



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e
Inmunología y Microbiología Médica

**Análisis morfocinético de los factores intrínsecos y extrínsecos del
cultivo embrionario in vitro mediante la tecnología time-lapse**

Tesis Doctoral

Doctoranda: Natalia Basile

Directores de tesis: Marcos Meseguer Escrivá

Juan Antonio García Velasco

Madrid, 2014

D. Juan Antonio García Velasco, Doctor en Medicina, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud pública e Inmunología y Microbiología Médica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, y Co-director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en Madrid.

CERTIFICA

Que Dña. **Natalia Basile**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Argentina John F. Kennedy, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: **Análisis morfocinético de los factores intrínsecos y extrínsecos del cultivo embrionario in vitro mediante la tecnología time-lapse.**

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo en el departamento de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Ciencias de la Salud.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 1 de Noviembre del 2014.

Prof. Juan Antonio García Velasco

D. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor Europeo en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y Profesor del Master en Biotecnología de la Reproducción Humana.

CERTIFICA

Que **Dña. Natalia Basile**, Licenciada en Bioquímica por la Universidad Argentina John F. Kennedy, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título: **Análisis morfocinético de los factores intrínsecos y extrínsecos del cultivo embrionario in vitro mediante la tecnología time-lapse.**

Revisado el presente trabajo, expresa su conformidad para la presentación del mismo en el departamento de Medicina de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctora en Ciencias de la Salud.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 1 de Noviembre del 2014.

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

A mis padres, Graciela y Miguel

A mis hijos, Gael, Francesca y Lucas

A mi marido, Facundo

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a los directores de esta tesis doctoral, Prof. Juan Antonio García Velasco y Dr. Marcos Meseguer Escrivá, grandes referentes en esta etapa de mi carrera profesional.

A Juan Antonio García Velasco por su apoyo sincero y por ayudarme a conseguir el equilibrio entre el trabajo meramente técnico y el altamente científico. Gracias Juancho por fomentar eso en mí, esta tesis es solo el inicio.

A Marcos Meseguer por ser tan buen compañero de equipo y por enseñarme a dar charlas, escribir y publicar. Has sido un director de tesis muy divertido y nos hemos hecho grandes amigos...cuantas risas y frustraciones desde aquella vez que te propuse dirigir este proyecto. Gracias “my friend” por escucharme siempre.

A Yolanda Mínguez y Antonio Requena por abrirme las puertas del IVI Madrid tras esa primera entrevista allá por el año 2007, y a David y Fernando por llevar adelante el laboratorio que me da trabajo todos los días.

A mis compañeros del IVI que han invertido tiempo en tratar a las pacientes incluidas en esta tesis y por entender mis ausencias del laboratorio. Espero ser tan buena compañera como lo sois conmigo.

A María Cruz por su ayuda incondicional siempre. Gracias por ser tan positiva y por ese sentido del humor tan particular... tus visitas al laboratorio son pura alegría para mí.

A mis amigos, los de aquí y los de allí, por ser mi familia postiza donde sea que voy. A Leyre, por cuidar a mi familia siempre que no estoy y por este empujón final que está haciendo este proyecto de tesis aún más divertido. A Marina, por sacar de mí las

mejores carcajadas (igual las tuyas son insuperables) y a Loli por aguantar estoicamente conmigo en Madrid... quedamos pocas pero muy válidas!

A mis padres por apoyarme en todas mis decisiones a pesar que nos han ido alejando geográficamente. Miguel, has fomentado que me embarcara en este proyecto y Graciela has logrado, tras la misma e insistente pregunta que lo terminara. Gracias a los dos por esto, por ser unos papas fuertes y por quererme tanto. Les debo gran parte de lo que soy.

A mi abuelo Poncio, por haberme enseñado tanto en la vida. Cómo me gustaría que estuvieras aquí para que vieras a tu nieta convertirse en la "*dottorosa*" que siempre quisiste que fuera.

A mis hermanos Andrés y Julieta. Andrés, sé que estás orgulloso de mí pero quiero que sepas que aunque me convierta en doctora sigo yendo a muerte con las "*focaccias*", gracias por contar conmigo y por cuidarme siempre. Julieta, ya son mucho años sin vos y la vida nunca fue la misma. Te llevo conmigo hoy y siempre, gracias por todos esos años que pudimos estar juntas.

A Facundo, por estar conmigo y dar simpleza a todos mis enredos. Me viste graduarme una vez y ambos teníamos unos cuantos años menos. Hemos llegado muy lejos Facu, te quiero siempre.

A mis hijos: Gael, Francesca y Lucas, por ser tan buenos hijos, por haberme convertido en mejor persona y por entender que mamá a veces ha estado ausente por trabajar hasta tarde en este proyecto. Son las tres cosas más lindas que tengo.

ÍNDICE

CAPÍTULO I	15
INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Infertilidad	3
1.2. Técnicas de Reproducción Asistida	5
1.3. La problemática de la “selección embrionaria”	7
1.3.1 Marcadores clásicos.....	8
1.3.2 Nuevos marcadores.....	10
1.4. Marcadores morfocinéticos y tecnología time-lapse	13
CAPÍTULO II	15
TECNOLOGÍA TIME-LAPSE	15
2.1. Desarrollo embrionario y time-lapse	18
2.2. Equipos TMS	19
2.2.1. Ventajas de los TMS	20
2.2.2. Limitaciones de los TMS	23
2.2.3. Seguridad de los TMS.....	25
2.3. Marcadores cinéticos de viabilidad embrionaria	27
2.3.1. Marcadores en estadios tempranos que permiten predecir la capacidad de formación de blastocistos.....	34
CAPÍTULO III	57
ANÁLISIS DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA	57
3.1. Material y Métodos	60
3.1.1 Estimulación y punción ovárica.....	61

3.1.2 Denudación, ICSI y cultivo embrionario	62
3.1.3 Registro y análisis de imágenes	62
3.1.4 Categorías morfocinéticas	64
3.1.5. Análisis Estadístico.....	64
3.2. Resultados	64
3.2.1. Tiempos de división y porcentajes dentro de los rangos óptimos	64
3.2.2. Morfología estándar y resultados clínicos.....	66
3.3. Discusión.....	67
CAPÍTULO IV.....	77
ANÁLISIS DEL EFECTO DEL CONTENIDO CROMOSÓMICO EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA.	77
4.1. Material y Métodos.....	80
4.1.1. Estimulación ovárica, punción, cultivo y biopsia embrionaria.....	80
4.1.2 Análisis Cromosómico.....	81
4.1.3. Registro y análisis de imágenes	82
4.1.4. Análisis Estadístico.....	82
4.2. Resultados	83
4.3. Discusión.....	87
CAPÍTULO V.	97
CONCLUSIONES	97
CAPÍTULO VI.....	101
BIBLIOGRAFÍA	101

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Evolución y pronóstico de la infertilidad	4
Tabla 1. Características técnicas y clínicas de Embryoscope®, Primo-Vision® y Eeva®.....	21
Figura 2. Aspecto morfológico del mismo embrión en un periodo de 6 horas.....	22
Figura 3. Tasa de blastocisto alcanzada, proporción de embriones transferidos, congelados y no viables en función del tipo de incubador.	27
Figura 4. Imágenes de desarrollo embrionario	28
Figura 5a. Rangos óptimos para las variables PF, t2, t3 y t5.	29
Figura 5b. Rangos óptimos para las variables cc2 (t3-t2) y s2 (y4-t3).....	30
Figura 6. Modelo de selección embrionaria.	32
Figura 7. Algoritmo de selección embrionaria	33
Figura 8. Cinética embrionaria y tasa de desarrollo a blastocisto	36
Figura 9. Cinética embrionaria y tasa de blastocisto óptimo/no óptimo	36
Figura 10. Esquema del desarrollo embrionario pre-implantatorio con sus correspondientes marcadores morfocinéticos.....	38
Figura 11. Esquema de trabajo	61
Figura 12. Cultivo embrionario en sistema time-lapse Embryoscope.....	62
Tabla 2. Media de tiempos para las distintas variables en función del medio de cultivo utilizado	65
Tabla 3. Porcentaje de embriones dentro de los rangos óptimos definidos para las variables t5, s2 y cc2.....	66
Tabla 4. Calidad embrionaria en función del medio de cultivo utilizado.....	66
Figura 13. Esquema de trabajo.	81
Tabla 5. Tiempos medios para todas las variables en embriones normales y anormales.....	83

