipo de catéter también varía dependiendo de cada médico, los más comunes son el Fridman, Fet Set de Fridman, Soft-Pass, Sofá-Pass Eco Tip. Los catéteres se diferencian unos de otros por su composición que pueden ser duros o blandos. Se ha comprobado que los catéteres blandos tienen mejor éxito debido a que se dañan menos a las paredes del útero y evitando con esto que se provoquen contracciones que llegarían a expulsar a los embriones que se transfirieron.³³

Procedimiento:

La manera como se carga el catéter es la siguiente:

- 1.- En una caja de cultivo 30x10mm colocar 2.0ml de medio de transferencia al 50% SSS.
- 2.- Con la jeringa de 1.0 ml tomar 0.8 ml del M-T al 50%SSS evitando la formación de burbujas.
- 3.- Llenar todo el catéter con el M-T 50%SSS de la jeringa evitando la formación de burbujas conservando 20 μ del M-T50%SSS en la jeringa.
- 4.- Tomar los embriones directamente de su caja de cultivo previamente seleccionados, en 5 μ y aspirar 3 μ de aire.(Fig.1)
- 5.- Se corrobora el nombre de la paciente nuevamente.
- 6.- Entregar el catéter al médico.
- 7.- Una vez canalizado se inyectan lentamente sin hacer presión sobre el embolo de la jeringa, se retira el catéter lentamente.
- 8.- Se corrobora que el catéter se encuentre sin embriones y se notifica que la transferencia ha efectuado de manera completa.

LA TRANSFERENCIA ES CLASIFICADA EN:

- A)** Si la transferencia se efectúa sin ninguna complicación, ni la presencia de moco y sangre en el catéter.
- B)** Si la transferencia se efectúa sin ninguna complicación y existe la presencia de moderado moco y sangre en el catéter.

- C) Si la transferencia se efectúa con alguna complicación, la existencia de abundante moco y sangre dentro y fuera del catéter.

PROCESAMIENTO DE SEMEN PARA ICSI³³

El objetivo principal de la preparación del semen es:

- 1.- Aumentar la concentración de espermatozoides.
- 2.- Seleccionar los espermatozoides de mejor movilidad y morfología
- 3.- Eliminar el plasma seminal y con él los restos celulares, los microorganismos y los agentes aglutinantes.

El método de recuperación espermática y la técnica de preparación dependerán de la procedencia de los espermatozoides que puede ser: de eyaculado, epidídimo o testículo a su vez, estas muestras pueden ser frescas o congeladas.

EYACULADO: la muestra se colecta por masturbación en un frasco estéril se recomienda tener de 2 a 3 días de abstinencia, la muestra se deja licuar durante 20 minutos, después de esto se realiza el seminograma y se capacita ya sea por gradientes o swim-up.

EPIDIDIMO: la obtención de espermatozoides del epidídimo se realiza mediante una punción –aspiración percutánea del mismo, la muestra se deposita en un tubo cónico (Falcon 2099), se lava con medio de cultivo y se hace un concentrado mediante centrifugación (5 minutos a 2000rpm.) el sobrenadante se elimina y el pellet formado se toma 1µ para preparar la caja de ICSI.

TESTICULO: mediante cirugía se extrae una pequeña cantidad de tejido de testículo, el tejido se deposita en una caja de cultivo (Falcon 1008) con 1.0ml de medio de cultivo HTF Modificado, se realiza disección con la ayuda de 2 jeringas

de insulina (BD 326709) una vez diseccionado se coloca 10 μ en una caja de cultivo (Falcon 1008) y se observa al microscopio invertido , para buscar espermatozoides , en cuanto se obsérve por lo menos un espermatozoide móvil se reporta posible este procedimiento puesto que el cirujano esta en el quirófano con el paciente y en caso de no haber espermatozoides en la primera muestra se puede hacer una toma del otro testículo.

En ICSI la concentración de espermatozoides que necesitamos es muy baja debido a que podemos seleccionar individualmente los espermatozoides que se van a microinyectar.

PIPETAS PARA ICSI

Las pipetas de microinyección son indispensables para poder realizar la técnica de ICSI: existen dos tipos inyección y holding.

Pipeta Holding: con esta pipeta y mediante un sistema de presión negativo el óvulo es sujetado y una vez que esta fijo es posible penetrarlo con la pipeta de inyección, la holding es una pipeta roma, con un diámetro externo de 60 μ y un diámetro interno de 20 μ .

Pipeta de Inyección: se utiliza para inmovilizar al espermatozoide, se aspira para ser inyectado al interior del óvulo, esta pipeta es mucho mas estrecha , tiene un diámetro externo de 7 μ y un interno de 5 μ es biselada y acaba en un afilado agujón que permite entrar fácilmente en el óvulo

COLOCACIÓN DE LAS PIPETAS EN EL MANIPULADOR³³

Antes de colocar las pipetas de microinyección debe revisarse el sistema, en él no debe haber burbujas y debe tener suficiente aceite. la primer pipeta que se coloca la holding; se toma de la parte final del micromanipulador de holding, se purga para eliminar burbujas; se deja una gota de aceite en su extremo y se introduce la pipeta con cuidado asegurándola mediante un sistema de rosca.

El microinyector tiene un sistema que nos permite medir los movimientos de las pipetas; de tal manera que podamos movernos con amplitud en todas direcciones a la hora de enfocar las pipetas y hacer la micro manipulaciones.

La pipeta de holding sujeta al sistema se coloca lo mas próximo al centro del objetivo, después con el objetivo 10x la enfocamos, una vez enfocada rectificamos su orientación si es necesario, y pasamos al objetivo 20x centramos la pipeta y pasamos al objetivo 40x. Una vez centrada se procede a colocar la pipeta de inyección la cual se coloca de igual manera que la de holding. Ya que se han colocado las pipetas y revisado que estén alineadas se procede a microinyectar.

PREPARACIÓN DE LOS OVULOS PARA MICROINYECTAR

Los ovocitos que van a microinyectar, llevan un proceso de descumulación, este consiste en quitar la células del cúmulo que lo rodea. Esto se realiza con la ayuda de la enzima hialuronidasa.³³

CAJA DE HIALURONIDASA Y DESCUMULACIÓN:

- 1.- En la caja 60X15mm colocar 4 gotas de 0.2ml en los extremos y 4 gotas de 20µl en el centro, cubrir con aceite mineral 8.0 ml.
- 2.-Se colocan los complejos corona cúmulo – óvulo en una de las gotas de 0.2ml HTF Modificado,
- 3.- Agregar 50 µL de la enzima Hialuronidasa con la puntilla de 200µl.
- 4.- Con la ayuda de la pipeta automática hacer pasar los CCO x 30 seg.
- 5.- Pasar los óvulos a las gotas de 20 µL con los Stripper tips de diferente calibre por las gotas 1, 2, 3, 4. Varias veces para la remoción de la corona y quede la zona de los óvulos expuesta.
- 6.- los óvulos de cumulos se colocan en una placa de cultivo medio HTF 12.0% HSA. y se clasifican y incuban.

CLASIFICACIÓN DE LOS OVULOS

Al de acumular los óvulos, es posible ver claramente su morfología y su grado de madurez. La clasificación de los óvulos es la siguiente.³³

Óvulos MII: Son óvulos que han concluido su primera división meiotica, la presencia de un cuerpo polar nos indica que estos óvulos están en la metafase de la segunda división meiotica, son óvulos maduros y solo estos se microinyectar.

Óvulos MI: Son óvulos inmaduros, no han concluido su primera división meiotica pero tampoco presentan a vesícula germinal, estos se microinyectar a las 3 horas después de haber extraído se cuerpo polar.

Óvulos VG: Son óvulos pequeños, y oscuros y se caracterizan por la presencia de una vesícula general, estos óvulos son los mas inmaduros, pues están detenidos en la profase de la primera división meiotica. Después de 26-29 horas de su captura pueden madurar.

Óvulos Atresicos: Son óvulos degenerados, citoplasma oscuro y su membrana citoplasmática indefinida. También son llamados óvulos posmaduros.

PREPARACION DE LA CAJA DE MICROINYECCION:

- 1.-En el centro de la caja 3002 (Falcon) se colocan 5 gotas de 8 μ donde se realizara la microinyección de los óvulos.
- 2.-Se coloca una gota de 10 μ de PVP(polivinilpirrolidona) y a la izquierda de estas 3 gotas de 5 μ de HTF MODIFICADO al 10.0 % donde se depositara 1 μ de la muestra de espermatozoides capacitada.
- 3.-A la derecha de la caja se colocan 3 gotas de 8 μ para el lavado de los óvulos, y se cubre con aceite mineral 1029 (Sigma) a 37.0°C .

MICROINYECCION:

Una vez alineada la pipetas y preparadas la placa de micro inyección se puede realizar la técnica. La caja en el microscopio invertido, se enfoca el borde de la gota del PVP, en esta gota la pipeta de ICSI es enfocada y se aspira un poco de PVP y se pasa a la gota de espermatozoides se selecciona uno y se inmoviliza con un pequeño golpe en la parte media del flagelo en el fondo de la caja. Una vez inmóvil el espermatozoide se procede a inyectarlo en el citoplasma del óvulo.³³

El óvulo se sujeta con la pipeta holding y se acomoda de tal manera que el cuerpo polar quede a las 6 o 12 en el reloj, la pipeta de inyección se acerca a la zona del ovocito en dirección de las 3 en el reloj y al a vez el espermatozoide se lleva a la punta de esta se presiona la zona pélcida hasta atravesarla junto con la membrana plasmática. Una vez dentro se aspira un poco de citoplasma y se regresa junto con el espermatozoide la pipeta se retira suavemente del interior de óvulo.

Una vez micro inyectados se llevaran a la gota del lavado de la placa de cultivo, después se colocan cada uno en su respectiva gota, y se dejan en incubación.

CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA MEDIANTE ANÁLISIS DE TIME-LAPSE.

PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y CINÉTICOS

Para determinar el tiempo exacto de las divisiones celulares, imágenes de cada embrión fueron adquiridas cada 10 minutos, a una resolución de 2560 x 1920 píxeles en 7 planos focales distintos. La morfología y cinética embrionarias fueron evaluadas en un ordenador externo al incubador, con un software desarrollado específicamente para analizar imágenes por time-lapse (Primo Vision™ Time-Lapse System).

