



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PARAMETROS MORFOCINÉTICOS DE EMBRIONES EN D+3 EVALUADOS MEDIANTE TIME-LAPSE FAVORABLE PARA LA FORMACIÓN DE BLASTOCISTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**BIOLOGO DE LA REPRODUCCIÓN
HUMANA**

PRESENTA :

**DEMETRIO EDGAR ZERTUCHE
GONZÁLEZ**

Facultad de Medicina



DIRECTOR DE TESIS:
DR. ERNESTO PÉREZ LUNA

Zapopan, Jalisco, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE GENERAL

Resumen	iii
Abreviaturas	iv
Introducción	v
Capítulo 1: Antecedentes	1
Capítulo 2: Problema de estudio	10
2.1 Planteamiento del problema.....	10
2.2 Justificación	11
2.3 Objetivos	11
2.3.1 General	11
2.3.2 Específicos.....	12
Capítulo 3: Material y Métodos.....	12
3.1 Metodología.....	12
3.1.2 Tipo de diseño y estudio	12
3.1.3 Lugar en dónde se desarrolló el estudio	12
3.1.4 Población de estudio	12
3.2 Criterios de selección	12
3.2.1 Criterios de inclusión.....	12
3.2.2 Criterios de exclusión.....	12
3.2.3 Criterios de eliminación.....	12
3.3. Variables de estudio.....	13
3.4 Análisis estadístico	14
3.5 Tamaño de muestra	14
Capítulo 4: Aspectos éticos	15
Resultados	15
Conclusión	20
Discusión	22
Bibliografía	24
Anexos	28

RESUMEN

OBJETIVO: Con este estudio se busca identificar los parámetros morfocinéticos del desarrollo embrionario mediante seguimiento en tiempo real con incubadora de Time-Lapse (ESCO) hasta el día tres del desarrollo que sean favorables para la formación de blastocisto en la unidad de embriología en el Instituto en Ciencias en Reproducción Humana Vida en el Centro Médico Puerta de Hierro en el periodo Marzo 2017 a Junio 2017.

DISEÑO DE ESTUDIO: Se realizó un estudio Observacional, Descriptivo, Retrospectivo, se analizaron un total de 288 embriones, en un total de 26 pacientes con infertilidad y que requirieran técnicas de reproducción asistida de alta complejidad.

RESULTADOS: Se registran 194 embriones con criterios de inclusión, excluyendo 94 embriones, con media de edad de las pacientes de 36.3 años. Se observó una diferencia estadística significativa en los tiempos de desarrollo en 7 de las 9 variables estudiadas siendo estos PNd, t2, t3, t5, t6, CC2, S2 y observándose una mayor peso estadístico en CC2 ($p 0.0011$) y S2 ($p 0.0118$). Los valores que no se observó diferencia estadística significativa fueron PNa ($p 0.1879$) y t4 ($p 0.922$).

CONCLUSIONES: La evaluación morfocinética a comparación con la morfológica es una herramienta valiosa para la toma de decisiones respecto a la extensión del tiempo de cultivo de los embriones a etapa de blastocisto ya que de manera directa se puede valorar el tiempo de cada una de las etapas así como divisiones anómalas y con esto poder diferenciar los embriones que no tuvieron buen desarrollo y con bajas probabilidades de formar blastocisto que pudieran ser vitrificados o transferidos en D+3 con aquellos embriones que en base a los tiempos de desarrollo se pueden dejar a etapa de blastocisto obteniendo buenas tasas de formación de blastocisto y lo cual posibilita la transferencia de embriones únicos con mejora en las tasas de embarazo.

PALABRAS CLAVE: Time-Lapse, morfocinética, favorable, blastocisto.

Abreviaturas

FIV: Fertilización *in vitro*

ICSI: intra cytoplasmatic sperm inyection

TL: Time-Lapse

LED: light-emitting diode

pH: Potencial de hidrogeno

ESHRE: European Society of Human Reproduction

PNB: pronucleos

PF: post fertilization

IVI: Instituto Valenciano de Infertilidad

OR: Odds ration

IC: intervalo de confianza

PGS: Preimplantation genetic screening

ASRM: American Society of Reproduction Medicine

SART: Society for Assisted Reproductive Technology

BL: Blastocisto

NV: No viable

SD: Desviación estándar

UK: United Kingdom

PNa: aparición de pronúcleos

PNd: desaparición de pronúcleos

SEM: error standard de la media

INTRODUCCIÓN

Desde la década de los 70s y el nacimiento del primer neonato por FIV, Louise Brown, ha habido un considerable aumento en los avances tecnológicos que han afectado la embriología clínica, como avances en medios de cultivo y condiciones ambientales de incubadoras y la revolución dada con la llegada de ICSI y la biopsia embrionaria. La incubación de embriones es un paso crítico en los procedimientos de fertilización in vitro, la fecundación y posterior cultivo de embriones se ha movido desde el tubo de ensayo a la placa de Petri en incubadoras de cultivo convencionales. El seguimiento embrionario se daba extrayendo los embriones de las incubadoras para ser observados bajo microscopio hasta el momento de la transferencia o congelación. Esta práctica expone a los embriones a las condiciones potencialmente sub óptimas del ambiente fuera de la incubadora y el manejo humano. Las nuevas tecnologías de TL incluye la introducción de sistemas de incubación seguros y sellados, donde los embriones pueden permanecer intactos durante varios días mientras son monitoreados por imágenes de alta frecuencia en un lapso de tiempo determinado. Todo esto con el propósito de mejorar sus condiciones y darle más posibilidades de un mejor desarrollo con embriones de mejor calidad con posibilidad de mayor número de blastocistos y aumento de tasas de embarazo. Aunado a estos desarrollos tecnológicos se ha desarrollado distintos modelos de desarrollo embrionario destinados a evaluar cuales son los embriones con mejores posibilidades de desarrollar blastocistos así como en base a esas mismas observaciones y clasificaciones cuales son los embriones clasificables con la mayor posibilidad de generar un embarazo. En estudios se ha demostrado esto con valores tan significativos como tasas de embarazo para embriones de baja puntuación de 15% comparado con aquellos con alta puntuación con 37%. Así también puntuaciones para aneuploidias con aquellos de bajo riesgo con tasas de embarazo de 71% comparado con los de alto riesgo. Aunado a esto se espera a su vez disminuir el número de embriones transferidos pudiendo llegar a la transferencia de embrión único seleccionado por TL el cual además de disminuir las tasas de embarazo múltiple disminuye considerablemente los costos.

1. ANTECEDENTES

Desde la década de los 70s y el nacimiento del primer neonato por FIV, Louise Brown, ha habido un considerable aumento en los avances tecnológicos que han afectado la embriología clínica, como avances en medios de cultivo y condiciones ambientales de incubadoras y la revolución dada con la llegada de ICSI y la biopsia embrionaria (1). Durante los últimos años, se ha puesto a disposición una nueva tecnología que ya proporciona información importante sobre la dinámica de la división de embriones humanos pre implantados y cultivados in vitro; Y, lo que es más importante, la evidencia se está reuniendo para lograr aumentos cuantitativos en la incidencia del embarazo. La incubación de embriones es un paso crítico en los procedimientos de fertilización in vitro (2). La fecundación y posterior cultivo de embriones se ha movido desde el tubo de ensayo, mantenido en desecadores de vidrio sellados en "gabinetes de calentamiento", a la placa de Petri en incubadoras de cultivo convencionales (Fishel y Edwards, 1982, Steptoe y Edwards , 1978), siendo este último utilizado clínicamente en todo el mundo durante más de tres décadas (3).