Figura 14. Porcentaje de embriones normales dentro y fuera de los rangos óptimos definidos	84
Tabla 6. Porcentaje de embriones normales y anormales dentro y fuera de los rangos óptimos definidos para t5, cc3 y t5-t2.....	85
Figura 15. Algoritmo de selección embrionaria..	86
Figura 16. Porcentaje de embriones normales en función de las categorías.	87

ABREVIATURAS

aCGH	Del inglés “array- <i>Comparative Genomic Hybridization</i> ”. Hibridación genómica comparada con array
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AR	Aborto de repetición
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin Trifosfato
CC2	Segundo ciclo celular
CO2	Dióxido de carbono
Cy3	Fluorocromo cianina 3
Cy5	Fluorocromo cianina 5
DGP	Diagnóstico genético pre-implantacional
E2	Estrógenos
eSET	Del inglés “ <i>Elective Single Embryo Transfer</i> ”. Transferencia electiva de un solo embrión
FI	Fallo de implantación
FISH	Del inglés “ <i>Fluorescence in situ hybridization</i> ”. Hibridación in situ fluorescente
FIV	Fecundación In Vitro
FSH	Del inglés “ <i>Follicle-stimulating hormone</i> ”. Hormona folículo estimulante
FSHr	Del inglés “ <i>Recombinant follicle-stimulating hormone</i> ”. Hormona folículo estimulante recombinante

GnRH	Del inglés “ <i>Gonadotropin-releasing hormone</i> ”. Hormona liberadora de gonadotropinas
hCG	Del inglés “ <i>Human chorionic gonadotropin</i> ”. Gonadotropina coriónica humana
hMG	Del inglés “ <i>Human menopausal gonadotropin</i> ”. Gonadotropina menopáusica humana
hpi	Horas post inyección
ICSI	Del inglés “ <i>Intracitoplasmic sperm injection</i> ”. Inyección intracitoplasmática
IMC	Índice de masa corporal
LH	Del inglés “ <i>Luteinizing hormone</i> ”. Hormona luteinizante
MII	Metafase II
NS	No significativo
OHSS	Del inglés “ <i>Ovarian hyperstimulation syndrome</i> ”. Síndrome de hiperestimulación ovárica
PGS	Del inglés “ <i>Preimplantation genetic screening</i> ”. Screening genético preimplantacional
PN	Pronúcleos
PNF	Del inglés “ <i>Pronuclear fading</i> ”. Desaparición de pronúcleos
S2	Segunda sincronía
SHO	Síndrome de hiperestimulación ovárica
t2	Tiempo de división a 2 células
t3	Tiempo de división a 3 células
t4	Tiempo de división a 4 células
t5	Tiempo de división a 5 células

TMS	Del inglés “ <i>time lapse system</i> ”
TRA	Técnicas de reproducción asistida
UI	Unidades internacionales

CAPÍTULO I.
INTRODUCCIÓN

1.1. La infertilidad

La infertilidad y sus términos asociados presentan significados ambiguos según la disciplina que se considere. En medicina reproductiva, el término esterilidad se usa para mujeres (o parejas) que han mantenido relaciones sexuales sin protección durante más de un año sin conseguir gestación. Se define como infertilidad primaria cuando no es posible lograr un embarazo en 1-2 años sin gestación previa, e infertilidad secundaria cuando se cumplen los criterios de infertilidad primaria pero habiéndose logrado gestación en algún momento previo (Lunenfeld et al. 2004).

En los países en desarrollo, la tasa de infertilidad primaria es baja en comparación con los países desarrollados, debido fundamentalmente a que la maternidad ocurre a edades muy tempranas. Sin embargo, el escenario cambia radicalmente cuando se consideran los datos de infertilidad secundaria donde las enfermedades de transmisión sexual y la dificultad para acceder a unas prestaciones sanitarias higiénicas y seguras actúan como causas responsables de estos altos índices de infertilidad (World Health Organization 2001). Por el contrario, en las sociedades más desarrolladas, la infertilidad primaria tiende a ser significativamente mayor que en los países en vías de desarrollo debido a que las mujeres retrasan la edad de su primera gestación; además, en las poblaciones contemporáneas de mujeres que intentan activamente concebir, el descenso en la fertilidad asociado a la edad es un hecho evidente. Por su parte, la infertilidad secundaria es menor debido a un control eficaz de las enfermedades de transmisión sexual y a una mayor accesibilidad a las políticas de salud reproductiva (**figura 1**).

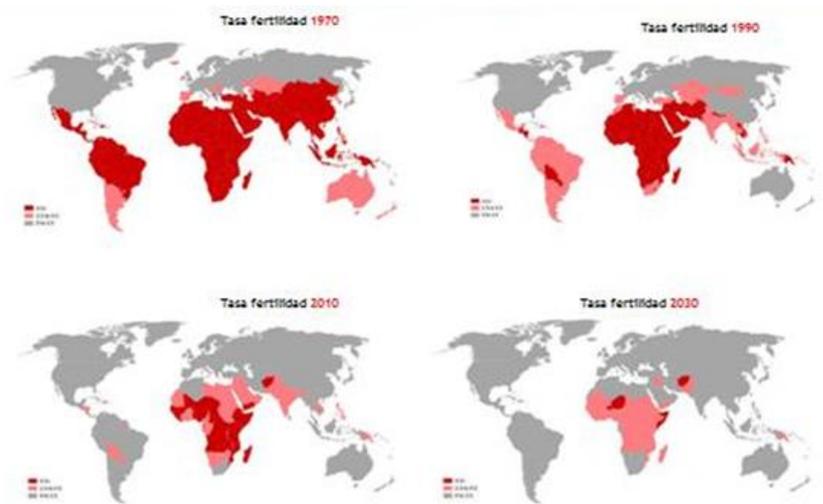


Figura 1. Evolución y pronóstico de la infertilidad. Las zonas grises representan países con 0-2,5 hijos; las zonas rosas países con 2,5-4,5 hijos y las zonas rojas países con más de 4,5 hijos.

El uso a gran escala de medidas anticonceptivas y la creciente popularidad de las técnicas de reproducción asistida (TRA) dan la impresión errónea de que la fertilidad femenina puede manipularse según las preferencias individuales de cada mujer. Actualmente, es posible interrumpir momentáneamente la fertilidad usando medidas relativamente simples; sin embargo, la reanudación de la misma es ilusoria, especialmente en las mujeres que se han adentrado en la treintena.

La infertilidad está considerada como un problema de carácter público que repercute sobre los servicios sociales y sanitarios de un país. En los últimos años, los progresos logrados en tecnología médica han aportado soluciones a la mayor parte de las parejas infértiles, especialmente en los países desarrollados; sin embargo, estos avances también han supuesto la aparición de ciertas cuestiones médicas, éticas y sociales que precisan de la atención no sólo de los profesionales sanitarios sino de la sociedad como conjunto.