PARÁMETROS MORFOLÓGICOS

Los embriones fueron clasificados **morfológicamente** en D+2 y D+3 en función de número de células, porcentaje y distribución de fragmentos y simetría como parámetros principales. Otros aspectos evaluados fueron: multinucleación (especialmente en D+2), presencia de vacuolas, compactación, aspecto del citoplasma y cohesión entre las células.^{13,33}

En D+5 y D+6, la clasificación se basó en los criterios ASEBIR de clasificación de blastocistos, tal y como se muestra en el capítulo 1.5 de este trabajo (*Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir 2015*).^{13,33}

Se valoraron 3 aspectos fundamentales:

GRADO DE EXPANSIÓN:

- Blastocisto Temprano (BT): El embrión comienza a formar una cavidad incipiente.
- Blastocisto Cavitado (BC): Al menos el 50% del embrión está ocupado por el blastocele o cavidad.
- Blastocisto Expandido (BE): El embrión aumenta de tamaño y ZP se afina.
- Blastocisto eclosionando o haciendo Hatching (BHi): El embrión “rompe” la ZP y comienza a salir.
- Blastocisto eclosionado o Hatched (BH): El embrión ha salido completamente de la ZP.

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DEL TROFOECTODERMO: En función del número y aspecto de las células el TF se cataloga en **A** (mejor calidad), **B, C y D** (peor calidad).

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA MASA CELULAR INTERNA: En función del tamaño, compactación y aspecto de las células la MCI se cataloga en **A** (mejor calidad), **B, C y D** (peor calidad).

De la combinación de los 3 factores surge la clasificación del blastocisto. Se consideraron embriones de buena calidad los BE, BHi y BH tipo A y B.

PARÁMETROS CINÉTICOS.

En cuanto a los **parámetros cinéticos**, se anotaron:

- Extrusión del 2º CP.
- Aparición y desaparición de los PN.
- Tiempos de división de cada mitosis (t2, t3, t4, t5, t6, t, t8, t9+)
- Tiempo de compactación de mórula (tMC), o momento en que no se aprecian las membranas celulares
- Tiempo de Blastocisto temprano (tBT) o tiempo en el que la cavidad comienza a formarse
- Tiempo de Blastocisto Cavitado (tBC) o tiempo en el que la cavidad ocupa más del 50% del volumen del embrión. Se registra el tiempo antes del comienzo del adelgazamiento de la ZP
- Tiempo de Blastocisto Expandido (tBE) o tiempo en el que el embrión ha aumentado de tamaño y la ZP está adelgazada.
- Tiempo de Blastocisto Hatching (tBHi) o momento en el que el embrión comienza a salir.
- Tiempo de Blastocisto Hatched (tBH) o tiempo en el que el embrión ha eclosionado.

SELECCIÓN DE LOS EMBRIONES A TRANSFERIR

La selección de los embriones a transferir se realizó en base a su morfocinética, según el algoritmo desarrollado por Meseguer en 2011²⁴. En un primer proceso se pre-seleccionaron los blastocistos de mejor calidad morfológica (A, B, C, D). En un segundo paso, se excluyeron de este grupo los

embriones procedentes de división irregular a 3 células (división de cigoto a 3 células en $\leq 5h$), aquellos en los que la división en 2 células había sido asimétrica y/o los que presentaron multinucleación en 4 células. Sobre el resto se aplicaron los criterios del algoritmo (t_5 , cc_2 y s_2). Se añadió además s_3 como valor dinámico adicional ($t_8 - t_5 \leq 3h$).^{20,18,25,26}

9.0 RESULTADOS

Para el efecto del estudio se siguieron 82 embriones de los cuales el 60.98% provenía de pacientes no donadoras y un 39.02% de pacientes donadoras. Las comparaciones iniciales se dirigieron a explorar las relaciones en cuanto al tiempo de desarrollo embrionario desde la formación de Pronúcleos a la compactación, formación de blastocisto y transferencia del mismo. No se encontraron diferencias entre el tiempo de desarrollo de pronúcleos (M 792.13 min, ± 349.84 , $P=0.391$), ni en las etapas celulares subsecuentes, aunque los embriones de las pacientes no donadoras experimentaron tiempos de división celular más prolongados en relación a las pacientes donadoras, estas tendencias se observaron de forma generalizada hasta la etapa a 8 células (M 4034.31 min, ± 561.56 , $P=0.408$), y compactación (M 5076.44 min, ± 690.49 , $P=0.051$) para las donadoras. Al explorar los tiempos de Sincronización celular, de forma similar el patrón de tiempo fue menor en las donadoras a excepción de S1 ($S1=t2-PN$) (M 708.88 min, ± 284.82 , $P=0.84$), sin embargo, no fue estadísticamente significativa esta diferencia. Estas diferencias son menos apreciables para los tiempos de CC2 ($t3-t2$) (M 530.66 min, ± 177.85 , $P=0.763$), y CC3 ($t5-t2$) (M 951.47 min, ± 353.93 , $P=0.893$). Para el factor masculino, no se observó modificaciones en las características de los diferentes parámetros evaluados, no obtuvimos modificaciones en el volumen (M 3.34, ± 1.98 , $P=0.372$), o en la concentración (M 56.47, ± 42.31 , $P=0.333$) celular de las muestras seminales; también no se observaron diferencias entre las poblaciones en cuanto a motilidad espermática (M 37.94, ± 16.02 , $P=0.134$) y cuenta total espermática (M 76.06, ± 76.1 , $P=0.184$), solo en la morfología espermática con formas normales $<4\%$, en las pacientes no donadoras (M 1.42, ± 1.6 , $P=0.044$) las cuales presentaron menor cantidad de formas normales en sus parejas.

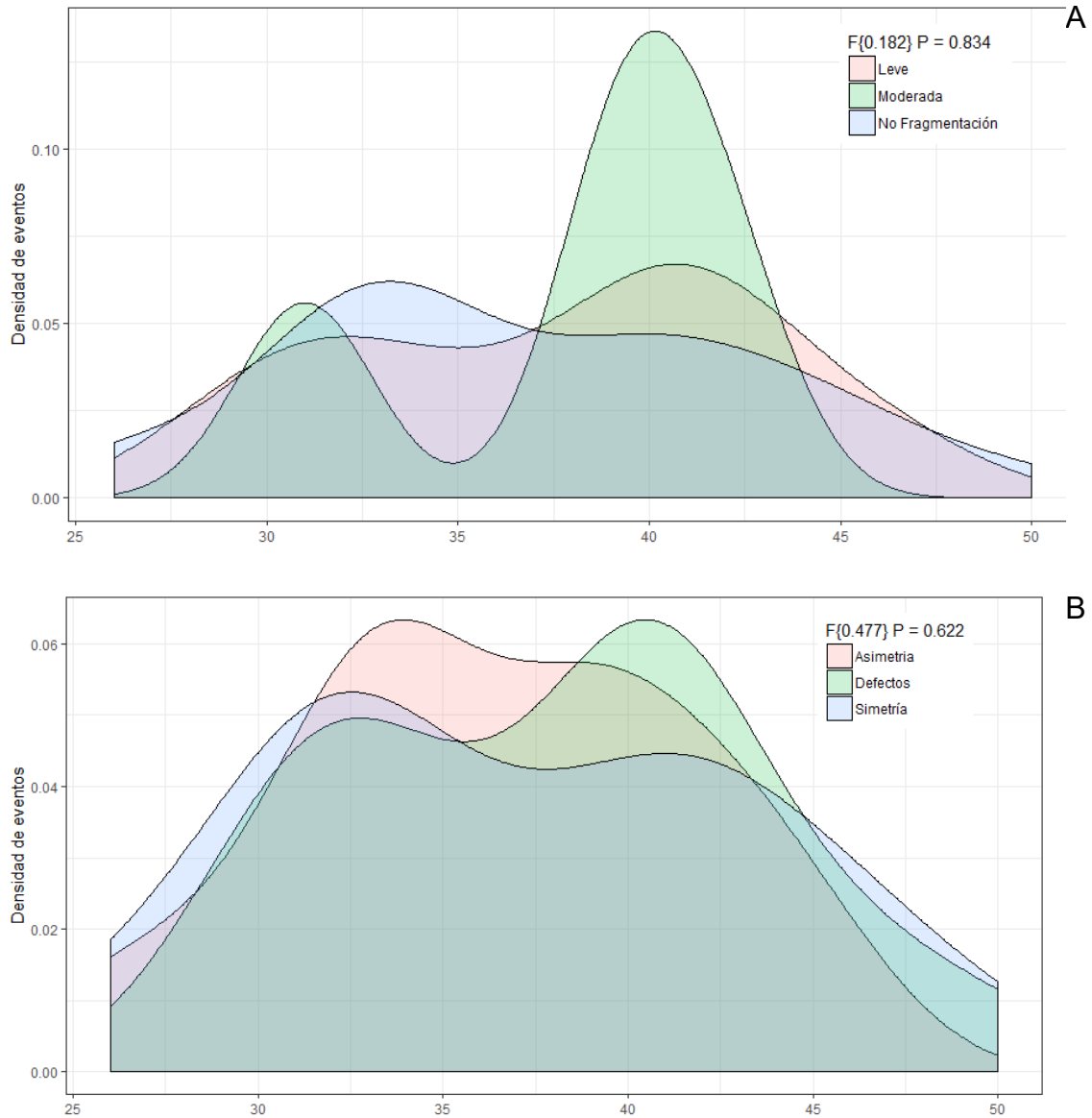


Gráfico 1. Relación de densidad de eventos en relación de A) Fragmentación, y B) Blastomeras. Se observa no existir diferencias en las distribuciones en cuanto a edad, solo que existe una mayor densidad de eventos en fragmentación moderada y defectos en el embrión conforme aumenta la edad