El desarrollo de embriones en placas de cultivo en una incubadora es un proceso dinámico que va desde la fertilización a la etapa de división hasta la formación de blastocisto en algunos casos (2). Tradicionalmente, los controles se han logrado mediante la extracción física de los embriones del ambiente controlado de la incubadora para analizarlos bajo un microscopio óptico para evaluar el desarrollo y la calidad del embrión (4). Esta práctica expone a los embriones a las condiciones potencialmente sub óptimas del ambiente fuera de la incubadora y el manejo humano (5).

Las imágenes por Time-Lapse de embriones se han usado desde 1900s para el estudio de la fertilización y la embriocinética (6). En el año 1926 Lewis & Gregory realizan la visualización cinematográfica de embriones de ratón donde describen el tiempo exacto de las diferentes divisiones celulares así como las características de la misma (7). En el año 2010 fue reportado por Pribenszky col. el primer recién nacido

vivo de un embrión seguido por TL, y a partir de esa fecha la utilización de TL se ha convertido en una herramienta en el campo de la fertilidad destinada a evaluar las características de división celular y obtener una clasificación embrionaria más precisa (8).

Las nuevas tecnologías de TL incluye la introducción de sistemas de incubación seguros y sellados, donde los embriones pueden permanecer intactos durante varios días mientras son monitoreados por imágenes de alta frecuencia en un lapso de tiempo determinado. A diferencia de las observaciones diarias convencionales, la tecnología de TL proporciona muchos cientos de imágenes y permite el marcado de tiempos precisos de acontecimientos claves en el desarrollo del embrión, la revisión prospectiva de los patrones de división y la detección de breves pero significativos y críticos cambios. Estas numerosas imágenes están vinculadas por el software como un video de desarrollo progresivo de embriones durante varios días y se muestra en pocos minutos. Al archivar el rendimiento de cada embrión, se puede construir una base de datos de TL. Las imágenes pueden ser reevaluadas y los datos analizados retrospectivamente a la luz del destino del embrión y el resultado obtenido (1).

Cuatro sistemas de TL existen actualmente en los cuales presentan ciertas variaciones en sus características:

Primo Vision (Vitro Life, Suecia). Es un sistema modular que se introduce en incubadora estándar que se conecta a una unidad de control fuera de la incubadora para la monitorización embrionaria continua, tiene la capacidad de albergar un número máximo de embriones por placa de 9 o 16, con un sistema de cultivo grupal y el cual puede albergar un total de 54 o 96 embriones por sistema, a su vez cuenta con un total de 11 planos focales y toma de imágenes con frecuencia de 5 minutos iluminados con tecnología LED verde (550 nm).

Eeva (Auxogyn, Estados Unidos). Del acrónimo (Early Embryo Viability Assessment) es un sistema modular que es colocado dentro de una incubadora convencional, con capacidad de monitorizar un total de 12 embriones por placa con un sistema de cultivo

grupales y que puede albergar un total de 48 embriones por sistema, con un plano focal y toma de imágenes cada 5 minutos así como toma de imágenes en campo oscuro.

EmbryoScope (FertilyTech, Dinamarca). Incubadora de microscopio de unidad independiente con capacidad de monitorizar 12 embriones por placa y con un sistema de cultivo individual, y con un total de 72 embriones por sistema, 9 planos focales e intervalos de toma de imágenes de 10 minutos o cada 2 minutos con enfoque único, iluminación LED rojo (635 nm), tiene opción de monitorización remota en tiempo real así como opción de monitorizar diferentes incubadoras de diferentes centros en un mismo sitio.

Miri (Esco, Dinamarca). Tiene 6 cámaras de cultivo completamente separadas , cada una para 14 embriones con un capacidad total de 84 embriones. Los cultivos se llevan en cámara llamada “Moneda de cultivo” que tiene cámaras individuales. El calentamiento de la placa es directo y lleva 1 minuto. Cuenta con mezcla de gases que el sistema permite recuperar los niveles en un lapso de 3 minutos posterior a ser abierta la cámara. Cada compartimento tiene una sonda PT-1000 incorporada para la validación de la temperatura, y un puerto de sensor de pH. La monitorización se realiza mediante múltiples planos de enfoque con tomas de imagen cada 5 minutos. La interacción con la incubadora es mediante una pantalla “touch” incorporada de tecnología LED de alta definición (1).

La capacidad de adquirir imágenes secuenciales, fotográficas en lapsos de tiempo de los embriones se está convirtiendo rápidamente en una potente herramienta no invasiva de monitoreo y selección de embriones (6).

Desde el inicio en el desarrollo de embriones en cultivo han existido diferentes criterios de evaluación embrionaria estática y variantes de los mismos dependiendo del país y la institución que evaluara, no fue hasta el año 2010 en Estambul, Turquía en donde en conjunto los grupos ALPHA Executive y ESHRE en respuesta a sugerencias y solicitudes ven la necesidad de un consenso internacional en donde la meta final fue

establecer criterios comunes y terminología de los grados de ovocitos, cigotos y embriones que pudieran ser aplicables rutinariamente en laboratorios de FIV. Se estableció un consenso sobre los tiempos de observación de ovocitos y embriones fertilizados y se consideró crítico para la capacidad de comparar resultados entre diferentes laboratorios. Los controles recomendados, en horas, después de la inseminación son:

- Revisión de fertilización a las 17 horas, revisión de la singamia a las 23 horas;
- Revisión de división temprana a las 26 horas de la inyección intracitoplasmática de esperma (ICSI) o 28 horas después de la FIV;
- Evaluación del embrión del día 2 a las 44 horas;
- Evaluación del embrión día 3 a las 68 horas;
- Evaluación del embrión del día 4 a las 92 horas;
- Evaluación del embrión del día 5 a las 116 horas (4).

Respecto a la evaluación morfocinética comparada con la evaluación morfológica aún no existe un consenso respecto a los parámetros a evaluar y han surgido un número considerable de parámetros desde evaluación de pronúcleos hasta el desarrollo de blastocisto. En un estudio realizado en la clínica de fertilidad de Holbaeck, Dinamarca en el cual buscan correlacionar el impacto de la morfología de los pronúcleos en los resultados de nacidos vivos en el que se estudió 159 embriones seguidos con TL y seguimiento posterior a transferencia observaron que ningún embrión con PNB antes de 20 h 45 min resultó en nacido vivo. Los seis modelos de evaluación PN no mostraron una distribución significativa de las puntuaciones ($P = 1/4$ NS) entre los nacidos vivos y los no nacidos vivos a las 16 h después de la fertilización (PF), 18 h PF y 40 min antes del PNB. Los resultados de las evaluaciones cambiaron significativamente ($P = 0,001$) con el tiempo y el tiempo de PNB se encontró que era la etapa óptima para evaluar la morfología de PN. La morfología de PN cambia con el tiempo, lo que indica que el enfoque de observación de microscopía de luz única es deficiente en comparación con TL. Aunque la evaluación de la morfología de PN no

mejora la selección de embriones, el momento de PNB debe ser incluido en los parámetros de selección de embriones (9).