La gestión de la infertilidad supone para la Medicina una labor considerable por las dificultades que entraña su diagnóstico y el tratamiento de los desórdenes reproductivos de cada miembro de la pareja; además, es importante que la pareja reciba información realista sobre las posibilidades que tienen de tener un hijo así como de los riesgos y costes del tratamiento y de sus posibles alternativas (Kamel 2010).

La concesión del premio Nobel de Medicina 2010 a Robert G. Edwards, pionero que revolucionó el tratamiento de la esterilidad a través del desarrollo de la fecundación *in vitro*, supone un reconocimiento global a este campo de la biomedicina y en consecuencia un sello de prestigio e importancia a esta nueva especialidad médico-biológica.

1.2. Técnicas de Reproducción Asistida.

Frente a la infertilidad, históricamente se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida, en función del motivo original por el cual una pareja no puede concebir. El objetivo principal de las TRA es generar una descendencia sana y viable; el nacimiento del primer “bebé-probeta” en 1978 supuso un hito para la medicina reproductiva, estableciendo las bases de un nuevo campo de investigación médica.

Una de las primeras técnicas de Reproducción Asistida desarrolladas para el tratamiento de una pareja infértil es la inseminación artificial que tradicionalmente consistía en el depósito de una muestra de semen procesado en la cavidad uterina. Los intentos para lograr la fecundación *in vitro* (FIV) en humanos pasaron por varias etapas de investigación; esta técnica implica la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención y preparación de los gametos para la posterior transferencia de los embriones a la cavidad uterina. Aunque la indicación inicial para

realizar un ciclo de FIV fue la patología tubárica, en la actualidad podemos admitir que la situación ha cambiado ya que esta técnica también se aplica en casos de factor masculino anormal, esterilidad de causa desconocida, endometriosis, esterilidad plurifactorial, edad materna avanzada, etc.

La década posterior al desarrollo de la fecundación *in vitro* condujo a la aparición de numerosas variantes de la técnica, que culmina con la puesta a punto de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), práctica consistente en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado (Palermo et al. 1992) y que representa aproximadamente el 40% de los procedimientos efectuados en el laboratorio de fecundación *in vitro*. La FIV convencional precisa una cantidad mínima de espermatozoides móviles por lo que resulta relativamente ineficaz para parejas cuya situación de infertilidad se debe a un factor masculino severo; teniendo en cuenta estas condiciones previas, el ICSI ha revolucionado el tratamiento de la infertilidad masculina logrando gestaciones incluso en casos de muy mal pronóstico con otras técnicas. Además, las mejoras en los métodos de cultivo, la optimización de las condiciones del laboratorio y la introducción de nuevas tecnologías han permitido la obtención de embriones de buena calidad con un elevado potencial de implantación.

En el siglo XXI resulta evidente la influencia de los avances genéticos en la medicina reproductiva. El diagnóstico genético preimplantacional (DGP), desarrollado para detectar anomalías genéticas en los embriones, mejora los criterios de selección embrionaria en el momento del transfer. Por último, destacar las técnicas de criopreservación tanto en ovocitos como en embriones. Un buen programa de congelación es fundamental para maximizar las tasas acumuladas de gestación por ciclo estimulado; el avance experimentado en los últimos años con la vitrificación, junto con

las mejoras introducidas en los laboratorios se reflejan en el mayor rendimiento de embriones de buena calidad, lo que permite al embriólogo optimizar sus criterios de selección y reducir el número de embriones transferidos. Los resultados obtenidos con embriones congelados son cada vez más similares a los de embriones frescos, por lo que los programas de congelación se convierten en una alternativa válida para rentabilizar los ciclos de estimulación ovárica a través de las transferencias de embriones congelados.

En este capítulo no hay que olvidar que paralelamente a la incorporación de nuevos fármacos y protocolos, el laboratorio de Embriología ha evolucionado notablemente. Son tantos los cambios experimentados en los laboratorios de FIV que se hace difícil enumerarlos, pero quizá lo más importante sea la evolución conceptual que han experimentado, pasando de métodos muy básicos al rigor basado en la evidencia científica y a tener un control preciso sobre una gran cantidad de factores que pueden influir en los resultados, de modo que variables como la temperatura, la iluminación, la composición de los medios de cultivo o la concentración de gases en el interior de los incubadores son considerados aspectos de obligado cumplimiento. Gracias a este rigor se consiguen resultados que superan el rendimiento reproductivo natural de nuestra especie.

1.3. La problemática de la “selección embrionaria”

La selección de embriones a transferir es un paso crucial dentro del proceso de fecundación in vitro. Es por ello que los laboratorios han centrado sus esfuerzos en mejorar cada vez más los métodos de selección embrionaria con el fin de a) reducir el número de embriones transferidos y b) identificar aquellos con el mayor potencial de

implantación. Esto constituye un gran reto considerando que la reducción en el número de embriones transferidos podría poner en peligro las tasas globales de éxito de los programas de FIV. Nuevas estrategias se han propuesto, como por ejemplo: el cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto, el screening cromosómico a través de array-CGH (aCGH) y más recientemente el estudio de la cinética embrionaria a través de los sistemas time-lapse (TMS). A continuación se describen brevemente los marcadores clásicos que han sido utilizados para valorar calidad embrionaria en los últimos 30 años así como aquellos que han sido introducidos más recientemente.

1.3.1 Marcadores clásicos.

La evolución de los métodos de observación embrionaria no ha experimentado grandes cambios en los últimos 30 años. Aunque se han acumulado una gran cantidad de datos morfológicos y de experiencia, todos los métodos de examen descansan sobre el mismo instrumental y la misma representación visual; sin embargo, gracias a estas mediciones ha sido posible profundizar en la apariencia de un embrión óptimo en diferentes etapas del desarrollo. La evaluación morfológica, aunque imperfecta, es actualmente el método más popular de selección embrionaria previo a la transferencia. Históricamente, el embriólogo se ha basado en las observaciones realizadas al microscopio óptico para describir las características morfológicas de un embrión como potencial indicador de viabilidad. Sin embargo, el empleo de criterios de selección morfológica basados en métodos de observación estáticos deriva en tasas de implantación que todavía son relativamente bajas en relación al número de embriones transferidos. La explicación más probable de este fenómeno tal vez sea que el examen de la calidad embrionaria en un momento determinado no es representativo del desarrollo global ni del gameto ni del embrión, por lo que las conclusiones extraídas

pueden ser erradas en relación a la competencia embrionaria. Además, los resultados obtenidos cuando se transfieren embriones congelados son similares o incluso mejores (Levens et al. 2008) que cuando se transfieren embriones frescos, lo que hace sospechar que se ha errado en la identificación del embrión con mayor competencia evolutiva sugiriendo que los métodos convencionales de selección embrionaria no son especialmente fiables. Los métodos actuales de selección embrionaria incluyen el análisis de los gametos y embriones en etapas puntuales del desarrollo comenzando con los ovocitos, seguido de los cigotos en pronúcleos y de las sucesivas divisiones embrionarias hasta que se alcanza el estadio de blastocisto; adicionalmente, se han estudiado otros marcadores como la morfología ovocitaria, el “score” pronuclear y la división temprana (Rienzi et al. 2005). Todos estos parámetros complementan individualmente o en conjunto la evaluación “original” del embrión, aunque su utilidad y aplicación práctica sean objeto de un intenso debate. Mientras que el examen morfológico tiene la ventaja de ser un método sencillo, no invasivo y rápido, presenta el inconveniente de ser poco fiable, es altamente subjetivo, precisa de formación especializada y presenta pocas esperanzas de lograr una estandarización. Además, la definición de calidad embrionaria es un concepto vago e impreciso y resulta inquietante advertir que esta definición tan imprecisa de los fenotipos deseados impacta directamente sobre la interpretación de los resultados, ya que actualmente no podemos apreciar su valor sin ser capaces de situarlos dentro de un contexto fisiológico.