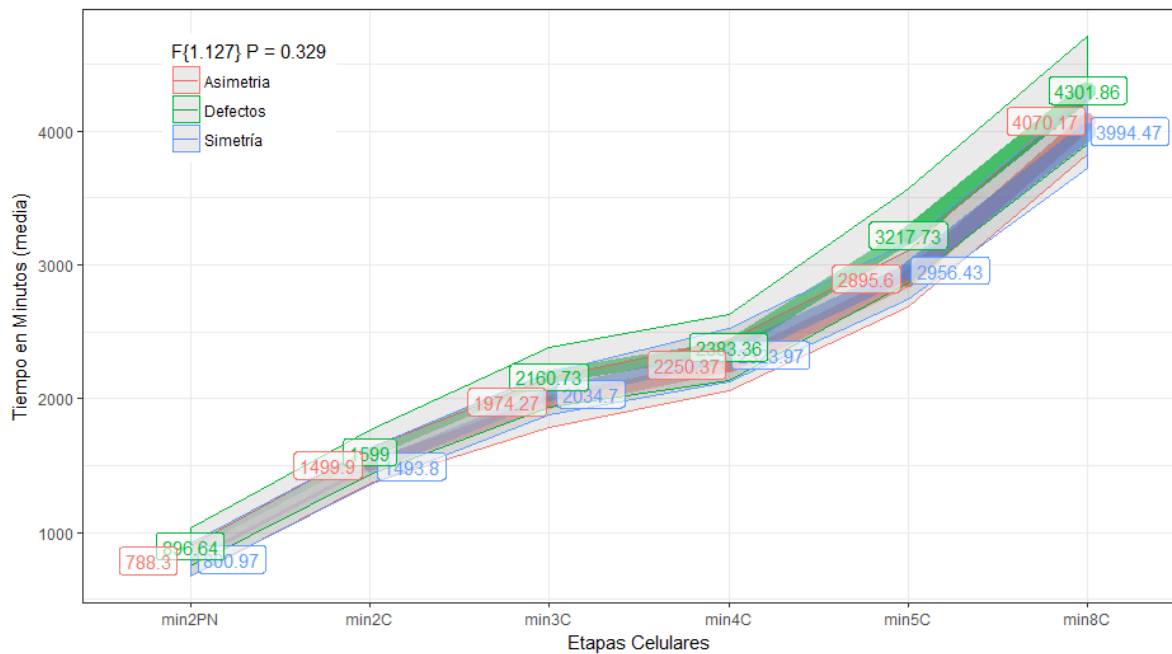


Gráfico 2. Secuencia de División celular en relación a las Blastómeras, se observa que no existen diferencias en la serie de tiempo dependiendo de la categoría de las características del citoplasma

De manera adicional se exploraron las condiciones visuales de las características morfológicas embrionarias, la escala de graduación de Blastómeras y Fragmentación se separó en los componentes respectivos y se exploraron los tiempos de desarrollo de igual forma. De forma singular no se encontraron diferencias en los tiempos de replicación celular y las graduaciones de las Blastómeras, a pesar de estar evaluando 3 grupos, en el rastreo del ANOVA no se encontraron diferencias para la etapa de pronúcleos ($F \{1.363\}$, $P=0.262$), o etapa de 2 células ($F \{0.977\}$, $P=0.381$) en relación al tiempo, incluso en la etapa de 5 células ($F \{2.684\}$, $P=0.075$) y 8 células ($F \{1.706\}$, $P=0.188$) no se observaron diferencias en las series. Solo en el tiempo de formación de Blastocisto ($F \{4.318\}$, $P=0.017$) los embriones con defectos en el citoplasma se observaron con mayores tiempos (M 7009.54 min, ± 713 , $P_{hoc}=0.027$) en relación a los defectos de asimetría y simetría. **(Gráfico 2 y 3)**

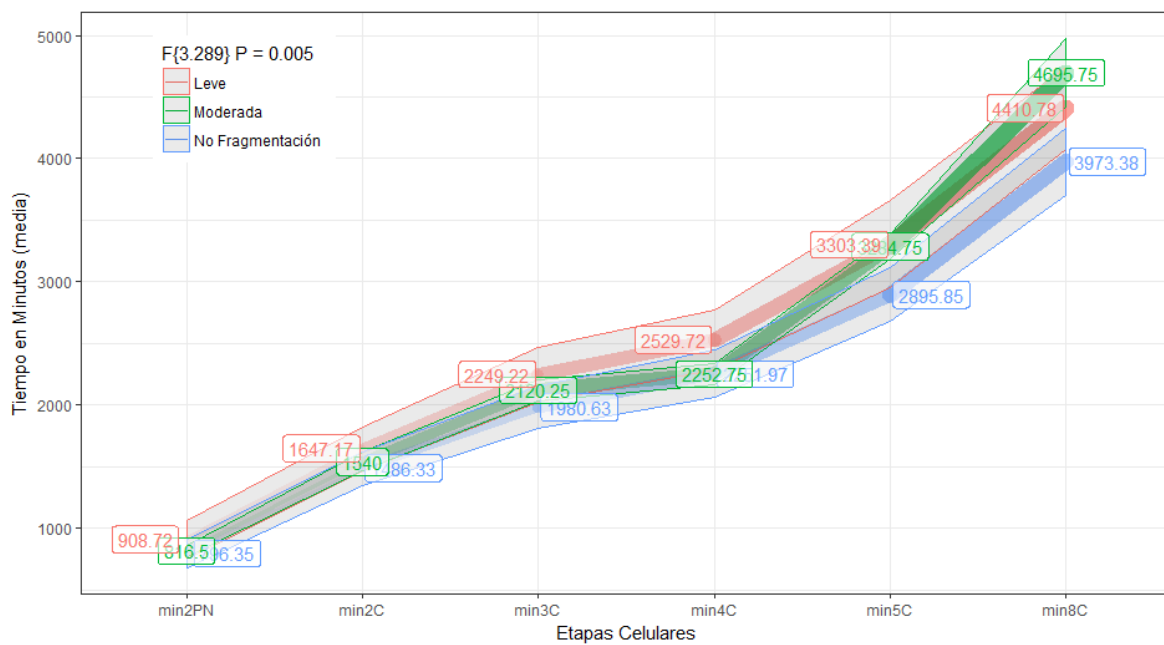
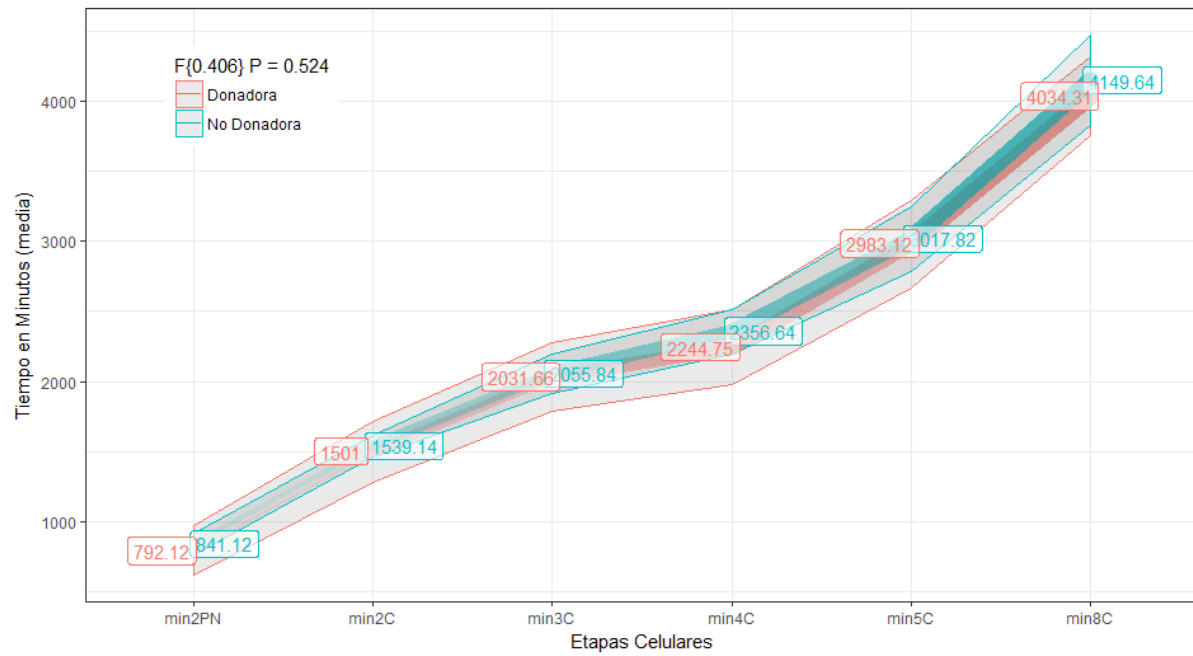
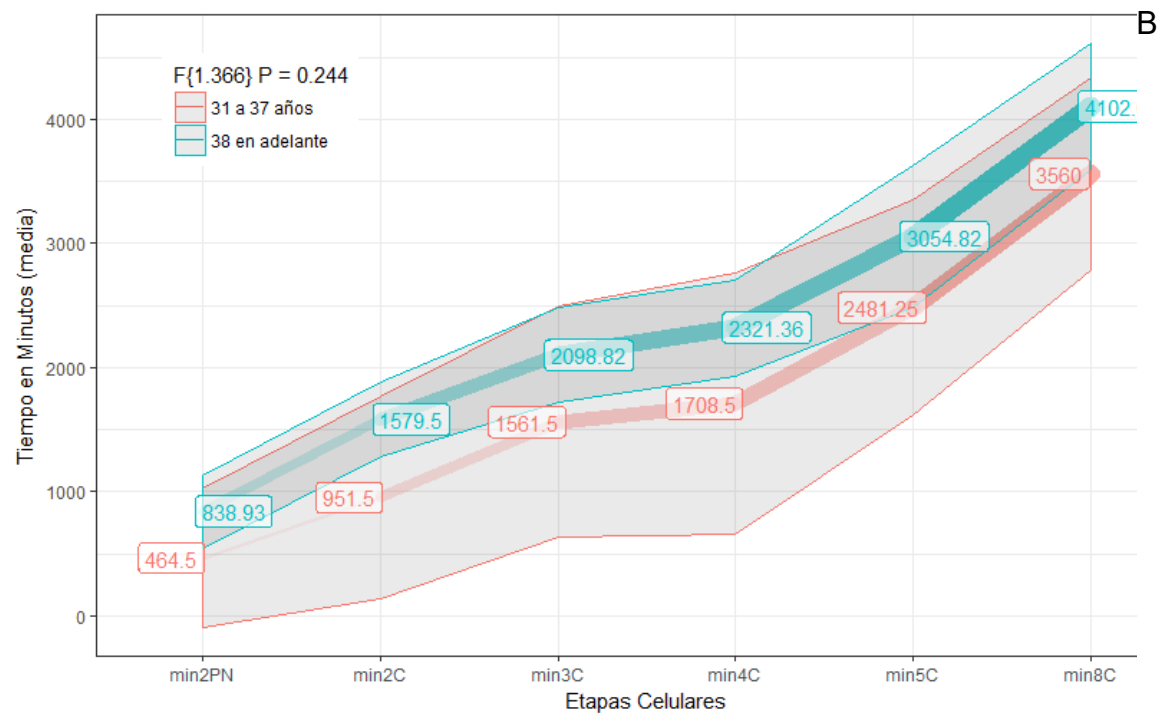


Gráfico 3. Secuencia de División celular en relación a los grados de Fragmentación, se observa que los embriones con no fragmentación tienen los mejores tiempos de división