A su vez se han hecho estudios en los cuales mediante la evaluación morfocinética se busca la relación con euploidia, un estudio realizado en el IVI España en el cual se analizaron un total de 504 embriones mediante TL realizando un análisis de regresión logística y se identificó t5 t2 (odds ratio [OR] 1/4 2.853, intervalo de confianza del 95% [IC], 1.763-4.616), seguido de cc3 (OR 1/4 2.095; IC del 95%, 1.356-3.238) como las variables más relevantes relacionadas con el contenido cromosómico normal. En base a estos resultados, se propone un algoritmo para la selección de embriones para clasificar los embriones de A - D. Cada categoría exhibió diferencias significativas en el porcentaje de embriones normales (A, 35,9%, B, 26,4%, C, 12,1%, D , 9,8%). A esto concluyen que anomalías cromosómicas y embriones anormales tienen diferente comportamiento cinético. Sobre la base de estas diferencias, proponen un algoritmo que sirve como una herramienta para clasificar los embriones y para aumentar la probabilidad de selección no invasiva de embriones normales (10). A su vez la relación existente con el adecuado desarrollo embrionario respecto a las tasas de embarazo se ha visto en diferentes estudios, uno realizado en España en el cual buscaron mejorar las tasa de embarazo mediante la selección embrionario por TL en un estudio retrospectivo de 1390 embriones se utilizó un análisis de regresión logística, que incluyó todos los factores de confusión significativos, para evaluar el efecto de cultivar y seleccionar embriones con el uso de TL. La comparación de las tasas de embarazo clínico por recuperación de ovocitos con TMS y SI tratamientos dio un efecto bruto de odds ratio [OR] 1,190 (95% intervalo de confianza [IC] 1,058-1,337). La fuente de ovocitos, la edad materna, el día de transferencia y el número de ovocitos recuperados fueron identificados como factores de confusión significativos. Después de explicar los factores de confusión, el efecto del cultivo de TL fue de OR 1.201 (IC del 95%: 1.059-1.363). Limitar el análisis a los tratamientos con transferencia de embriones e incluir el número de embriones transferidos como factor de confusión produjo asimismo un efecto significativo del TL con OR 1.157 (IC del 95%: 1.018-1.315). El análisis de los datos retrospectivos indicó que el cultivo y la selección de embriones por TMS mejoró

significativamente la probabilidad relativa de embarazo clínico (+20.1% por recuperación de ovocitos, +15.7% por transferencia de embriones). La elevada tasa de embarazos clínicos se atribuyó a una combinación de condiciones de cultivo estables y el uso de parámetros morfocinéticos para la selección de embriones (11). También existen algunos dispositivos los cuales ya mediante análisis computacional realizan una clasificación morfocinética con parámetros previamente establecidos por la propia empresa creadora.

Un estudio realizado en USA mediante el sistema TL Eeva System el cual los divide en tres categorías dependiendo su puntuación y de acuerdo con el potencial de implantación (alto, medio y bajo). En dicho estudio se incluyeron 250 pacientes de los cuales se realizó transferencia de un total de 375 embriones, observándose una mayor tasa de implantación en los embriones con puntuación alta y media, comparado con los de puntuación baja (37% y 35% contra 15%; $P < 0.0001$; $P = 0.0004$). A su vez observaron que las pacientes que tenían al menos un embrión transferido con puntuación alta tenían mayores tasas de embarazo clínico comparada con aquellas con transferencia de embriones de puntuación baja (51% contra 34%; $P = 0.02$). Concluyen que los resultados obtenidos en este estudio son comparables con los de otros centros y que los datos analizados por este sistema están en relación con la implantación de embriones y embarazo clínico (12). A su vez también existen algunos estudios en los cuales no se logra demostrar la mejoría de resultados globales. En una revisión retrospectiva realizada en UK publicada en Chocrane Library en el cual se incluyeron 3 estudios que cumplían con todas las características de elegibilidad incluyendo 994 mujeres, en un estudio se reporta la tasa de embarazo sin diferencias concluyentes entre TL y cultivo convencional (OR 1.1, 95% CI 0.45 to 2.73, 1 RCT, n = 76, (evidencia de calidad moderada). En los tres estudios se reporta los abortos sin diferencias significativas (OR 0.70, 95% CI 0.47 to 1.04, 3 RCTs, n = 994, $I^2 = 0\%$, evidencia de baja calidad). Un estudio reporta tasa de nacido si encontrarse diferencia significativa en ambos grupos (OR 1.0, 95% CI 0.13 to 7.49, 1 RCT, evidencia de calidad moderada). Los tres estudios reportan tasas de embarazo sin encontrarse

evidencia conclusiva de diferencia entre TL y cultivo convencional, OR 1.23, 95% CI 0.96 to 1.59, 3 RCTs, n = 994, $I^2 = 0\%$, evidencia de baja calidad) (2).

Se han realizado estudios en los cuales se realizan modelos de selección embrionaria en los cuales se busca clasificar los riesgos de aneuploidia de los embriones sin la realización de PGS, ya que es bien sabido que las aneuploidias embrionarias es una causa importante de fracaso de FIV. Un estudio realizado en UK en el cual se realizó de manera retrospectiva en 69 parejas de diferentes centros la aplicación del modelo de aneuploidia ya que se ha correlacionado con variables morfocinéticas específicas utilizadas previamente para el desarrollo de un modelo de clasificación de riesgo de aneuploidias el cual divide en 3 categorías (bajo, moderado y alto), con el objetivo de evaluar la efectividad y el potencial de dicho modelo. Se estudió un total de 88 blastocistos transferidos y observándose una diferencia significativa entre las tasas de latido cardíaco fetal ($P < 0,0001$) y nacidos vivos ($P < 0,01$) entre los embriones clasificados con bajo y mediano riesgo. Dentro de los de bajo riesgo se observaron aumentos relativos de 74% y 56% en comparación con la tasa de todos los blastocistos para latido cardíaco fetal y nacido vivo respectivamente y demostrándose la relevancia clínica del modelo de clasificación de riesgo de aneuploidia e introduce un nuevo método no invasivo de selección de embriones para producir mayores tasas de implantación y nacidos vivos sin PGS (13).

En el año 2014 se publica un estudio el cual tiene el objetivo de proponer directrices sobre la nomenclatura de los parámetros morfocinéticos y cómo deben anotarse uniformemente. Ellos utilizaron las características morfológicas de las observaciones estáticas establecidas por los consorcios ALPHA y ESHRE como referencias y publicaciones y resúmenes como recurso. Estos parámetros rastrean el desarrollo de embriones producidos a partir de ovocitos frescos, o crioconservados, luego calentados / descongelados, y siguen su desarrollo hasta que se completa el cultivo in vitro (hasta la fase de blastocisto). Aquí mismo refieren que los usuarios con intereses especializados pueden optar por anotar con mayor detalle durante determinados períodos de desarrollo del embrión y que, para fines prácticos, el número de

parámetros anotados rutinariamente puede necesitar ser racionalizado por los profesionales (4).

En cuanto a la transferencia embrionaria debido a la llegada de TL también se ha podido hacer nuevos protocolos los cuales proponen la transferencia de embrión único seleccionado con lo cual se disminuirá la cantidad de embriones transferidos por paciente así como la tasa de embarazos múltiples. Esto a su vez serviría para cambiar ciertos consensos tales como el publicado en un comité de opinión de ASRM/SART el cual fue realizado con el objetivo de reducir el número de embarazos múltiples y que da las siguientes recomendaciones:

A) Pacientes menores de 35 años con buen pronóstico ofrecer transferencia de embrión único y no más de dos embriones en etapa de división.

B) Pacientes entre 35 y 37 años con pronóstico favorable no más de 2 embriones en etapa de división. Cualquier otra condición no as de 3 embriones en etapa de división. Si se realiza cultivo extendido no más de dos blastocistos.

C) Entre 38 y 40 años con pronóstico favorable, no más de 3 embriones en etapa de división o dos blastocistos. Cualquier otro no más de cuatro embriones en etapa de división o 3 blastocistos.