1.3.2 Nuevos marcadores.

Las limitaciones de los criterios morfológicos de selección embrionaria han conducido al desarrollo de nuevas tecnologías con el propósito de conocer el potencial reproductivo de un embrión en concreto. Por lo tanto, la búsqueda de un test objetivo y fiable que evalúe la viabilidad tanto del ovocito como del embrión y que conduzca a un descenso en las tasas de gestación múltiple, mientras se mantienen los resultados globales, se ha convertido en uno de los desafíos más importantes de la medicina reproductiva contemporánea. Hasta hace relativamente poco tiempo, se partía del fenotipo como principal fuente de información para el estudio de una patología y/o para describir la eficacia de un determinado procedimiento médico. Aunque estas aproximaciones son valiosas, actualmente se dispone de técnicas que amplían la descripción fenotípica y cuya aplicación clínica a veces está condicionada por su complejidad metodológica y porque precisan de cierto grado de manipulación embrionaria. La posibilidad de acceder a estos conocimientos supone una nueva forma de pensamiento global en lo que a cuestiones biológicas se refiere, aunque la interpretación y gestión de esta información precise el desarrollo de herramientas estadísticas y bioinformáticas de probada eficacia y potencia.

- **Respiración ovocitaria.** El estudio del metabolismo embrionario, y en particular del consumo de oxígeno, puede mejorar la selección embrionaria a partir de la identificación de los embriones con mayor competencia en el desarrollo (Tejera et al. 2011). Este factor está considerado como el mejor indicador de la actividad metabólica global (Overström, 2007) y como un parámetro importante en la evaluación de la calidad embrionaria (Harvey et al. 2004). Los resultados obtenidos aportan información relativa a la carga mitocondrial del ovocito, un factor indicativo del crecimiento y maduración ovocitaria, ya que si un ovocito tiene poco material mitocondrial, no será

capaz de completar la fecundación ni sostener el posterior desarrollo embrionario como consecuencia de la escasez de ATP (Dumollard et al. 2007). Se ha podido determinar la relación directa entre el consumo de oxígeno y la calidad embrionaria, aplicándose por primera vez este análisis en la rutina clínica (Tejera et al. 2011). La posibilidad de determinar tasas individuales de respiración en diferentes etapas del desarrollo embrionario puede resultar útil en el estudio de procesos biológicos como la respuesta embrionaria en situaciones de estrés o el análisis del impacto de la congelación sobre las membranas de los orgánulos celulares.

- **Recambio de aminoácidos.** En las últimas décadas, la comunidad científica ha manifestado un gran interés sobre cómo los embriones tempranos modifican el medio de cultivo *in vitro*. A raíz de esta curiosidad, se publican trabajos que demuestran que la presencia de determinados aminoácidos en el medio de cultivo mejora el desarrollo embrionario en modelos animales y en humanos (Devreker et al. 2001). El experimento clave que vincula el perfil aminoácido con el potencial de desarrollo embrionario fue diseñado por Houghton (Houghton et al. 2002), quien demostró que el modo en el que embriones de día 2 modifican el contenido en aminoácidos del medio de cultivo puede ayudar a predecir su posterior desarrollo a blastocisto; este trabajo es el primero en revelar la conexión entre viabilidad embrionaria y consumo/síntesis de aminoácidos, independientemente de otros factores como la evaluación morfológica.

- **Las “-ómicas” como herramientas de investigación.** Estas nuevas tecnologías están cambiando la percepción sobre la fisiología de los mamíferos al tratarse de instrumentos que amplían la descripción fenotípica.

• **genómica.** La secuencia del ADN condiciona la síntesis de proteínas y el fenotipo, por lo que no se puede descartar la presencia de determinantes genéticos

relacionados con la viabilidad embrionaria, aunque las variaciones específicas del ADN relacionadas con una mejora en las perspectivas de desarrollo no han sido identificadas. El estudio de la integridad y de la dotación cromosómica es importante debido a que las aneuploidías no son compatibles con el desarrollo de individuos sanos, son la causa más común de aborto espontáneo y son muy frecuentes a nivel embrionario (Munne et al. 1995).

- **transcriptómica.** Se basa en la identificación de genes que se expresan diferencialmente entre dos o más situaciones de estudio y que resultan adecuados en la caracterización de marcadores diagnóstico; las ventajas derivadas de estos estudios se deben a que los cambios fisiológicos no se traducen en variaciones importantes de la expresión génica y a que la mayoría de genes que actúan conjuntamente en un contexto concreto son buenos indicadores de una respuesta fisiológica real (Hamel et al. 2008).

- **proteómica.** La caracterización de las proteínas expresadas y secretadas por el embrión durante todas las etapas de desarrollo preimplantatorio aportan una nueva visión de los procesos biológicos y celulares afectados. Los resultados indican que embriones morfológicamente similares presentan perfiles proteicos distintos y que una activación adecuada del genoma embrionario, y del proteoma, actúa como un factor crítico del potencial de desarrollo embrionario (Katz-Jaffe and Gardner 2008).

Las"-ómicas" descritas hasta ahora tienen en común un carácter invasivo y que ninguna de ellas es lo suficientemente sencilla como para incorporarla a la práctica diaria del laboratorio de Embriología. Pese a estas dificultades, se consigue poner a punto una nueva metodología de fácil aplicación basada en el perfil metabólico del medio de cultivo embrionario:

- **metabolómica.** El examen de los metabolitos presentes en el medio de cultivo se erige en un método potencial de selección embrionaria que optimiza las

oportunidades de gestación mejorando la eficacia de los tratamientos de fecundación *in vitro*; los estudios publicados hasta el momento describen una correlación directa entre el perfil metabólico y la viabilidad embrionaria. Los perfiles metabólicos que caracterizan a los embriones en distintas etapas del desarrollo están estrechamente relacionados con la competencia del embrión, y por tanto, son capaces de predecir el resultado de un ciclo (Dominguez et al. 2008).

Cualquiera de las alternativas mencionadas hasta ahora puede emerger en un futuro como una herramienta adicional a los criterios morfológicos convencionales de selección embrionaria. Las características que deben definir a estas innovaciones tecnológicas son: un carácter no invasivo, de uso fácil, económicas, rápidas, fiables y reproducibles, que se ajusten al trabajo diario del laboratorio sin forzar cambios en la rutina y que aporten información útil a los criterios morfológicos clásicos. Sin embargo, muchas de estas técnicas todavía se encuentran en fase de investigación básica por lo que los resultados clínicos son escasos. Además, precisan de personal altamente cualificado y los centros/laboratorios de reproducción no suelen contar con el equipamiento necesario requiriendo el traslado de las muestras a centros especializados. Finalmente no olvidemos mencionar que se trata de ensayos de difícil aplicación clínica por su complejidad y que suelen ser invasivos ya que la mayoría precisan de cierto grado de manipulación embrionaria.

1.4. Marcadores morfocinéticos y tecnología time-lapse

Dentro de los nuevos marcadores de viabilidad embrionaria tal vez estos sean los únicos que hayan demostrado superar la mayoría de los obstáculos mencionados anteriormente. La introducción de la tecnología time-lapse en la clínica diaria es muy

reciente, sin embargo, ya ha dado signos de ser una herramienta de gran utilidad en la mejora de la selección embrionaria y en consecuencia de conseguir un aumento en las tasas de éxito en los tratamientos de reproducción asistida (Meseguer et al. 2012, Rubio et al. 2014).