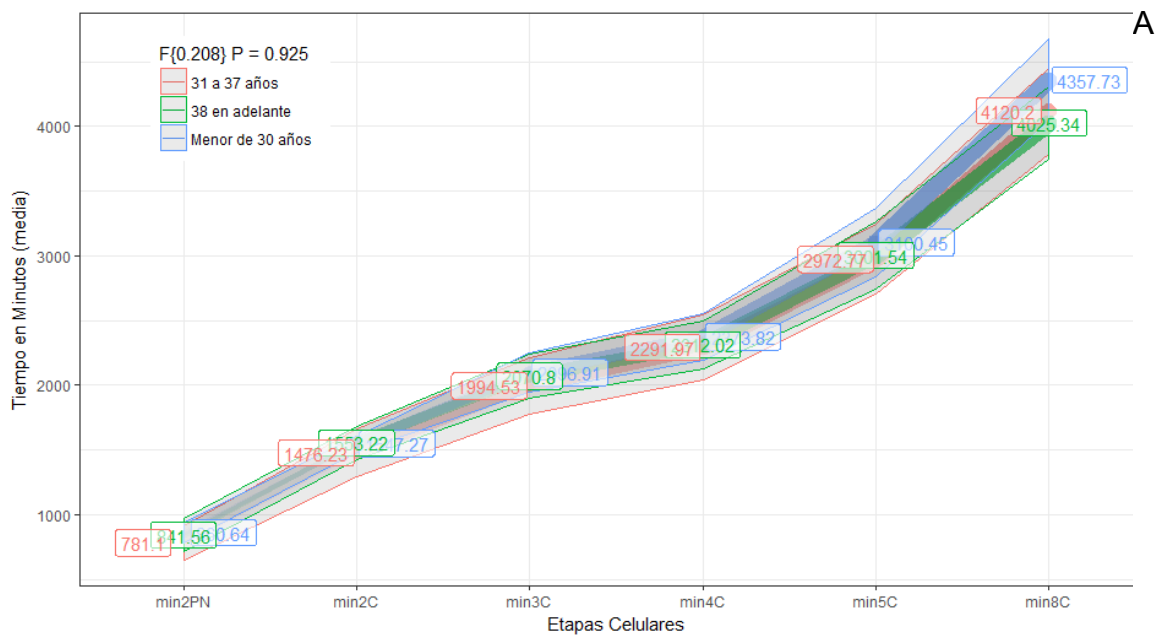
A



B

Gráfico 4. Relación de División Celular y determinantes como el origen del A) ovulo, o en el caso de B) la edad de la no donadora

Para los tiempos de sincronización celular no se observarían diferencias entre el tiempo S1 (F {0.046}, P=0.955), tampoco para S2 (F {0.65}, P=0.525) y no se observarían patrones en S3 (t8-t5) (F {0.719}, P=0.49), tampoco observamos asociaciones en cuanto a edad (F {0.477}, P=0.622), ni factores relacionados a condiciones de la muestra espermática masculina o las medias de edad de las pacientes.



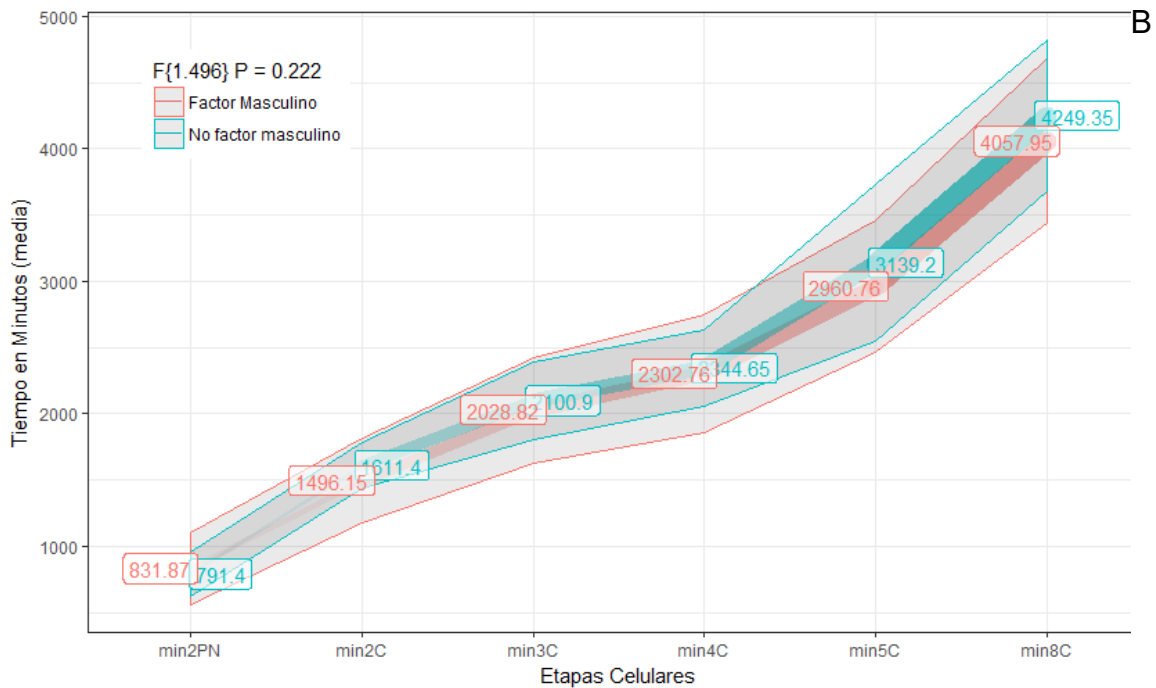


Gráfico 5. Se observa en A no existir tendencias en relación a la edad materna. De forma similar en B no se determinan patrones relacionados al Factor Masculino

Para la siguiente característica de fragmentación, se observaron mayores patrones de tiempo en los ciclos celulares, teniendo diferencias para el tiempo en los embriones con fragmentación leve y moderada un mayor tiempo de división a 3 células (F {3.917}, P=0.024), observación que permanecería también para la etapa de 4 células (F {3.342}, P=0.04), 5 células (F {5.255}, P=0.007) y se extenderían estas diferencias hasta la formación de Blastocisto (F {4.252}, P=0.018), de modo que notamos una probable efecto de la fragmentación y el retraso en los tiempos celulares. **(Gráfico 3)** De forma singular estas diferencias no serían evidentes en las medidas de sincronización celular en S1 (F {0.305}, P=0.738), en S2 (F {0.826}, P=0.441), ni en S3 (F {1.055}, P=0.353), solo aparecerían de nuevo estas diferencias en cuanto a fragmentación para el tiempo INT(t5-t4) (F {4.205}, P=0.018) y INT(t2-t5) (F {3.764}, P=0.027). Además, siguiendo las tendencias previas, en relación a los factores masculinos no se observan diferencias entre la fragmentación y las características de la muestra.