D) Pacientes entre 41 y 42 años, no más de cinco embriones en etapa de división o tres blastocistos (14).

En base a los resultados obtenidos en cuanto a número de embriones y costos de procedimientos han surgido diversos estudios en los cuales tratan de demostrar que debido a los avances tecnológicos actualmente debe haber una tendencia aun mayor a la transferencia de embrión único. En un estudio realizado en el cual se buscó evaluar los resultados en cuanto a costos y tasa de embarazos en pacientes que se realizan transferencia de embriones dobles y transferencia de embriones únicos secuenciales. Se evalúa un total de 4,129 embriones transferidos para el grupo de embrión único y 10,001 para el grupo de embriones dobles, y se demostró que el costo para los embriones dobles fue de \$580.9 millones de dólares contra \$386.0 millones de dólares para transferencia única con una diferencia de \$195.0 millones y con un aumento de

la tasa de embarazo de 57.7% a 68.0% observándose una diferencia significativa a favor de la transferencia de embriones únicos seleccionados mediante TL (15).

2. PROBLEMA DE ESTUDIO

2.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La selección de embriones y su clasificación de manera morfológica evaluado de manera aislada y en un momento determinado del día y solo en una ocasión, la fertilización al primer día y así sucesivamente hasta la formación de blastocisto en el día 5 del desarrollo embrionario ha mostrado que hay una número importante de eventos no observados entre cada evaluación y que pueden tener relevancia y modificar radicalmente la clasificación que se les da a cada embrión.

Esto ha sido resuelto mediante la utilización de incubadoras trigas de monitoreo en tiempo real en el cual se realiza tomas periódicas de imágenes a un lapso de tiempo ajustable a las necesidades del observador sin necesidad de exponer los embriones a cambios de gas y temperatura al momento de ser extraídos de la incubadora y que permite observar todos esos fenómenos que en la embriología clínica se traducen a una división normal o anormal dependiendo del evento producido y en el tiempo en que se produce, en base a esto se ha logrado observar ciertos eventos que se consideran de buen pronóstico para el embrión y otros considerados de mal pronóstico para el mismo, de esta manera en diversos centros a nivel mundial se han tomado parámetros predictores para la formación de blastocisto y que ayudan a la toma de decisiones tanto para llevar dichos embriones a cultivo extendido así como para la congelación o transferencia de los mismos en día 3 del desarrollo.

Existe la problemática de que cada centro debido a las variables que existen tanto en el tipo de cultivo utilizado, técnicas de procesamiento de muestras así como el tipo de incubadora no se ha podido unificar valores y es necesario que cada centro de reproducción humana realice los propios y en base a eso tener criterios propios para ser aplicados a cada caso lo cual mejoraría la calidad de la atención ofreciéndose a pacientes de buen pronóstico llevar embriones hasta cultivo extendido y con transferencia de los mejores embriones o a su vez transferencia de día 3.

De lo anterior surge la pregunta ¿Que parámetros morfocinéticos de embriones en D+3 evaluados mediante TL son favorables para la formación de blastocisto en el periodo comprendido Marzo 2017 a Junio 2017 en la unidad de embriología en el Instituto en Ciencias de la Reproducción Humana Vida?

2.2 JUSTIFICACIÓN

El cultivo embrionario es una de las etapas más críticas en el proceso de un FIV/ICSI en el cual puede intervenir diferentes factores los cuales pueden actuar a favor o en contra del buen desarrollo embrionario, a su vez la transferencia de dichos embriones es un proceso crítico en el cual las tasas de éxito se ven envueltas en una cantidad de factores clínicos de la paciente muy amplios y dichas tasas se ven favorecidas al realizar transferencia de embriones provenientes de cultivo extendido y también en relación a la calidad de los mismos.

Con este estudio se espera demostrar que parámetros morfocinéticos son necesarios en la formar blastocisto para toma de decisión en cuanto a dejar a cultivo extendido o en aquellos embriones con menos probabilidades de formación de blastocisto dar posibilidad de congelación o transferencia en tercer día, a su vez de los embriones que llegan a día 5 se puede seleccionar el embrión de mejor calidad para poder realizar en un futuro transferencia de embrión único y disminuir la tasa de embarazos múltiples disminuyendo los riesgos maternos asociados con un aumento de las tasas de nacido vivo, así como la disminución significativa de los costos institucionales.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo General

Identificar que parámetros morfocinéticos en día 3 del desarrollo embrionario valorados por Time-Lapse son favorables para la formación de blastocisto en el laboratorio de embriología del Instituto Vida en el periodo Marzo 2017 a Junio 2017.

2.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar que parámetros morfocinéticos están presentes en el grupo de embriones que llegan a blastocisto.
- Determinar los valores promedio de formación de pronúcleos
- Determinar los valores promedio de desaparición de pronúcleos.
- Determinar el tiempo de división celular (t2, t3, t4, t5, t6).
- Determinar el tiempo de formación de la mórula.
- Determinar el lapsos de tiempo t2 – t3 (CC2)
- Determinar el lapso de tiempo t3 – t4 (S2)

3 MATERIAL Y METODOS

3.1 METODOLOGÍA

3.1.2 Tipo de diseño o estudio

Observacional, Descriptivo, Retrospectivo.

3.1.3 Lugar en donde se desarrolló el estudio

Laboratorio de embriología del Instituto Vida Guadalajara.

3.1.4 Población estudio

Embriones ingresados a Time-Lapse (ESCO Miri®) ya sea de FIV o ICSI.

3.2 CRITERIOS DE SELECCION

3.2.1 Criterios de inclusión

Embriones ingresados en incubadora TL por FIV/ICSI con análisis morfocinético durante al menos 3 días en el Instituto Vida en el periodo comprendido de Marzo 2017 a Junio 2017.

3.2.2 Criterios de exclusión

Embriones que no se continua a cultivo extendido por vitrificación en día 3.

3.2.3 Criterios de eliminación

Embriones bloqueados entes del 3º día

3.3 DEFINICION, OPERACIONALIZACION Y ESCALAS DE MEDICION DE VARIABLES

Variable	Definición operacional	Instrumento de medición	Unidad de medida	Valores o categorías	Escala de medición
Edad	Tiempo transcurrido(años) a partir del nacimiento de un individuo	Tabla de datos	0 – 50 años	Cuantitativa continua	Media
Origen de óvulos	Si son óvulos pertenecientes de la paciente infértil o de donadora	Video de Time-Lapse	Propios / Donados	Independiente, cualitativa	Nominal
Formación de pronúcleos	Memento en que son visibles ambos pronucleos	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Tasa
Desaparición de pronúcleos	Momento en el que se dejan de ver ambos pronucleos	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
T2 (división temprana)	División celular a dos células	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
T3	División a 3 células	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
T4	División a 4 células	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
T5	División a 5 células	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
T6	División a 6 células	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	
Tiempo de llegada a Mórula	Momento en el que inicia la compactación	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
Blastulación	A partir de la compactación hasta que termina el seguimiento	Video de Time-Lapse	Presente/ Ausente	Dependiente, cualitativa	Tasa
CC2	Tiempo de división entre t2-t3	Video de Time-Lapse	Tiempo en horas	Independiente, cuantitativa	Media
S2	Tiempo de división entre t3-t4	Video de Time-Lapse	Tiempo en Horas	Independiente, cuantitativa	Media

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán analizados en el programa GraphPad Prism 5.0, con el cual se realizó la prueba de normalidad D'Agostino Omnibus Pearson para determinar el comportamiento de los datos y las pruebas estadísticas a utilizar. Las variables cualitativas se analizaron mediante el cálculo de la tasa medida en términos de frecuencia y su distribución se analizó en tablas de contingencia con la prueba exacta de Fisher/Chi cuadrada. Las variables cuantitativas se reportaron como las medias y desviación estándar y se compararon a través de la prueba *t* de Student no pareada/ Mann Withney. Se consideraron significativas las diferencias con un valor de $P < 0.05$.