Partiendo de la premisa que el desarrollo embrionario es un proceso “dinámico” resulta atractivo pensar en un sistema que permita hacer una monitorización continua de dicho proceso. El segundo capítulo de esta tesis doctoral se centrará en hacer una descripción detallada de esta nueva tecnología así como del uso de la cinética como marcador de viabilidad embrionaria.

CAPÍTULO II.

TECNOLOGÍA TIME-LAPSE

Tecnología time-lapse: evaluación del desarrollo embrionario y nuevos marcadores de selección embrionaria

Natalia Basile y Marcos Meseguer

Expert Review of Obstetric & Gynecology

Vol.7, No.2 pp. 175-190, 2012

Durante los últimos 5 años la visión del desarrollo embrionario por parte de los embriólogos se ha visto revolucionada. Tras haber evaluado el desarrollo embrionario de forma puntual y estática durante más de 30 años, se nos presenta una tecnología que transforma lo puntual en continuo y lo estático en dinámico. Sorprendentemente, esta tecnología ya se encontraba disponible hace muchos años en el campo de la investigación (Cole, 1967), pero recientemente y gracias a los grandes avances en la bioinformática, los sistemas han evolucionado de versiones caseras (Lemmen et al. 2008) a equipos comerciales más adecuados para uso clínico (Kirkegaard et al. 2012, Meseguer et al. 2011, Wong et al. 2010). Este capítulo pretende introducir al lector en esta nueva tecnología, estudiar sus aplicaciones en el campo de la embriología y describir su uso como herramienta de selección embrionaria.

2.1. Desarrollo embrionario y time-lapse

El desarrollo embrionario temprano es un proceso dinámico que comienza con la fusión del ovocito y el espermatozoide. El cigoto resultante sufre una reprogramación epigenética seguida por una serie de divisiones celulares que dependerán inicialmente del ARN y las proteínas maternas. Posteriormente, se produce la activación del genoma embrionario, el pre-embrión compacta, forma una mórula y finalmente se diferencia celularmente para formar un blastocisto. Durante los últimos 30 años este proceso "dinámico" se ha descrito basado en observaciones "estáticas" y, si bien hemos adquirido grandes conocimientos, es inevitable pensar en tres grandes desventajas:

1) La microscopía estática convencional está vinculada a momentos puntuales y específicos dentro de la rutina diaria en un laboratorio de FIV, con la consiguiente pérdida de información sobre el resto del desarrollo embrionario.

2) La microscopía estática convencional genera una situación de estrés en el embrión ya que requiere el aislamiento temporal de sus condiciones óptimas de cultivo.

3) La microscopía estática convencional sólo permite interpretaciones cualitativas que son altamente subjetivas y propensas a variaciones intra e inter-observador (Baxter Bendus et al. 2006)

Por otro lado los equipos time-lapse (TMS) están constituidos por una combinación de cámara + microscopio + incubador + software. Esta combinación ofrece la posibilidad de hacer una monitorización ininterrumpida de los embriones a la vez que proporciona condiciones muy estables para su cultivo (Cruz et al. 2011, Meseguer et al. 2011). La captura de imágenes suele llevarse a cabo en períodos de entre 5-20 minutos dependiendo del sistema y de la instrucción del operador. A continuación se describen los distintos tipos de TMS con sus ventajas y desventajas.

2.2. Equipos TMS

Es importante tener en cuenta que los requisitos y exigencias de un TMS van a depender del uso que se le destine. Si el fin es la investigación, el TMS deberá proporcionar la mayor cantidad de información posible y disponer de un software sofisticado para la interpretación y análisis de los datos. Si el fin es de uso clínico, el TMS deberá generar sólo algunos datos claves, fácilmente interpretables y de manejo muy sencillo; lo que conocemos como equipos “user-friendly”.

Actualmente existen 3 alternativas diferentes de equipos TMS:

1) Construir un incubador alrededor de un microscopio convencional. Un ejemplo de ello es el Tokai –hit Ltd[®] (Japan). Su elevada calidad de imagen y la complejidad de las opciones ofrecidas lo convierten en una herramienta de gran utilidad en investigación. Sin embargo, la estabilidad y condiciones del cultivo embrionario no son lo suficientemente óptimas como para ser utilizado clínicamente.

2) Insertar un microscopio dentro de un incubador convencional. Un ejemplo de ello es el sistema Primo Vision[®] (Vitrolife); este sistema es menos flexible pero proporciona unas condiciones de cultivo óptimas y estables. Otro ejemplo es el Eeva[®] (“Embryo early viability assessment” Merck-Serono); este sistema ha sido diseñado para ser insertado dentro de la mayoría de los incubadores convencionales y proporciona una captura de imágenes automática en campo oscuro cuyo fin es analizar información cuantitativa del desarrollo embrionario.

3) Un equipo con ambas aplicaciones integradas (incubador y microscopio). En esta sección nos centraremos en dos sistemas diferentes. Ambos proporcionan unas condiciones de cultivo estables pero han sido diseñados con fines diferentes.

El primero de ellos es el Biostation-Nikon[®] (Japan), con gran cantidad de opciones de imagen y canales para imágenes fluorescentes. Además, está equipado con

un software sofisticado para interpretar toda la información adquirida lo cual lo convierte en una herramienta de gran utilidad en proyectos de investigación. El segundo sistema es el Embryoscope[®] (Unisense Fertilitech, Denmark), diseñado para uso clínico. Su principal ventaja es que tiene una gran capacidad, pudiendo adquirir automáticamente imágenes de hasta 72 embriones cultivados de forma individual. Además, este incubador utiliza un software de análisis de imagen en el cual los eventos y tiempos de divisiones celulares pueden ser interpretados de manera sencilla.

Este último equipo, el Embryoscope, es en el que hemos basado los estudios que forman parte de esta tesis doctoral. La **tabla 1** resume las diferencias desde el punto de vista técnico y clínico de tres aparatos disponibles hoy en día para el uso clínico: Eeva[®], Primo Vision[®] y Embryoscope[®].

2.2.1. Ventajas de los TMS

La tecnología time-lapse ofrece varias ventajas con respecto a la microscopía estática convencional. Por empezar, permite el mantenimiento de condiciones óptimas de cultivo durante todo el desarrollo embrionario. Es importante destacar que el pH, la temperatura y la humedad son cruciales para el correcto desarrollo de los embriones in vitro y es imposible evitar que estos parámetros se alteren cuando realizamos microscopía convencional. Por otro lado, nos permiten hacer una monitorización continua de los embriones ya que los mismos son cultivados directamente bajo una cámara (Primo Visión[®], Eeva[®]) o son colocados por encima de una cámara a intervalos determinados de tiempo (Embryoscope[®]).

Tabla 1. Características técnicas y clínicas de Embryoscope[®], Primo-Vision[®] y Eeva[®]

	EMBRYOSCOPE [®] UNISENSE 	PRIMO VISION [®] VITROLIFE 	EEVA [®] AUXOGYN 
Características técnicas			
Incubador integrado	Sí	No	No
Óptica	Contraste Hoffman	Contraste Hoffman	Campo oscuro
Frecuencia de imágenes	Cada 10 minutos	Cada 10 minutos	Cada 5 minutos
Planos focales	7	1	1
Capacidad de pacientes	6/sistema	1/cámara	1/cámara
N embriones/pt	12 cultivo individual	16 cultivo en grupo	12 cultivo en grupo
Características clínicas			
Herramienta de diagnóstico automático	No	No	Sí
Depende del usuario	Sí	Sí	No
Consume tiempo	Sí	Sí	Automático
Incluye algoritmo	Solo si lo define el usuario	Solo si lo define el usuario	Sí
Predicción llegada a blastocisto en D3	No	No	Sí (Wong, 2010)
Predicción implantación en D3	Sí (Meseguer, 2011)	No	No

En contraste con la microscopía convencional (que se realiza solo una vez al día), esta monitorización continua nos permite realizar determinaciones precisas de las divisiones celulares y una observación más cercana de acontecimientos morfológicos tales como el inicio de la compactación y la aparición de la cavidad del blastocelo. La mejora en las condiciones de cultivo y la disponibilidad de información objetiva, precisa, cualitativa y cuantitativa representan las principales ventajas de estos sistemas.