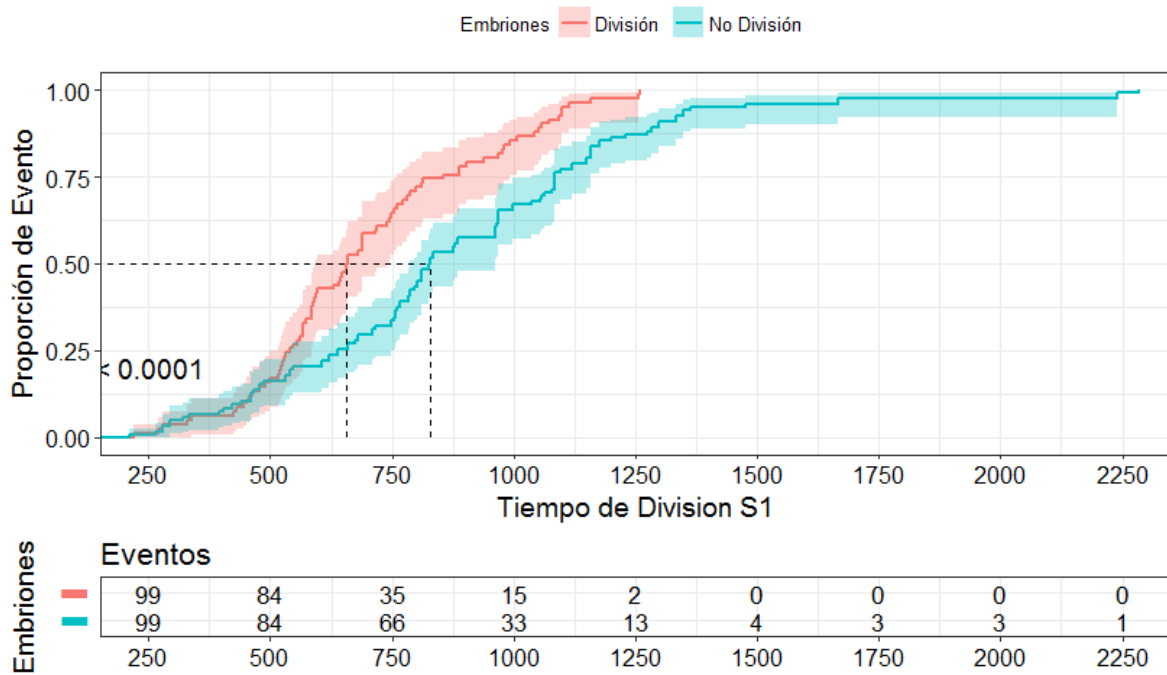


Gráfico 6. Curva de Kaplan para observar proporción de división celular

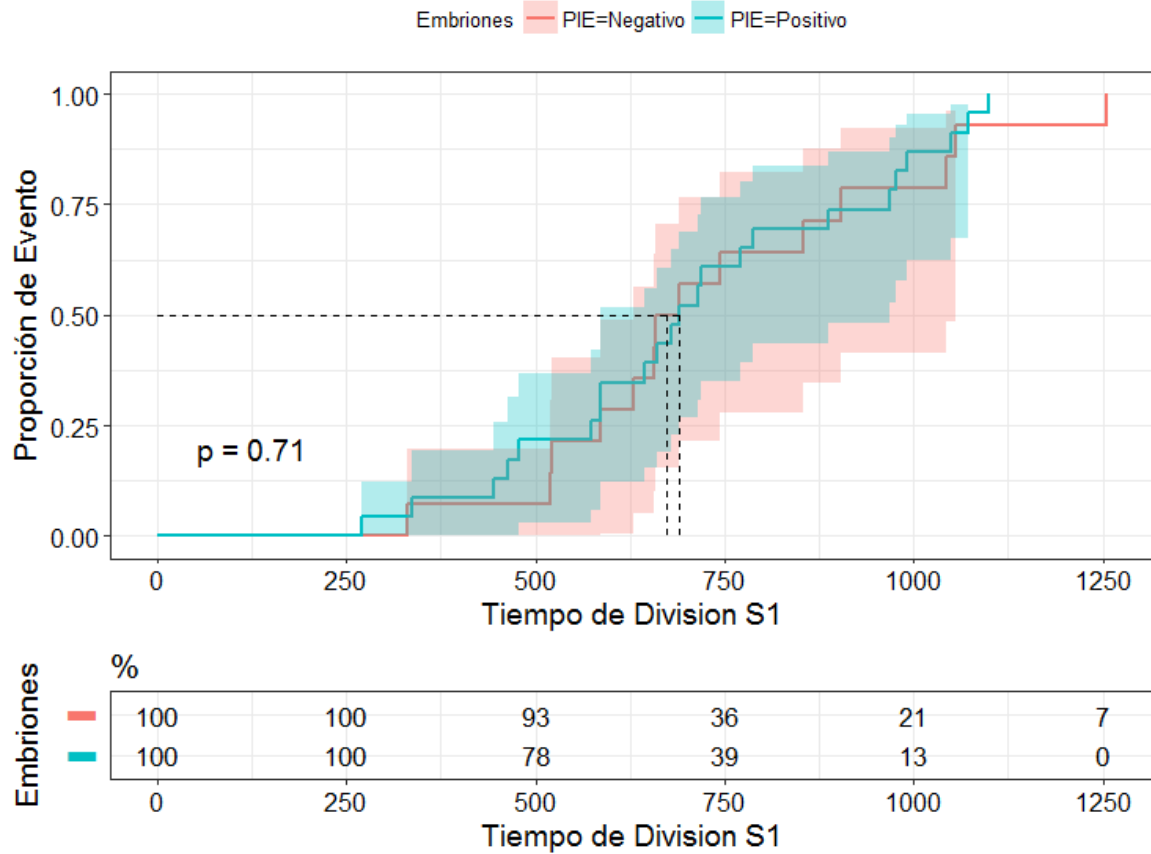


Gráfico 7. Curva de Kaplan para observar proporción de división celular y su relación con PIE Positivo

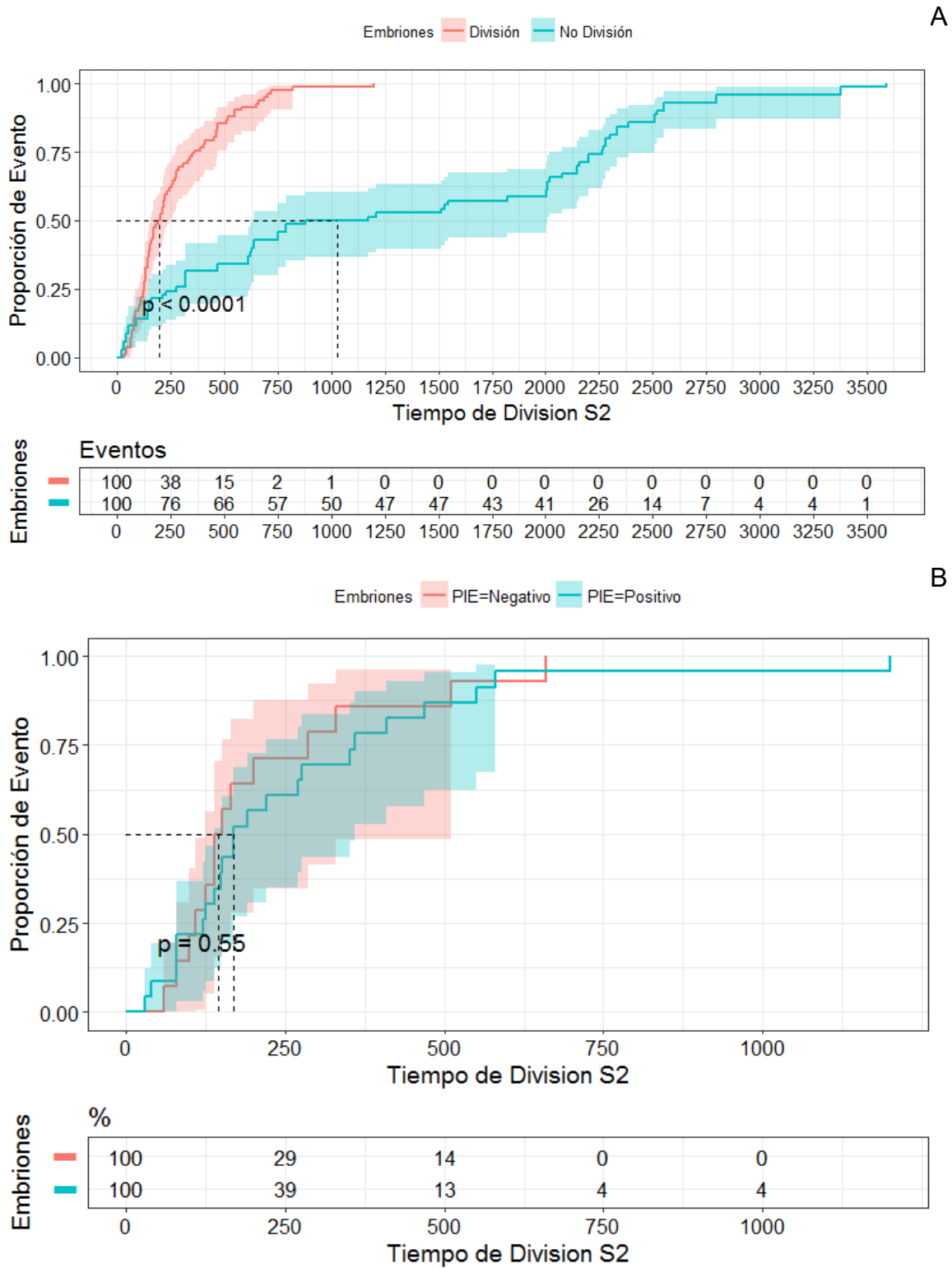
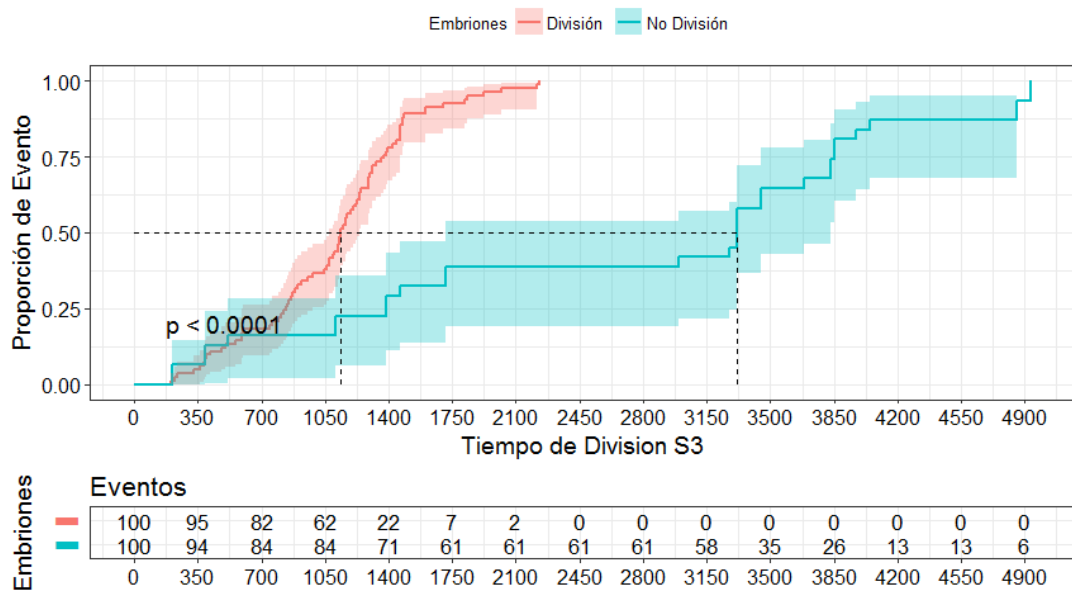


Gráfico 8. Curva de Kaplan para observar proporción de división celular A) y su relación con PIE Positivo B)

Siguiendo los datos de los embriones que experimentaron división celular, se pudieron correlacionar los tiempos de replicación celular, teniendo correlación entre el tiempo de pronúcleos $r^2=0.637$ a 2 células, hasta el tiempo de 5 células a 8 células, $r^2=0.703$, de modo que se exploró la muestra para datos pronóstico de replicación, para el modelado de los siguientes procesos se anexaron los tiempos celulares de los embriones que dejaron de dividirse, de modo que en cada etapa celular y etapa de sincronización se evaluara para estimado de pronóstico, se encontró solo para S1 (AUROC= 0.652) que aquellos embriones que permanezcan más de 785 minutos (SEN 64.63%, ESP 76.69%) en S1 no experimentaran divisiones subsecuentes (PP 58.24%. PN 81.17%) y sólo un embrión de cada 3.39 (IC 2.01 - 3.82) experimentará división.



B

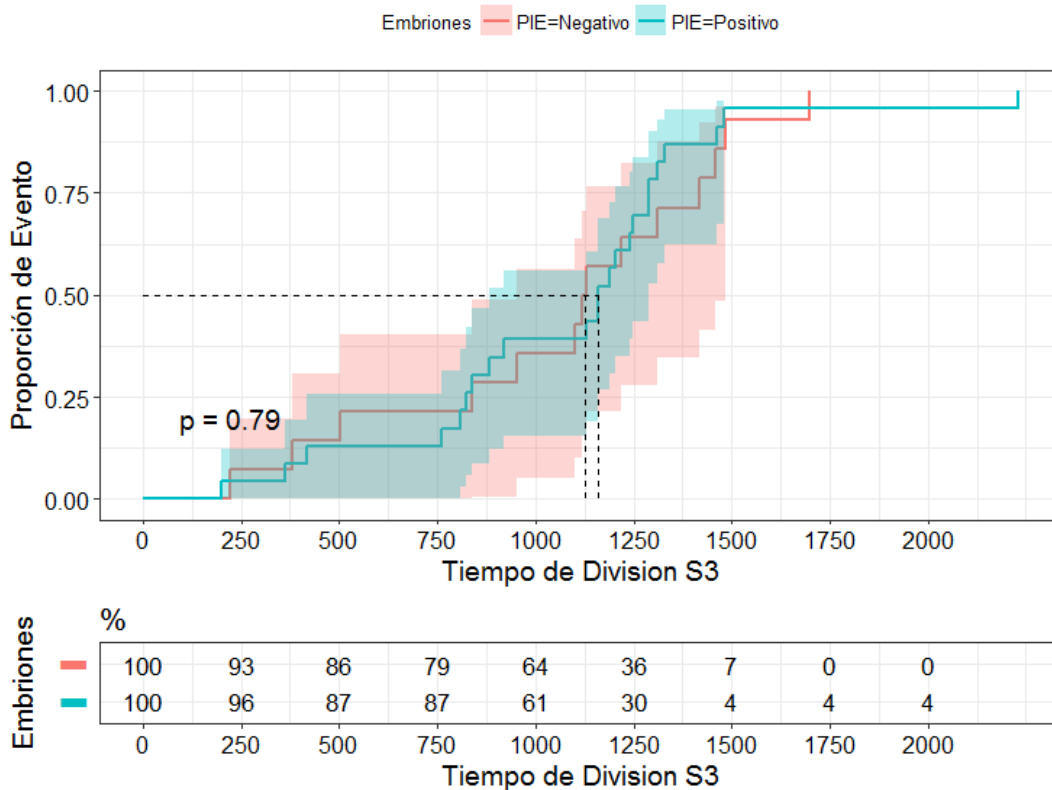


Gráfico 9. Curva de Kaplan para observar proporción de división celular A) y su relación con PIE Positivo B)