3.5 TAMAÑO DE MUESTRA

Se aplicará un muestreo no probabilístico por conveniencia, incluyendo todos los embriones durante el periodo de estudio, considerando que en nuestra Institución no se cuenta con antecedentes de TL y a su vez no se tiene estandarizado los parámetros morfocinéticos mediante TL en los embriones estudiados, aunado a que los criterios varían de una institución a otra.

4. ASPECTOS ETICOS

El presente trabajo cumple con los requisitos exigidos por la Ley General de Salud y el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud y se cataloga como investigación nivel I, investigación sin riesgo, de acuerdo con el Art. 17 de dicho reglamento, ya que es un estudio que emplea técnicas y métodos retrospectivos o prospectivos y en el que no se realiza ninguna intervención o modificación intencional de las variables fisiológicas, psicológicas y sociales de los individuos que participan en el estudio, entre los que se consideran: cuestionarios, entrevistas, revisión de expedientes clínicos y otros, en los que no se le identifique ni se traten aspectos sensitivos de su conducta, respetando además la confidencialidad de los datos. Y de acuerdo al artículo 23 de la Ley General de Salud, como investigación con riesgo mínimo, la Comisión de Ética, por razones justificadas, podrá autorizar que el consentimiento informado se obtenga sin formularse escrito, y tratándose de investigaciones sin riesgo, podrá dispensar al investigador la obtención del consentimiento informado. Este protocolo de investigación respetará los preceptos éticos para las investigaciones médicas en seres humanos adoptados por la asamblea mundial de Helsinki 2004, y toma en cuenta los lineamientos establecidos en la NOM-012-SSA3-2012.

De igual forma cumple con los lineamientos establecidos por el Reglamento de Investigación en Salud de la Secretaría de Salud.

RESULTADOS

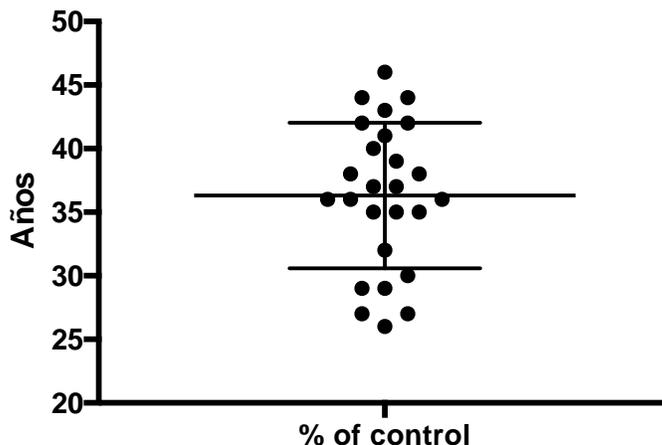
Se analizaron un total de 288 embriones que fueron ingresados al Time-Lapse de 26 pacientes captadas con criterios de inclusión en el periodo de Marzo 2017 a Junio 2017 y quedando excluidas 3 pacientes por no cumplir criterios para el estudio, se tuvo un promedio de 11.07 embriones por pacientes. Del total de embriones ingresados solo 194 embriones cumplieron criterios de inclusión (67.36%), quedando fuera de estudio 94 embriones (32.63%) debido a que fueron vitrificados electivamente en D+3, de los embriones incluidos 118 se quedaron detenidos en alguna etapa del desarrollo sin formar blastocisto o formando blastocisto pero sin criterios para transferencia o congelación correspondiendo al 60.8% y 76 embriones llegaron a formar blastocisto con criterios para transferencia o congelación correspondiendo al 39.17%.

Las edades documentadas son entre 26 y 46 años, con una mediana de 36.5, media de 36.31 años. El registro de edades con mayor frecuencia se ubica en las edades que van de 31 a 40 años con el 50.01%, seguido del intervalo que va de 41 a 50 años con el 26.92% y de 21 a 30 años, que representan el 23.07% (Tabla 1) (Figura 1).

Tabla 1. Distribución de frecuencias para edad.

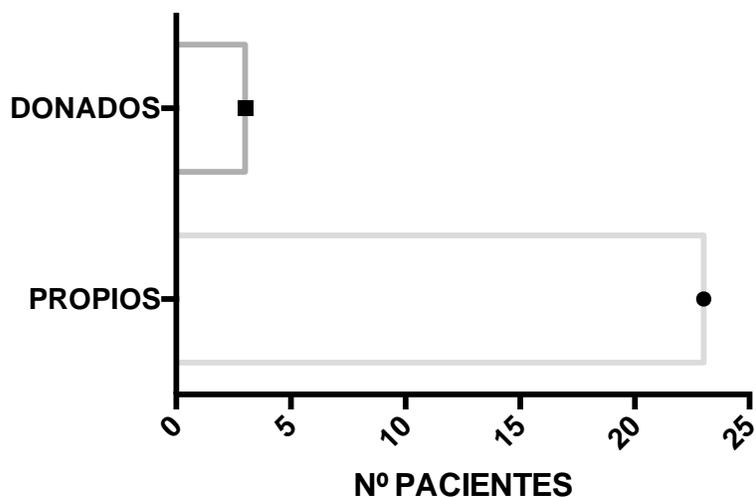
Intervalo de edad	Frecuencia	Frecuencia acumulada	%	% acumulado
21 a 30	6	6	23.07	23.07
31 a 40	13	19	50.01	73.08
41 a 50	7	26	26.92	100

Figura 1. DISTRIBUCIÓN POR EDAD



En cuanto a la distribución por procedencia de los óvulos solo en 3 casos procedían de donadora correspondiendo al 11.53% y 23 correspondían a óvulos homólogos con un 88.46% (Figura 2).

Figura 2. Procedencia de ovulos



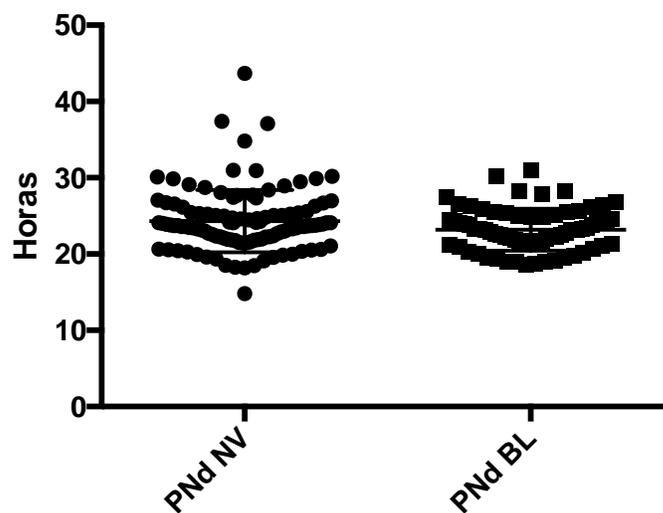
Se realizó una comparación entre las diferentes variables entre los embriones que llegaron a blastocisto (BL) y aquellos que quedaron detenidos en alguna etapa previa a esta o no viables (NV). Cabe mencionar que el análisis de cada una de las variables difiere en cuanto al número de embriones debido a que en algunos se presentaba o

no alguno de estos parámetros así como por la detención en alguna de las etapas previas.