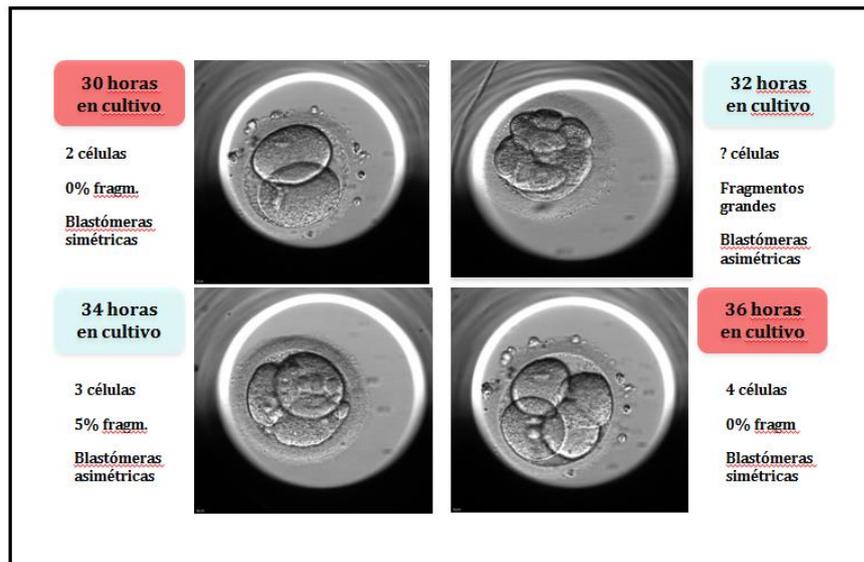


Figura 2. Aspecto morfológico del mismo embrión en un período de 6 horas

Como ventajas secundarias podemos mencionar que el cultivo de embriones en los TMS nos evidencia posibles errores en la clasificación de embriones. Es sabido que el aspecto morfológico de un embrión puede cambiar en un período muy corto de tiempo (**Figura 2**) lo cual conduce a decisiones diferentes con respecto al tipo y número de embriones a transferir. Este fenómeno ha sido descrito por Montag en un estudio donde se comparan datos provenientes de TMS y datos provenientes de microscopía convencional (Montag et al. 2011). Fue llamativo que el 46% de los embriones analizados mostraban un score/número de células diferente en un período de tiempo muy corto (4 horas). Más específicamente a las 38h, 40h y 42hs.

Cabe destacar asimismo el ahorro de tiempo ya que no es necesario entrar al laboratorio para la evaluación embrionaria y la disminución de los costes en los medios de cultivo, material fungible, aceite mineral y CO₂. Además, algunos TMS ocupan menos espacio físico en el laboratorio. Por otro lado estos sistemas nos proporcionan una gran cantidad de datos e imágenes que nos servirán de fuente de información para futuros estudios retrospectivos y también nos permitirán detectar eventos que normalmente se producen entre una observación y otra (y que normalmente no veríamos si estuviéramos haciendo microscopía convencional) como por ejemplo: divisiones irregulares, formación y reabsorción de fragmentos, aparición / desaparición de multinucleación, cambios en la simetría de blastómeras, etc.

Los TMS también han sido de gran utilidad para definir la duración de los primeros ciclos celulares así como los tiempos entre dos divisiones consecutivas. Ciclos celulares extremadamente cortos pueden implicar una distribución anormal del ADN en las blastómeras y/o errores en la replicación. Utilizando esta tecnología ahora podemos identificar de forma precisa cada ciclo celular y detectar duraciones anormales. Un ejemplo de esto es la división directa de 1 a 3 células (Meseguer et al. 2011). Se ha observado que aquellos embriones en los cuales se produce una división directa de 1 a 3 células (menos de 5 horas) la tasa de implantación es muy baja, en torno al 3% (Rubio et al. 2012).

2.2.2. Limitaciones de los TMS

A pesar de sus numerosas ventajas, los TMS presentan algunas limitaciones. Desde el punto de vista del embriólogo una de las principales desventajas es la **incapacidad de poder mover/rotar los embriones** durante su observación. Debemos recordar que los embriones son estructuras tridimensionales, y que algunas de las

estructuras que son claramente visibles en un plano (por ejemplo la multinucleación) pueden no serlo en el siguiente, especialmente si se trata de embriones muy fragmentados. Otro problema está relacionado con la **colocación de los embriones bajo el campo de visión** del microscopio y con el movimiento de los embriones dentro del pocillo. Los TMS de cultivo individual utilizan placas de cultivo con pocillos individuales que se apoyan en un brazo motorizado (Embryoscope[®]). Este brazo motorizado, a su vez, coloca cada pocillo dentro del campo de visión del microscopio a una frecuencia determinada para que las imágenes puedan tomarse. El otro tipo de sistemas (PrimoVision[®], Eeva[®]) utiliza placas con micropocillos donde, si bien los embriones se encuentran separados (cada uno en su micropocillo), todos comparten la misma gota de medio de cultivo por encima. Estas placas están especialmente diseñadas para mantener constantemente a todos los embriones dentro del campo de visión del microscopio. Ambas opciones son válidas, aunque en el caso de la segunda existen preocupaciones sobre el posible desplazamiento de los embriones entre los pocillos. Esto limita su utilidad en algunas situaciones, por ejemplo en pacientes que realizan diagnóstico genético pre-implantacional (DGP) donde asegurar un cultivo individual es prácticamente obligatorio.

La **aparición de burbujas** en el medio de cultivo también es un problema ya que impide que se puedan evaluar correctamente los embriones, pudiéndose perder algún evento importante del desarrollo del mismo (Wong et al. 2013). Otro reto de estos sistemas tiene que ver con la información cualitativa que podamos obtener dependiendo del estadio y la calidad del embrión a analizar. Cuanto más avanzado en su desarrollo más difícil será contar el número de células y cuanto más fragmentado esté el embrión más complicado será contar y evaluar las divisiones celulares. Esto se observa aún en aquellos equipos que proporcionan varios planos de enfoque.

Finalmente y con respecto al cálculo de los tiempos de división debemos reconocer que el tiempo definido como tiempo cero (t_0) es una media de todos los ovocitos de la cohorte, por lo que **hay un pequeño desfase** ya que obviamente no todos los ovocitos se microinyectan exactamente al mismo tiempo. Sin embargo este desfase es muy pequeño y no afectaría a los resultados obtenidos.