Como exploración adicional se evaluó la probabilidad de que ocurriera la división en relación al tiempo de secuencia celular vía curvas de Kaplan. Se observó que existía diferencia en la proporción siendo significativa la comparación con un T85% de 1000 minutos para la célula que se dividieron en S1 (**Gráfico 7**), en el mismo periodo de tiempo solo un 77% de células no efectuaría división en su serie. A pesar de que la prueba ROC no detecto S2 (**Gráfico 8**) como pronostica, observamos en el Kaplan que el T85% de división se alcanza en el minuto 500, y para las células que no continuaron división menos de la mitad experimentaron progresión. Se observaron diferencias de forma similar en la curva de Kaplan para S3 (**Gráfico 9**) teniendo que el T90% para división se encontraba en 1750 min, corte por sobre el cual menos del 30% de las otras células experimentarían progresión. De forma similar se exploró los

embriones que eventualmente tendrían PIE positivo, sin embargo, no se observaron tendencias en relación a las curvas de Kaplan. (Gráfico 7, 8 y 9)

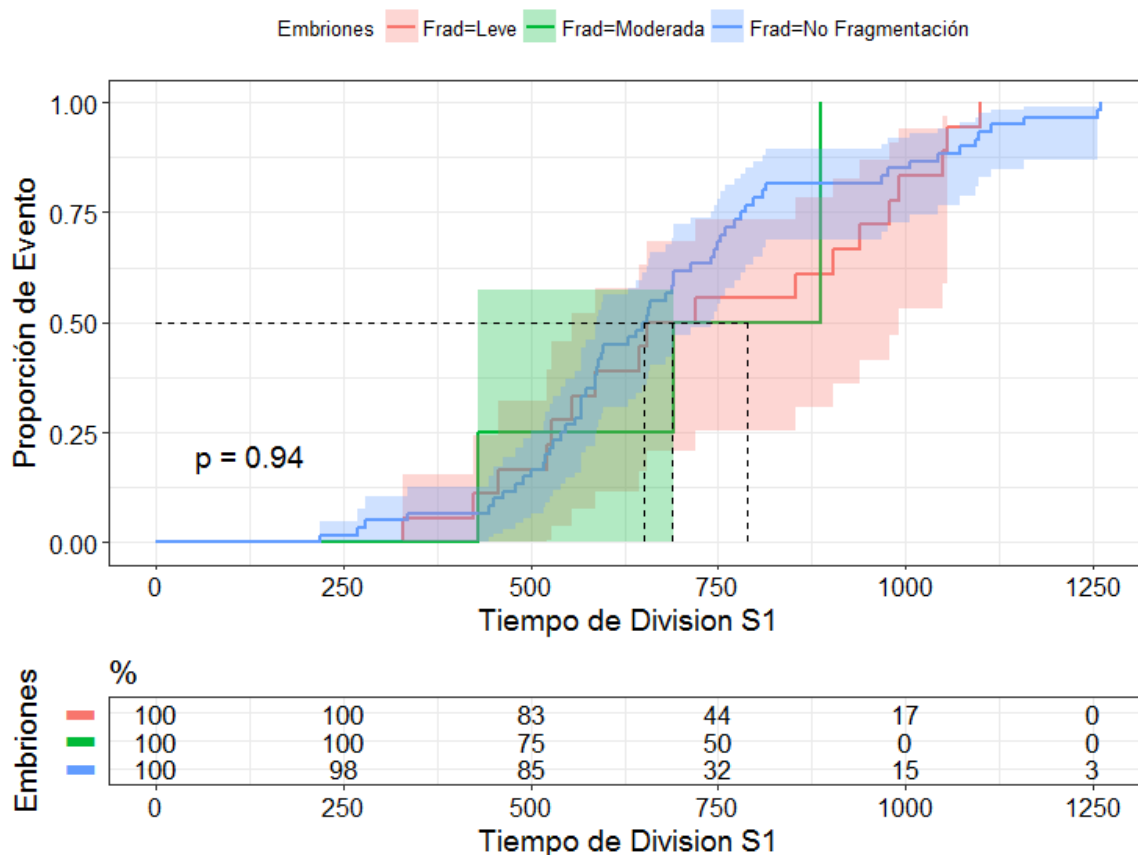


Gráfico 10. Curva de Kaplan para observar proporción de división celular y la distribución de eventos en relación a la fragmentación celular.

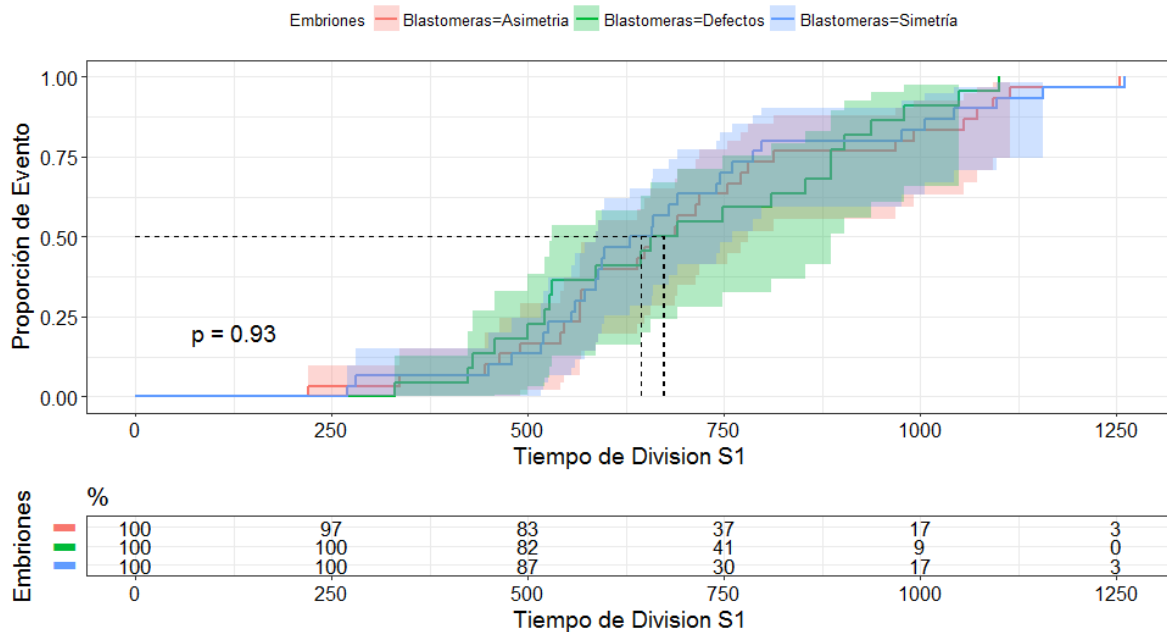


Gráfico 11. Curva de Kaplan para observar proporción de división celular y la distribución de eventos en relación a las blastómeras.

En cuanto a las incidencias de PIE positivo, se tuvo una proporción de resultados positivos del 60% (60.53%, $p=0.0147$, ODD 2.3511 IC 1.2268 - 4.5058), con un índice de éxito de 1: 2.51 (IC 1.1 - 2.13). En relación a las características de los embriones, se observó que el estado de asimetría observaba la mayor proporción de embarazos (47.83%, $p=0.0523$, ODD 3.0119 IC 1.0807 - 8.3938), además los embriones no fragmentados experimentarían una mejor tasa (76.09%, $p=0.4356$, ODD 1.5909 IC 0.5751 - 4.4006) de embarazo. El grupo de edad que mejor se relacionó a embarazo fue el menor de 30 años (23.91%, $p=0.0026$, ODD 9.4286 IC 1.1495 - 77.3348) con 1: 1.74 (IC 1.28 - 2.25) embriones, sin embargo, en pacientes de edades mayores a 38 años fueron requeridos hasta 12.03 (IC 1.59 - 6.07) embriones para lograr un embarazo. Además, el factor masculino solo se observó provocar un leve descenso en las incidencias (71.74%, $p=0.1642$, ODD 0.3905 IC 0.1138 - 1.3399)

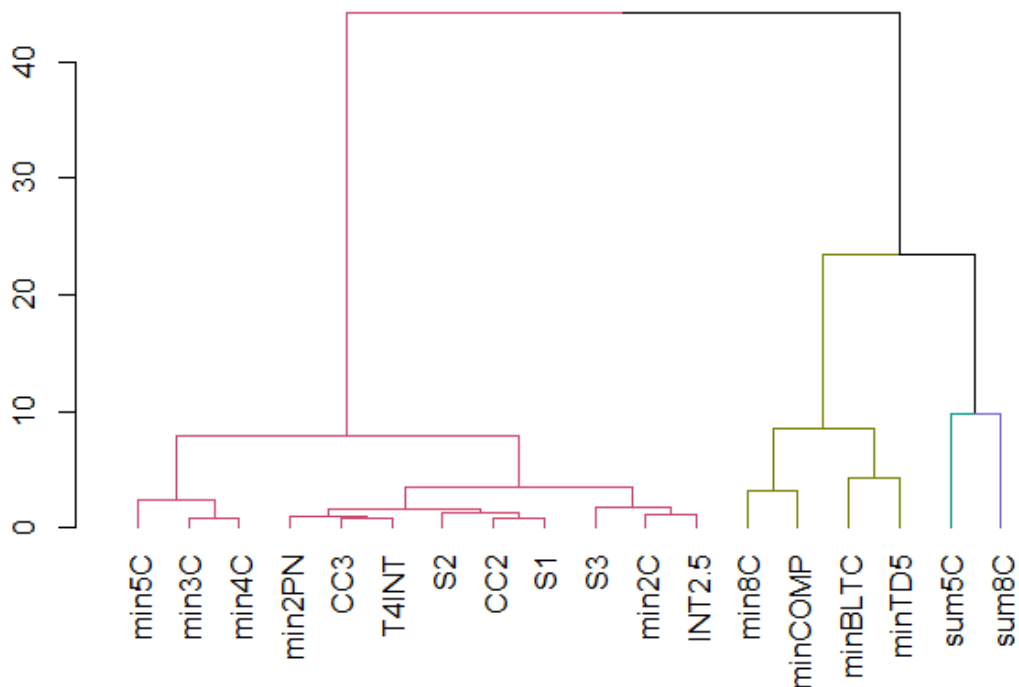


Gráfico 12. Representación del análisis de grupos, en función del tiempo, se ejemplifica en forma de dendograma para observar las relaciones entre los tiempos celulares. Se indica a los tiempos celulares S1, y S2 en la misma agrupación, junto con el resto de las estimaciones de ciclo celular, lo que nos indica que el pronóstico resultado de estos 2 tiempos puede ayudarnos a predecir el resto de los demás tiempos. Otra situación interesante es que los tiempos de 8 células, compactación y Blastocisto se agrupan en su sección aislada, indicando una dinámica celular muy diferente a las etapas iniciales del embrión.