En primera instancia se realiza la comparación en cuanto al tiempo en que se da la aparición de los dos pronúcleos (PNa), en este análisis se compararon 118 embriones NV contra 76 que si llegaron a BL. El tiempo mínimo para el grupo de NV fue 4.57 h., tiempo máximo de 23.33 h. con una mediana de 8.385 h y una media 8.884 h, desviación estándar (SD) de 3.077 h vs 1.77 h respectivamente para el grupo de BL con tiempo mínimo de 5.41 h, máximo de 16.16 h, mediana de 7.91 h y media de 8.176 h. Se observó un valor de P (p 0.1879; NC 95%) sin tener diferencia estadística significativa.

En cuanto a la comparación del tiempo de desaparición de pronúcleos (PNd), en este análisis se compararon 112 embriones NV contra 73 del grupo de BL. El tiempo mínimo para el grupo de NV fue 14.83 h, tiempo máximo de 43.67 h con una mediana de 23.73 h y media \pm SEM 24.31 ± 0.3873 h, SD 4.098 h vs 2.751 h respectivamente para el grupo de BL mínima 18.65 h, máximo 30.96 h, mediana 23.09 h, media \pm SEM 23.18 ± 0.3220 h. Se observó un valor de P (p 0.0407; NC 95%) encontrando diferencia estadística significativa (Figura 3).

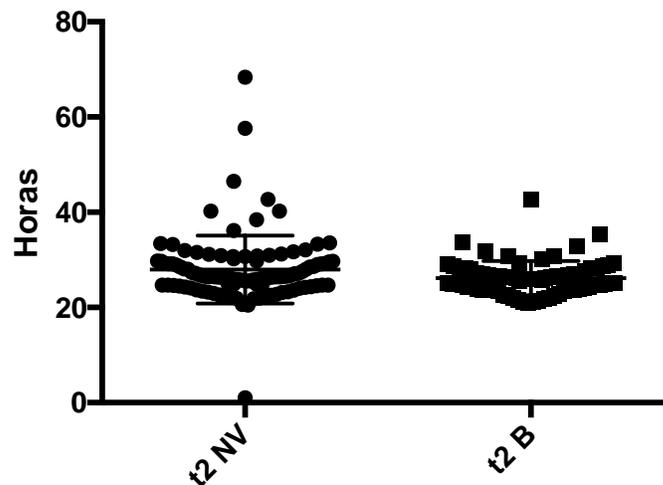
Figura 3. Desaparición de pronucleos (PNd)



Se compara los tiempos de divisiones celulares de t2, t3, t4, t5, t6 y tM obteniéndose los siguientes resultados:

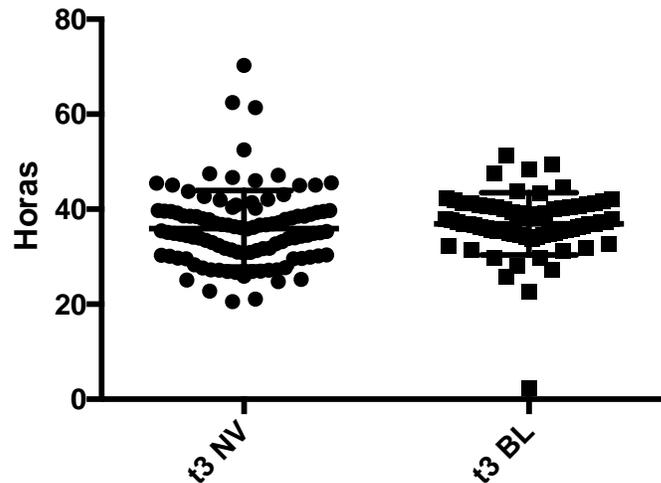
Estadio de dos células (t2) para el grupo NV con un tiempo mínimo de 1h. y máximo de 68.35 h. con mediana 26.48 h, media de 27.95 h, SD 7.116 h vs 3.589 para el grupo de BL con tiempo mínimo de 21 h, máximo 42.72 h, mediana 25.96 h, media 26.17 h. Se observó un valor de P (p 0.032; NC 95%) representando una diferencia estadística significativa (Figura 4).

Figura 4. Tiempo de llegada a 2 células (t2)



En el análisis de estadio de tres células (t3) para el grupo de NV se observó un tiempo mínimo de 20.58 h, máximo de 70.27 h con una mediana de 35.19 h y media de 35.9 h, SD 8.054 h vs 6.555 para el grupo de BL con tiempo mínimo de 2.45 h, máximo 51.2 h mediana 37.07 h, media 36.94 h. Se observó un valor de P (p 0.0325; NC 95%) representando una diferencia estadística significativa (Figura 5).

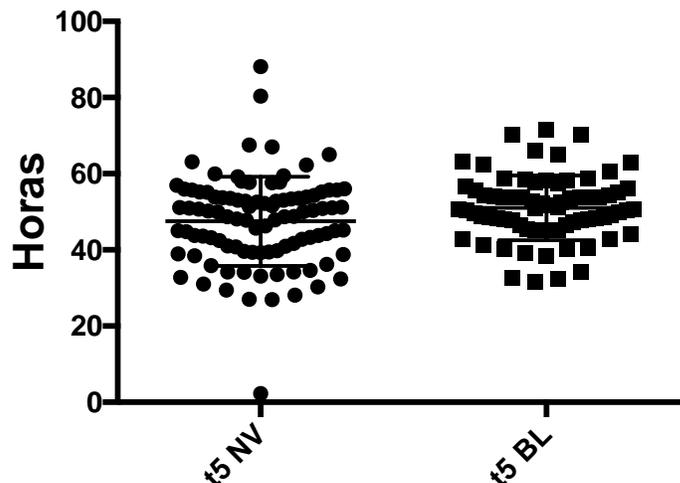
Figura 5. Tiempo de llegada a 3 células (t3)



En el análisis estadístico de cuatro células (t4) se observó en el grupo de NV tiempo mínimo de 22.23 h, máximo de 87.87 h, mediana 39.22 h y media de 40.72 h, SD 9.81 vs 5.547 h para el grupo de BL con tiempo mínimo de 24.33 h, máximo 60.2 h, mediana 38.88 h, media 39.76 h. Se observó un valor de P (p 0.922; NC 95%) sin tener diferencia estadística significativa.

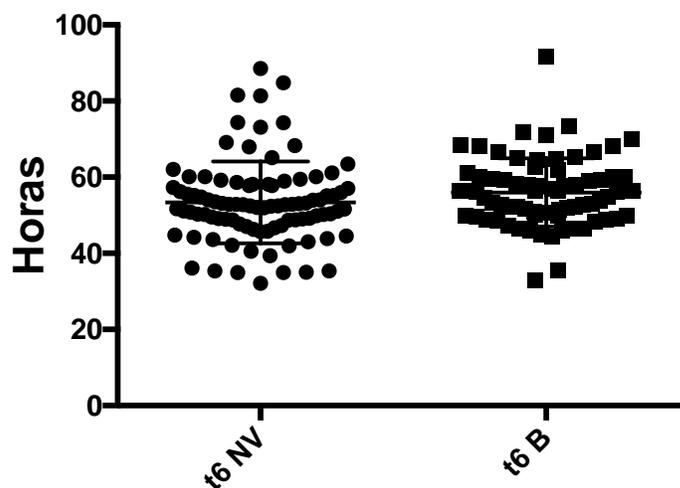
Análisis estadístico de t5 en el que se observó en el grupo de NV un tiempo mínimo de 2.29 h, máximo de 88.14 h, mediana 48.78 h, media 47.53 h, SD 11.72 vs 8.513 en el grupo de BL con tiempo mínimo de 31.55 h, máximo de 71.59 h, mediana de 50.81 h, media 51.04 h. Se observó un valor de P (p 0.0318; NC 95%) observándose diferencia estadística significativa (Figura 6).