2.2.3. Seguridad de los TMS

El efecto negativo de la luz sobre los embriones ha sido objeto de estudio por parte de diferentes grupos, al observarse un retraso en las divisiones celulares de los embriones de conejo y ratón que eran sometidos a exposiciones de luz durante los procedimientos realizados en el laboratorio de FIV (Ottosen et al. 2007). Consciente de estos y otros efectos adversos, el embriólogo del laboratorio de FIV intenta reducir la frecuencia de las observaciones bajo el microscopio convencional. En el caso de los TMS esto no representa un problema ya que no es necesario abrir el incubador para observar los embriones. Sin embargo, en los TMS, los embriones se ven expuestos periódicamente a la luz cada vez que se adquiere una imagen lo cual ha generado cierta preocupación dentro de la comunidad científica. Sorprendentemente se observa que el tiempo total de exposición a la luz en los TMS durante 3 días de cultivo (y con adquisición de 1,420 imágenes) dura unos 57 segundos, lo que se compara favorablemente con respecto al microscopio convencional, para el cual la exposición a la luz dura unos 167 segundos durante un tratamiento de FIV estándar (Ottosen et al. 2007).

No se encontraron diferencias en las tasas de embarazo al comparar embriones cultivados en un incubador convencional respecto de un TMS (Mio and Maeda 2008). A pesar de que no se comparó morfología ni calidad embrionaria, sus resultados

demuestran que la exposición periódica a la luz no perjudica los resultados clínicos. Por último, se obtuvieron resultados similares en un estudio prospectivo en el que se compararon tasas de fecundación, tasas de división y morfología entre embriones cultivados en un TMS vs. un incubador convencional (Nakahara et al. 2010). En este estudio no se vieron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros analizados, concluyendo que no existe un efecto negativo por parte de los TMS y confirmando su utilidad como herramienta de trabajo segura en el laboratorio de FIV para la clínica diaria.

En este punto merece la pena resaltar el trabajo realizado por Cruz para valorar la seguridad de los TMS (Cruz et al. 2011). En este estudio se reclutaron pacientes del programa de ovodonación para minimizar las posibles variaciones debidas a la calidad ovocitaria de las pacientes infértiles. El objetivo de este estudio fue el de evaluar si el Embryoscope[®] proporcionaba unas condiciones de cultivo mejores y más seguras que un incubador convencional. A pesar de que no hay datos disponibles sobre los recién nacidos vivos, sí se pudo observar que no hay diferencias con respecto a las tasas de llegada a blastocisto, porcentajes de embriones vitrificados, porcentajes de embriones transferidos y porcentajes de embriones no viables (**Figura 3**). Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto a tasas de embarazo. Es importante destacar que en ese estudio la selección embrionaria se basó exclusivamente en morfología independientemente del sistema en el que estuvieran cultivados. Es decir, no se tuvo en cuenta la información extra proporcionada por el TMS en el momento de seleccionar los embriones para la transferencia.

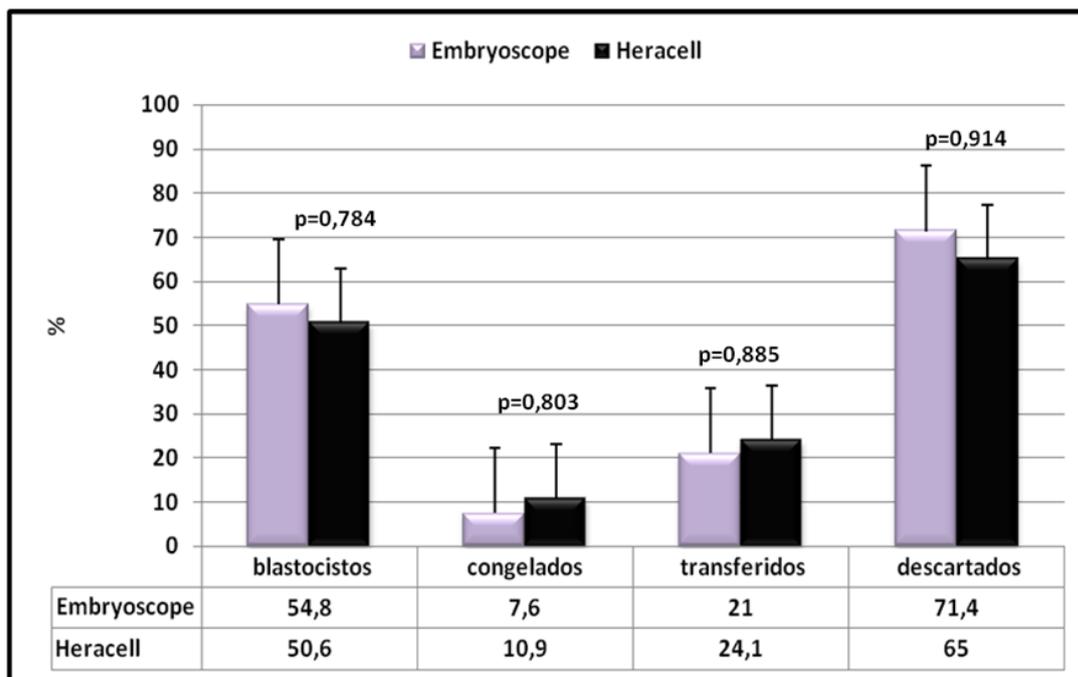


Figura 3. Tasa de blastocisto alcanzada, proporción de embriones transferidos, congelados y no viables en función del tipo de incubador. No se observan diferencias significativas entre los 2 tipos de incubadores en ningunos de los parámetros analizados (Cruz et al. 2011)

Con esto se confirma que el Embryoscope® proporciona unas condiciones de cultivo estables y controladas, además de ofrecer información más detallada y precisa del desarrollo embrionario desde un punto de vista dinámico.

2.3. Marcadores cinéticos de viabilidad embrionaria

Como hemos mencionado en la introducción, los marcadores morfocinéticos forman parte de un grupo de nuevos marcadores de viabilidad embrionaria que ayudan al embriólogo a realizar una mejor selección basándose en información cuantificable y objetiva. En la última década, numerosos estudios se han centrado en la búsqueda de estos marcadores morfocinéticos (Azzarello et al. 2012, Campbell et al. 2013, Chamayou et al. 2013, Dal Canto et al. 2012, Meseguer et al. 2011, Wong et al. 2010) dando lugar a distintos modelos y algoritmos. A su vez estos algoritmos han sido el

punto de partida para el análisis del impacto de distintos factores intrínsecos y extrínsecos sobre las variables morfocinéticas incluidas en ellos (Bellver et al. 2013, Ciray et al. 2012, Freour et al. 2013, Munoz et al. 2012, Basile et al. 2013).

Nos centraremos particularmente en el algoritmo publicado por Meseguer (Meseguer et al. 2011). En este estudio, se identificaron los tiempos exactos de numerosos parámetros morfocinéticos, definiéndose el tiempo de división como el tiempo exacto en el que las nuevas blastómeras se ven separadas completamente por membranas claramente definidas.