10.0 DISCUSIÓN

La evaluación de los parámetros morfocinéticos valorados por tecnología timelapse para la selección embrionaria es un tema sumamente controversial, ya que existen resultados contradictorios acerca de que parámetro o parámetros morfocinéticos. Sin embargo, estas determinaciones nos puedan ayudar de una forma óptima en seleccionar el mejor embrión que pudiese evolucionar a blastocisto y que a su vez permita selección de embrión único para la transferencia.

Algunos autores apoyan su utilización como un método que nos ayuda a predecir tempranamente una formación de blastocisto. Los eventos dinámicos de las primeras 48 horas de incubación y valorando la morfocinética mediante tecnología timelapse correlaciona positivamente con la formación de blastocisto^{28,21,29,8} en los ciclos celulares primarios por ejemplo (cc2 y s2). En nuestro centro de fertilidad no existió diferencia en estos periodos de división celular, pero si hubo una tendencia positiva aunque no significativa en las etapas de divisiones tempranas, sobre todo en la primera sincronización celular (S1). Siendo por lo tanto un parámetro indispensable para considerar la formación de blastocisto.

En términos generales, el uso de monitorización externa por timelapse durante el desarrollo celular y su valoración morfocinética, parece tener un efecto benéfico de éxito como predictor, para poder llegar a la formación de blastocisto. Esto resulta al poder valorar de una forma cuantificable en relación al tiempo las características de su cinética celular y compararlas con las cuestiones morfológicas. Nosotros pudimos observar que los embriones no fragmentados se comportan de mejor manera al analizar la temporalidad de su división en relación al tiempo, lo que nos puede sugiere que pudiera existir una relación causa efecto entre fragmentación y retraso en tiempos celulares aunque no se hayan observado estas diferencias en las mediciones de sincronización celular

S1, S2 O S3.

Por otro lado, Conaghan et al.2013³⁰ utilizó la tecnología timelapse para medir el desarrollo embrionario temprano y generar predicciones de blastocisto utilizables para un día D3 en cuanto a la morfocinética; ellos observaron que la utilización de la clasificación morfológica vs morfología/morfocinética, ésta última mejora la capacidad de embriólogos para la selección embrionaria. Los embriólogos que usaban Eeva® en combinación con la morfología D3 mejoraron significativamente su capacidad de identificar embriones que alcanzan el estadio de blastocisto en etapas tempranas en relación a mejores tiempos morfocinéticos.³⁰ Estos mismos hallazgos se lograron reproducir en nuestro estudio.

Dentro de nuestros resultados encontramos que la presencia o ausencia de factor masculino no demostró diferencia entre grupos de estudio hacia la formación de blastocisto, a excepción de la morfología espermática que se vió significativamente disminuida en pacientes con óvulos homólogos. Este impacto puede estar afectado en este grupo de pacientes, secundario a un mayor estrés oxidativo relacionado a la edad materna y paterna o factores extrínsecos. Los resultados encontrados en la literatura señalan que tiempos de división más rápidos favorecen la evolución a mórula, blastocisto y blastocisto de buena calidad y embrión que implanta.¹⁵ Esto, se ha relacionado a que los embriones son gobernados fundamentalmente por el genoma materno, así que es cuestionable que sean representativos que las pacientes jóvenes poseen una mejor evolución, puesto que la activación del genoma embrionario humano sucede en etapas de división celular más tardías²⁷.

Dentro de los embriones que experimentaron división celular, se pudieron correlacionar los tiempos de replicación en sus diferentes intervalos y se exploró la muestra para datos pronósticos. Por lo tanto, se encontró un algoritmo en esta revisión, que predice que los embriones que sobrepasen los minutos en la

sincronización celular S1 (pronúcleos a 2 células), tendrán un pobre pronóstico de evaluación a blastocisto.

11.0 CONCLUSIONES

El presente trabajo cumplió con su objetivo principal de comparar el ritmo de división embrionaria a blastocisto en pacientes sometidas a reproducción asistida. A pesar de que no existieron diferencias en los tiempos de desarrollo desde pronúcleo hasta etapa de 8 células y posteriormente hasta blastocisto, se observa una tendencia hacia menores tiempos de desarrollo en ovocitos de pacientes donadoras. Así mismo, los ciclos de sincronización celular no mostraron diferencias, pero obtuvimos menores tiempos de división en ovocitos de donadoras, a excepción del ciclo S1. El origen del ovocito no fue un factor para determinar su comportamiento cinético, ya que no existieron diferencias en tiempos entre los óvulos provenientes de pacientes donadoras o no, sin embargo se observó una ligera tendencia sin diferencia significativa a registrar menores tiempos entre ovulos de donadores menores de 37 años. La presencia o ausencia de factor masculino no demostró diferencia entre grupos, a excepción de la cantidad de formas normales que se vió significativamente disminuida en pacientes con óvulos de no donadoras, probablemente por que son parejas de mayor edad.

Por otro lado se observó que de igual forma sin ser afectados por el factor masculino, los embriones no fragmentados se comportan de mejor manera al analizar la temporalidad de su división, lo que nos puede llevar a pensar que pudiera existir una relación causa efecto entre fragmentación y retraso en tiempos celulares aunque no se hayan observado estas diferencias en las medidas de sincronización celular S1, S2 O S3 pero sí en intervalos T4INT, Y INT2-5. Por otro lado, los embriones no fragmentados y los embriones con asimetría experimentaron mejores tasas de embarazo, por lo que podemos pensar que son observaciones importantes para hacer durante esta etapa de desarrollo para estimar si determinado embrión generará un blastocisto y llegar a predecir embarazo o no.

Otra observación generada a partir de este trabajo fue acerca de los arrestos en división, se pudo constatar que dentro de nuestra muestra los embriones que permanecen más de 785 minutos en S1 tienen un arresto en su división, y que del total de embriones, solamente 1 de cada 3.39 experimentará división.

Como observación final, las mejores tasas de embarazo las obtuvieron pacientes menores de 30 años de edad, determinando que cada paciente solamente necesita transferirse 2 embriones para generar un embarazo (1.74, IC 1.28-2.25), mientras que pacientes mayores de 38 años requieren de hasta 12 embriones para asegurar dicho desenlace.

Todas estas observaciones nos llevan a concluir que si bien, no existe una asociación significativa en relación a la edad de la mujer, procedencia del óvulo, presencia o ausencia de factor masculino que impacten en desarrollo morfocinético embrionario, la división celular si se vio afectada por factores como la fragmentación embrionaria o simetría y asimetría de las blastómeras. Esto nos invita a en un futuro poder realizar trabajos de investigación en donde se compare las características morfológicas comparando la morfocinética y ambas dos juntas, establecer su relación en relación a la edad y compararlos con estudios genéticos preimplantacionales, para poder obtener algún algoritmo predictor para embriones euploides y descartar los embriones aneuploides para transferir.

Por otro lado, se pueden tratar de hacer predicciones acerca del desenlace de un embarazo si conocemos el tipo de embriones a transferir, respecto a si estos están fragmentados o no y cuantos pudieran ser necesarios dependiendo de la edad de la paciente. Finalmente, se puede estimar si un embrión arrestará su desarrollo si este permanece más de 785 minutos en el ciclo S1. Al haber encontrado un patrón en relación al tiempo de división celular, nos hace pensar de que pudieran existir marcadores de expresión celular relacionados con la

proteómica y/o metabolómica, que se pudieran buscar intencionadamente en esta etapa para determinar que marcador en esta línea pudiera predecir la formación a blastocisto para poder llegar a la selección embrionaria para transferencia de embrión único.

12.0 BIBLIOGRAFÍA

1. Seli E, Vergouw CG, Morita H, et al. Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril*. 2010;94(2):535-542. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.03.078.
2. Martínez-núñez JM, Altagracia-martínez M, Kravzov- J, et al. por anovulación en un hospital público de México : estudio piloto Economic burden study of anovulation-related female infertility in a Mexican public hospital : A pilot study. 2012.
3. Committee P, Reproductive A, Committee P, Society A. Elective single-embryo transfer. *Fertil Steril*. 2012;97(4):835-842. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.11.050.
4. Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta*. 2011;32(SUPPL. 3):S252-S256. doi:10.1016/j.placenta.2011.07.009.
5. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CFL. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online*. 2013;26(5):477-485. doi:10.1016/j.rbmo.2013.02.006.
6. Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: Impact on implantation. *Reprod Biomed Online*. 2014;28(4):475-484. doi:10.1016/j.rbmo.2013.11.014.
7. Aparicio B, Cruz M, Meseguer M. Is morphokinetic analysis the answer? *Reprod Biomed Online*. 2013;27(6):654-663. doi:10.1016/j.rbmo.2013.07.017.
8. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1115-1121.