Figura 6. Tiempo de llegada a 5 células (t5)



En análisis de estadio de 6 células (t6) se observó en el grupo NV tiempo mínimo de 32.2 h, máximo de 88.58 h, mediana 52.44 h y media de 53.38 h, SD 10.76 vs 8.98 h, para el grupo de BL con tiempo mínimo de 32.96 h, máximo 91.65 h, mediana 56.15 h, media 56 h. Se observó un valor de P (p 0.0325; NC 95%) representando una diferencia estadística significativa (Figura 7).

Figura 7. Tiempo de llegada a 6 células (t6)

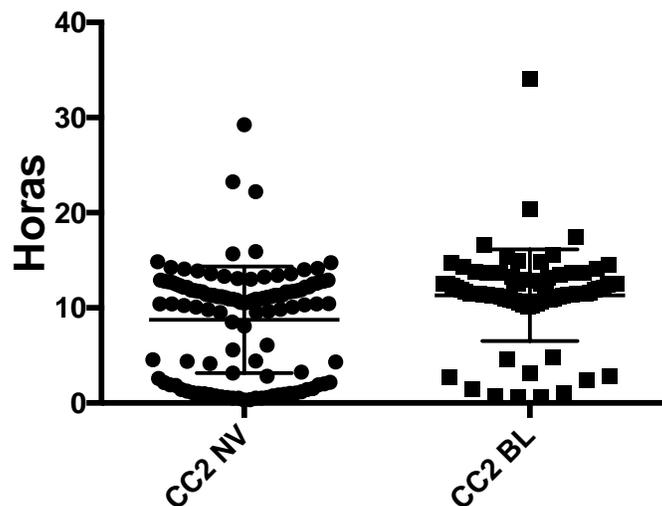


En el análisis de tiempo de formación de mórula (TM) se observa un tiempo mínimo de 7.94 h, máximo 104.5 h, mediana 77.7 h, media 74.95 h, SD 15.8 h vs 11.65 h para

el grupo de BL con tiempo mínimo de 57.11 h, máximo 123.3 h, mediana 77.71 h, media 79.48 h. Se observó un valor de P (0.2178; NC 95%) sin diferencia estadística significativa (Figura 7).

Posteriormente se analizaron los resultados obtenidos en los valores de CC2 (t2 – t3) observándose para el grupo de NV tiempo mínimo de 0.33 h, máximo 29.25 h, mediana 10.79 h y media 8.756 h, SD 5.598 vs 4.805 h, para el grupo de BL con tiempo mínimo de 0.59 h, máximo 34 h, mediana 11.58 h, media 11.33 h. Se observó un valor de P (p 0.0011; NC 95%) observándose diferencia estadística significativa.

Figura 9. Intervalo entre t2 - t3 (CC2)



En el análisis de S2 (t3 – t4) de observo para el grupo de NV tiempo mínimo de 0.09 h, máximo 41.48 h, mediana 2.08 h, media 4.83 h, SD 6.061 h vs 3.537 h para el grupo de BL con tiempo mínimo de 0.17 h, máximo 20.83 h, mediana 1.475 h, media 2.617 h. Se obtiene un valor de P (p 0.0118; NC 95%) representando una diferencia estadísticamente significativa.

Figura 10. Intervalo entre t3 - t4 (S2)

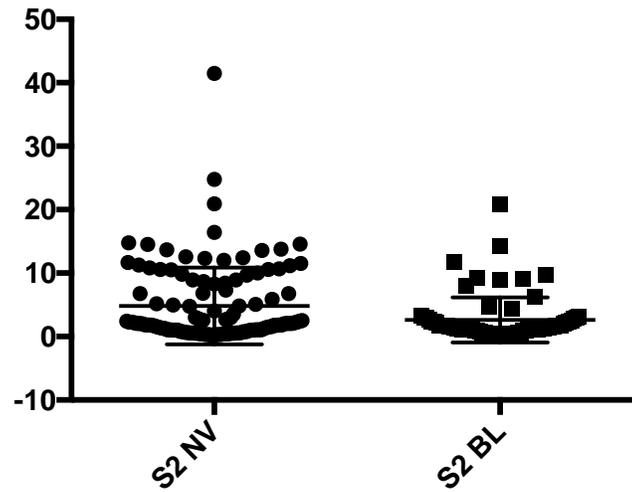


Tabla 2. Concentrado de resultados con significancia estadística

ESTA DIO	CLASIFI- CACION	TIEMPO MINIMO	TIEMPO MÁXIMO	MEDIANA	MEDIA	DIFE RENCIA	VALOR DE P
PNd	NV	14.38 h	43.67 h	23.73 h	24.3 h	1.2 h	0.0407
	BL	18.65 h	30.96 h	23.09 h	23.18 h		
t2	NV	1 h	68.35 h	26.48 h	27.95 h	1.78 h	0.032
	BL	21 h	42.72 h	25.96 h	26.17 h		
t3	NV	20.58 h	70.27 h	35.19 h	35.9 h	1.04h	0.0325
	BL	20.45 h	51.2 h	37.07 h	36.94 h		
t5	NV	22.9 h	88.14 h	48.78 h	47.53 h	3.51h	0.0318
	BL	31.55 h	71.59 h	50.81	51.04 h		
t6	NV	32.2 h	88.58 h	52.44 h	53.38 h	2.62 h	0.0325
	BL	32.96 h	91.65 h	56.15 h	56 h		
CC2	NV	0.33 h	29.25 h	10.79 h	8.756 h	2.57 h	0.0011
	BL	0.59 h	34 h	11.58 h	11.33 h		
S2	NV	0.09 h	41.48 h	2.08 h	4.83 h	1.85 h	0.0118
	BL	0.17 h	20.83 h	1.475 h	2.617 h		

CONCLUSIONES

- El promedio de edad de las pacientes captadas que sus embriones son ingresados a TL fue de 36.5 años, observándose el mayor rango de edad entre los 31 – 40 años ya que las pacientes con criterios de FIV o ICSI presentan principalmente factor ovárico, tuboperitoneal o masculino.
- En este estudio predominó el grupo de pacientes con óvulos propios con un 88.46% siendo minoría el grupo de pacientes con óvulos donados con un 11.53% (3 pacientes).
- De los parámetros morfocinéticos incluidos en este estudio representaron diferencia estadística significativa en 7 de dichos parámetros, solo en 2 parámetros no se observó diferencia significativa (PNa, t4).
- El tiempo en el que se da la aparición de los pronúcleos (PNa) no representa un parámetro importante para el desarrollo de blastocisto demostrado en este estudio.
- El lapso de tiempo tomado para alcanzar el desarrollo de 4 células no representó un parámetro significativo para la formación de blastocisto.
- La desaparición de los pronúcleos (PNd) ocurrió 1.2 h más temprano en el grupo de embriones que llegaron a la etapa de blastocisto comparados con aquellos que no lograron llegar a dicha etapa con un intervalo para el grupo de blastocistos de 19 – 23 h, mostrándose como un valor desfavorable la desaparición más temprana o posterior de los pronúcleos.
- Cuando el tiempo de la primera división mitótica t2 se lleva a cabo en promedio de manera más temprana se considera como un factor favorable para la formación de blastocisto quedando en el rango de 21 – 42 h mostrándose como un valor desfavorecedor la división posterior a este tiempo.
- En la división de 3 células (t3) se observó que era un valor significativo para determinar la formación de blastocisto mostrándose una media de 36 h para el grupo de formación de blastocisto con un rango muy amplio, observado que va desde 20.45 – 51.2 h. En el grupo de embriones que no llegaron a formación de blastocisto se observó una gran diferencia en el tiempo máximo de división para este quedando en 51.2 para el grupo de blastocisto y 70.27 para el grupo de no viable.
- El lapso de división a 5 células mostró diferencia estadística significativa mostrándose que saliendo de los rangos observados para la llegada a cinco células ya

sea acortándose el tiempo o alargándose el tiempo de división se considera desfavorable para la formación de blastocisto quedando en el rango de 31.5 – 71.5 h como el tiempo favorable para la formación de blastocisto con una diferencia del tiempo medio de 3.51 h más para el grupo de blastocisto.

- El parámetro de división a 6 celular (t_6) es una variable significativa para valorar la llegada de embriones a blastocisto mostrándose en el grupo de los no viables a diferencia de las otras variables un tiempo mínimo y máximo más corto para este grupo encontrándose la media de tiempo 2.56 h más para la llegada a esta etapa.
- Dentro de todas las variables la que mostro más significancia estadística respecto a su valor de p fue el observado en el lapso de t_2-t_3 (CC2) y el cual es uno de los valores que se pueden tomar como determinantes para valorar la llegada de un embrión a blastocisto con un rango de 0.59 – 34 h con una media fijada en las 11.33 h.
- En cuanto al tiempo entre la división de $t_3 - t_4$ (S2) también se observó como uno de los parámetros determinantes para el desarrollo de blastocisto con diferencia significativa y en el cual se podría considerar como tiempo máximo para dicho periodo 20 h ya que el rebasar dicho parámetros se considera como factor desfavorable para desarrollo de blastocisto.

DISCUSION

- Con el desarrollo de nuevas tecnologías a la ciencia y la incursión de medios de cultivo para el desarrollo de embriones durante más tiempo así como la introducción de incubadoras tri-gas con monitorización continua en tiempo real se ha logrado la observación de fenómenos que mediante la observación convencional no podrían ser registrados, actualmente el uso del Time-Lapse en los laboratorio de reproducción asistida ha revolucionado este campo y ha permitido registrar parámetros favorables para la formación de blastocisto así como la elaboración de modelos predictores lo cual aumenta la tasa de implantación y embarazo por embrión transferido.
- En el registro del tiempo de desaparición de los pronúcleos PNd se logró demostrar que en los casos en los que se llevaba a cabo más temprano era un factor favorable para la formación de blastocistos, lo cual concuerda y esta descrito en el estudio realizado por (Lemmet *et al.*, 2008), y a su vez contrasta con el estudio realizado por (Azzarello *et al.*, 2012) en el que la desaparición temprana (< 20 h) no resulta favorable para la formación de blastocisto, así como en el estudio de (Meseguer *et al.*, 2011) en el que se observó que la división temprana no era favorable para la formación de blastocisto. En base a lo anterior se recomienda que aquellos embriones que presenten desaparición de pronúcleos en un rango de 19 a 23 h se considere llevar a cultivo extendido ya que es un factor favorable para el desarrollo de blastocisto.
- Cuando se observa que la primera división mitótica del embrión se realiza de manera temprana (t2) es considerado como un factor favorable para que dicho embrión llegue en cultivo extendido a formar blastocisto, este resultado es comprable con los obtenidos en el estudio de (Lemmet *et al.*, 2008).
- Se observó en cuanto a la división (t5) en la que se demostró diferencia estadística significativa que puede ser un valor favorable para la formación de blastocisto encontrándose entre las 31 – 71 h con importante valor lo cual también ha sido demostrado en estudios previos (Messeger *et al.*, 2012) mostrándose sobre algunos otros valores aislados.
- A diferencia en lo observado en los estudios previos (Motato *et al.*, 2015) en el que observo que el tiempo de mórula tM era un predictor para la formación de blastocisto con un intervalo de 81.28 – 96.0 h posterior a ICSI, en este estudio no se logró

demostrar esto, no se observó diferencia estadística significativa en este parámetro como predictor para la formación de blastocisto con tiempos entre 57.11 - 123.3 h y un valor de $p > 0.05$.

- La duración de CC2 (t2-t3) ha sido uno de los factores que con diferencia estadística significativa representa una de las variables con mayor valor para la formación de blastocisto y que pudieran ser predictivos para este, los resultados obtenidos en este estudio son comparables con otros estudios previos (Lemmet *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2010).
- El tiempo de S2 (t3-t4) se observó con diferencia estadística significativa y además presencia de mucho mayor diferencia junto con CC2 y comparado con otras variables demostrándose que son valores importantes y de peso para el desarrollo y coincidiendo con estudios realizados previamente (Messeger *et al.*, 2012).
- Sin embargo los valores encontrados y propuestos así como las correlaciones realizadas requieren ser conformadas más ampliamente con estudios prospectivos aleatorizados para valorar la eficacia de dichos valores y así con estudios posteriores de predicción dar parámetros y valores exactos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alison Campbell, Simon Fishel. Atlas of Time Lapse Embryology. CRC Press, Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL. (2015).
2. Armstrong S, Arroll N, Cree LM, Jordan V, Farquhar C. Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2015, Issue 2. Art. No.: CD011320.
3. Edwards, R. G., Fishel, S. B., Cohen, J., Fehilly, C. B., Purdy, J. M., Slater, J. M., ... & Webster, J. M. (1984). Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1(1), 3-23.
4. Balaban, B., Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., ... & Cristina Magli, M. (2011). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human Reproduction*, 26(6), 1270-1283.
5. Meseguer M. Looking at embryo development - clinical results from time-lapse RCT. *Human Reproduction* 2012;27 Suppl 2:ii36.
6. Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(3), 532-541.
7. Lewis, W. H., & Gregory, P. W. (1929). Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*, 69(1782), 226-229.
8. Pribenszky, C., Mátyás, S., Kovács, P., Losonczi, E., Zádori, J., & Vajta, G. (2010). Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reproductive biomedicine online*, 21(4), 533-536.
9. Azzarello, A., Hoest, T., & Mikkelsen, A. L. (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Human reproduction*, 27(9), 2649-2657.
10. Basile, N., del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., ... & Meseguer, M. (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertility and*

sterility, 101(3), 699-704.

11. Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., & Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and sterility*, 98(6), 1481-1489.
12. VerMilyea, M. D., Tan, L., Anthony, J. T., Conaghan, J., Ivani, K., Gvakharia, M., ... & Mainigi, M. (2014). Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multi-centre study. *Reproductive biomedicine online*, 29(6), 729-736.
13. Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Thornton, S. (2013). Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reproductive BioMedicine Online*, 27(2), 140-146.
14. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, & Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. (2013). Criteria for number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 99(1), 44-46.
15. Crawford, S., Boulet, S. L., Mneimneh, A. S., Perkins, K. M., Jamieson, D. J., Zhang, Y., & Kissin, D. M. (2016). Costs of achieving live birth from assisted reproductive technology: a comparison of sequential single and double embryo transfer approaches. *Fertility and sterility*, 105(2), 444-450.

ANEXO

Anexo 1. Formato de Recolección de Datos

Instituto Vida

Biología de la reproducción humana

N o m b r e	Edad	Origen de óvulos	Número de embriones	TIME LAPSE								T m	CC2	S2
				Aparición de PN	Desaparición de PN	T2	T3	T4	T5	T6				