- doi:10.1038/nbt.1686.
9. Pennings G, De Wert G, Shenfield F, Cohen J, Tarlatzis B, Devroey P. ESHRE Task Force on Ethics and Law 15: Cross-border reproductive care. *Hum Reprod*. 2008;23(10):2182-2184. doi:10.1093/humrep/den184.
 10. Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obs Gynecol*. 1981;141(4):408-416. doi:0002-9378(81)90603-7 [pii].
 11. Hill G a, Freeman M, Bastias MC, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*. 1989;52(5):801-806. doi:10.1016/S0015-0282(16)61034-8.
 12. Remohi, J. (2013). Manual práctico de esterilidad y reproducción humana: laboratorio de reproducción asistida. McGraw-Hill Interamericana. 2013:2013.
 13. Torello, M. J., Ardoy, M., Calderón, G., Cuadros, J., Herrer, R., Moreno, J. M., ... & Ten, J. (2005, November). Criterios ASEBIR de valoración morfológica de Oocitos, Embriones tempranos y Blastocistos. In Proceedings of the 3rd ASEBIR Congress (pp. 17-18). 2005:2005.
 14. Campbell A. Time Lapse, the Cell Cycle, Distribution of Morphokinetic Timings, and Known Implantation Data. :4-9.
 15. Basile N, Vime P, Florensa M, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: A multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod*. 2015;30(2):276-283. doi:10.1093/humrep/deu331.
 16. Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(9):891-900. doi:10.1007/s10815-012-9818-7.
 17. Kaser DJ, Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Hum Reprod Update*. 2014;20(5):617-631. doi:10.1093/humupd/dmu023.

18. Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2012;25(5):474-480. doi:10.1016/j.rbmo.2012.07.016.
19. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*. 1997;12(3):532-541. doi:10.1093/humrep/12.3.532.
20. Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, et al. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet*. 2013;30(5):703-710. doi:10.1007/s10815-013-9992-2.
21. Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjær JJ, Ingerslev HJ. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: A prospective cohort study. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2643-2651. doi:10.1093/humrep/det300.
22. Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod*. 2012;27(9):2649-2657. doi:10.1093/humrep/des210.
23. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(3):385-391. doi:10.1016/S1472-6483(10)60222-2.
24. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remoh J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod*. 2011;26(10):2658-2671. doi:10.1093/humrep/der256.
25. Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(1):54. doi:10.1186/1477-7827-12-54.
26. Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse

- imaging. *Fertil Steril.* 2012;97(2):332-337. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.11.042.
27. Herrero J, Meseguer M. Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: The era of morphokinetics. *Fertil Steril.* 2013;99(4):1030-1034. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.01.089.
 28. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online.* 2012;25(4):371-381. doi:10.1016/j.rbmo.2012.06.017.
 29. Milewski R, Ku?? P, Kuczy??ska A, Stankiewicz B, ??ukaszuk K, Kuczy??ski W. A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2015;32(4):571-579. doi:10.1007/s10815-015-0440-3.
 30. Conaghan J, Chen AA, Willman SP, et al. Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: Results from a prospective multicenter trial. *Fertil Steril.* 2013;100(2):412-419.e5. doi:10.1016/j.fertnstert.2013.04.021.
 31. Cetinkaya M, Pirkevi C, Yelke H, Colakoglu YK, Atayurt Z, Kahraman S. Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. *J Assist Reprod Genet.* 2014;32(1):27-35. doi:10.1007/s10815-014-0341-x.
 32. Chavez SL, Loewke KE, Han J, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun.* 2012;3:1251. doi:10.1038/ncomms2249.
 33. Latinoamericana R. Manual de procedimientos de Laboratorio de Reproducción Asistida. *Red Latinoam.* 1998.

13.ANEXOS

Tabla 1. Ciclos Celulares

		Donadora Media, DE	No Donadora Media, DE	t-test	p. val
2 Pronúcleos	min	1501 ±434.9	1539.14 ±149.13	-0.862	0.391
2 Células	min	2031.66 ±491.63	2055.84 ±279.26	-0.571	0.569
3 Células	min	2244.75 ±528.79	2356.64 ±318.65	-0.284	0.777
4 Células	min	2983.13 ±625.89	3017.82 ±457 4149.64	-1.197	0.235
5 Células	min	4034.31 ±561.56	±643.46 5364.52	-0.29	0.773
8 Células	min	5076.44 ±690.49	±611.67 6767.68	-0.831	0.408
Compactación	min	6511.38 ±688.54	±635.55 1539.14	-1.978	0.051
Blastocisto	min	1501 ±434.9	±149.13	-1.724	0.089
	S1 min	708.88 ±284.82	698 ±200.24	0.203	0.84
	S2 min	213.09 ±149.52	300.8 ±243.4	-1.827	0.071
	S3 min	1051.19 ±437.36	1131.82 ±452.3	-0.798	0.427
	CC2 min	530.66 ±177.85	516.7 ±218.19	0.303	0.763
	CC3 min	951.47 ±353.93	961.98 ±336.35	-0.135	0.893
	T4INT min	738.38 ±357.91	661.18 ±263.79 1478.68	1.123	0.265
	INT2.5 min	1482.13 ±438.95	±380.67	0.038	0.97

Tabla 2. Demografía espermograma

	Donadora Media, DE	No Donadora Media, DE	t-test	p. val
VOL	3.34 ±1.98	2.86 ±2.59	0.372	0.897
CONC	56.47 ±42.31	46.89 ±38.36	0.333	0.976
MOT	37.94 ±16.02	31.56 ±20.08	0.134	1.514
FN	2.16 ±1.57	1.42 ±1.6	0.044	2.045
CTM	76.06 ±76.1	54.4 ±68.35	0.184	1.339

Tabla 3. Ciclos Celulares

	Simetría Media, DE	Asimetría Media, DE	Defectos Media, DE	F	p. val
2 Pronúcleos	800.97, ±245	788.3, ±227.69	896.64, ±282.7	1.363	0.262
2 Células	1493.8, ±278.94	1499.9, ±272.19	1599, ±338.61	0.977	0.381
3 Células	2034.7,	1974.27, ±369.38	2160.73, ±438.71	1.626	0.203

	±315.09				
4 Células	2323.97, ±394.69	2250.37, ±379.8	2383.36, ±485.84	0.666	0.517
5 Células	2956.43, ±428.65	2895.6, ±418.31	3217.73, ±709.55	2.684	0.075
8 Células	3994.47, ±538.85	4070.17, ±486.34	4301.86, ±810.3	1.706	0.188
Compactacion	5214.47, ±486.94	5129.8, ±785.59	5470.18, ±633.25	1.83	0.167
Blastocisto	6555.67, ±401.75	6528.93, ±762.79	7009.55, ±713.52*	4.318	0.017
S1	692.83, ±240.15	711.57, ±245.18	702.36, ±224.76	0.046	0.955
S2	289.27, ±194.37	276.1, ±260.08	222.64, ±172.97	0.65	0.525
S3	1038.03, ±436.84	1174.57, ±346.9	1084.14, ±567.77	0.719	0.49
CC2	540.9, ±176.1	474.37, ±243.24	561.73, ±167.39	1.4	0.253
CC3	921.73, ±232.86	921.33, ±333.43	1057, ±454.44	1.278	0.284
T4INT	632.47, ±257.92	645.23, ±227.21	834.36, ±405.5*	3.547	0.033
INT2.5	1462.63, ±300.32	1395.7, ±342.32	1618.73, ±552.68	2.052	0.135

Tabla 4. Ciclos Celulares

	No Fragmentación	Leve	Moderada	F	p. val
	Media, DE	Media, DE	Media, DE		
2 Pronúcleos	796.35, ±235.42	908.72, ±308.53	816.5, ±98.73	1.405	0.251
2 Células	1486.33, ±275.13	1647.17, ±350.6	1540, ±148.7	2.143	0.124
3 Células	1980.63, ±340.4*	2249.22, ±445.49	2120.25, ±176.68	3.917	0.024
4 Células	2251.97, ±384.84	2529.72, ±483.88*	2252.75, ±169.56	3.342	0.04
5 Células	2895.85, ±434.97*	3303.39, ±706.54	3284.75, ±200.9	5.255	0.007
8 Células	3973.38, ±548.86*	4410.78, ±664.14	4695.75, ±557.75	6.208	0.003
Compactación	5144.5, ±628.09	5520.39, ±715.72	5658.75, ±179.45*	3.265	0.043
Blastocisto	6546.35, ±592.67*	7041.78, ±822.03	6803.75, ±166.35	4.252	0.018
S1	689.98, ±235.23	738.39, ±247.56	723.5, ±216.59	0.305	0.738
S2	271.33, ±223.36	280.5, ±206.51	132.5, ±17.06	0.826	0.441
S3	1077.53, ±416.01	1107.39, ±539.75	1411, ±407.94	1.055	0.353
CC2	494.3, ±212.4	602.06, ±167.63	580.25, ±29.23	2.2	0.118
CC3	915.22, ±281.06	1054.17, ±502.91	1164.5, ±84.92	1.965	0.147
T4INT	643.88, ±239.01	773.67, ±446.57	1032, ±70.82*	4.205	0.018
INT2.5	1409.52, ±324.1	1656.22, ±579.95	1744.75, ±84.01*	3.764	0.027

Tabla 5. Ciclos Celulares

	No Fragmentación	Leve	Moderada	F	p. val
	Media, DE	Media, DE	Media, DE		
2 Pronúcleos	796.35, ±235.42	908.72, ±308.53	816.5, ±98.73	1.405	0.251
2 Células	1486.33, ±275.13	1647.17, ±350.6	1540, ±148.7	2.143	0.124
3 Células	1980.63, ±340.4*	2249.22, ±445.49	2120.25, ±176.68	3.917	0.024
4 Células	2251.97, ±384.84	2529.72, ±483.88*	2252.75, ±169.56	3.342	0.04
5 Células	2895.85, ±434.97*	3303.39, ±706.54	3284.75, ±200.9	5.255	0.007
8 Células	3973.38, ±548.86*	4410.78, ±664.14	4695.75, ±557.75	6.208	0.003
Compactación	5144.5, ±628.09	5520.39, ±715.72	5658.75, ±179.45*	3.265	0.043
Blastocisto	6546.35, ±592.67*	7041.78, ±822.03	6803.75, ±166.35	4.252	0.018
S1	689.98, ±235.23	738.39, ±247.56	723.5, ±216.59	0.305	0.738
S2	271.33, ±223.36	280.5, ±206.51	132.5, ±17.06	0.826	0.441
S3	1077.53, ±416.01	1107.39, ±539.75	1411, ±407.94	1.055	0.353
CC2	494.3, ±212.4	602.06, ±167.63	580.25, ±29.23	2.2	0.118
CC3	915.22, ±281.06	1054.17, ±502.91	1164.5, ±84.92	1.965	0.147
T4INT	643.88, ±239.01	773.67, ±446.57	1032, ±70.82*	4.205	0.018
INT2.5	1409.52, ±324.1	1656.22, ±579.95	1744.75, ±84.01*	3.764	0.027