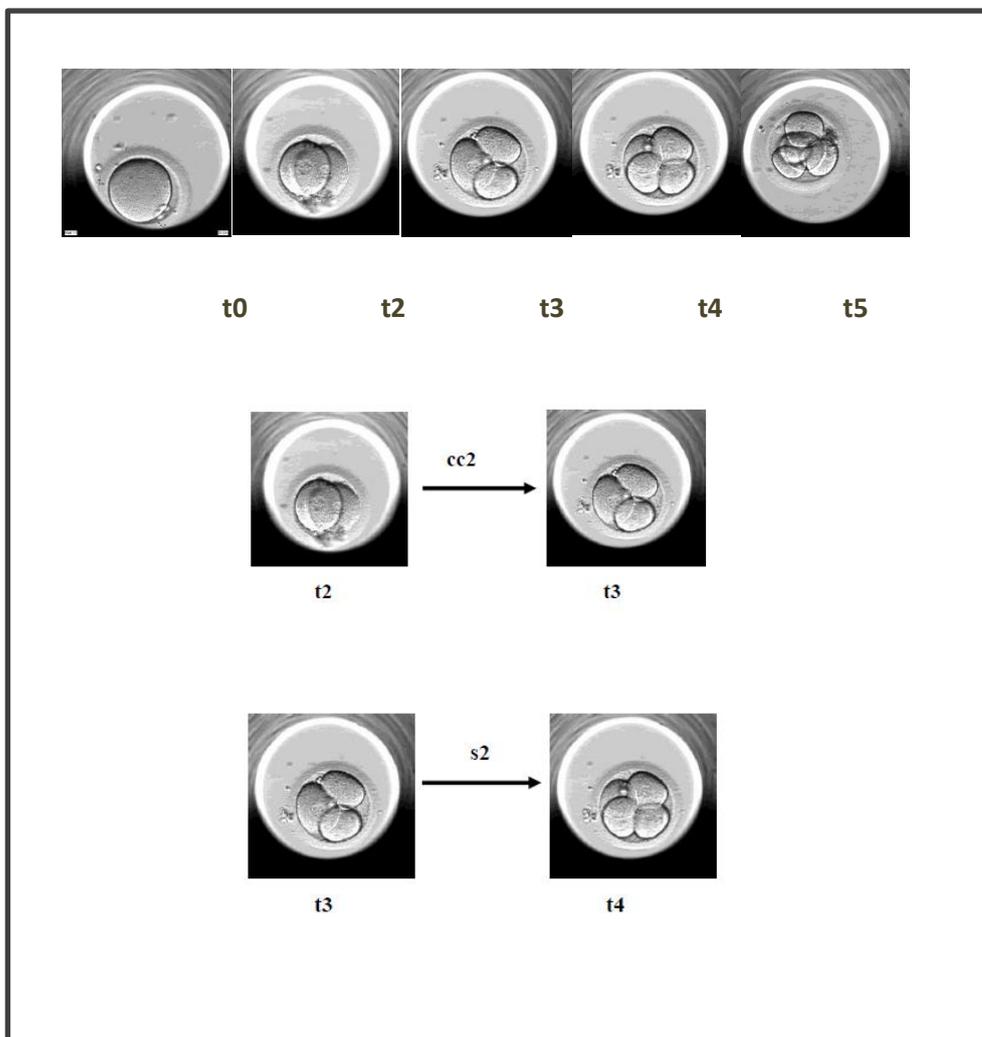


Figura 4. Imágenes de desarrollo embrionario correspondiente a los tiempos exactos definidos como t0, t2, t3, t4, t5, cc2 (t3-t2) y s2 (t4-t3)

De este modo se define la primera división embrionaria que da lugar a dos células hijas como t2, la segunda división a 3 células como t3, la tercera división a 4 células como t4 y la cuarta división a 5 células como t5. Además, se evaluaron parámetros relacionados con la duración de los ciclos celulares, definiendo el segundo ciclo celular (cc2) como el tiempo que el embrión permanece en 2 células (t3-t2) y la segunda sincronía (s2) como el tiempo que transcurre de 3 a 4 células (t4-t3), (**Figura 4**).

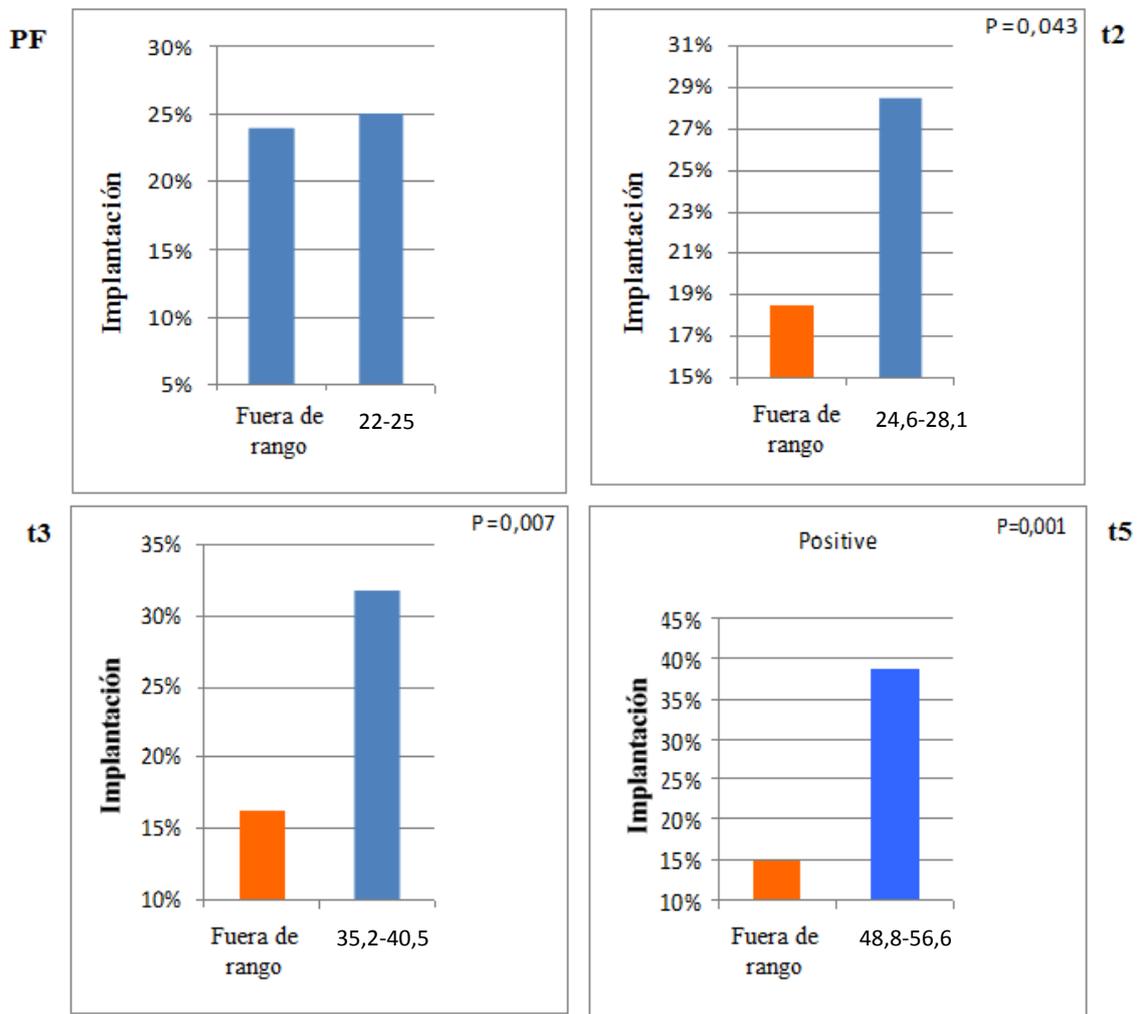


Figura 5a. Rangos óptimos para las variables PF (Pronuclear fading), t2, t3 y t5. Se observan diferencias significativas en las tasas de implantación entre embriones fuera y dentro del rango óptimo

Una vez definidas las variables se analizan los tiempos medios de cada una de ellas teniendo en cuenta solamente embriones con implantación conocida (100% donde el número de sacos embrionarios coincide con el número de embriones transferidos y 0% donde no se ve presencia de saco embrionario). Luego, para correlacionar la cinética embrionaria con la implantación, se transforman los tiempos medios división para cada variable (variable continua) en cuartiles de tiempo (variable categórica). Esto permite tener, para cada variable, 4 rangos de tiempo representados por el mismo número de embriones. Posteriormente se correlacionó las tasas de implantación con los respectivos cuartiles y se definieron los “rangos óptimos” teniendo en cuenta los dos cuartiles con mayor probabilidad de implantación (**Figuras 5a y 5b**).

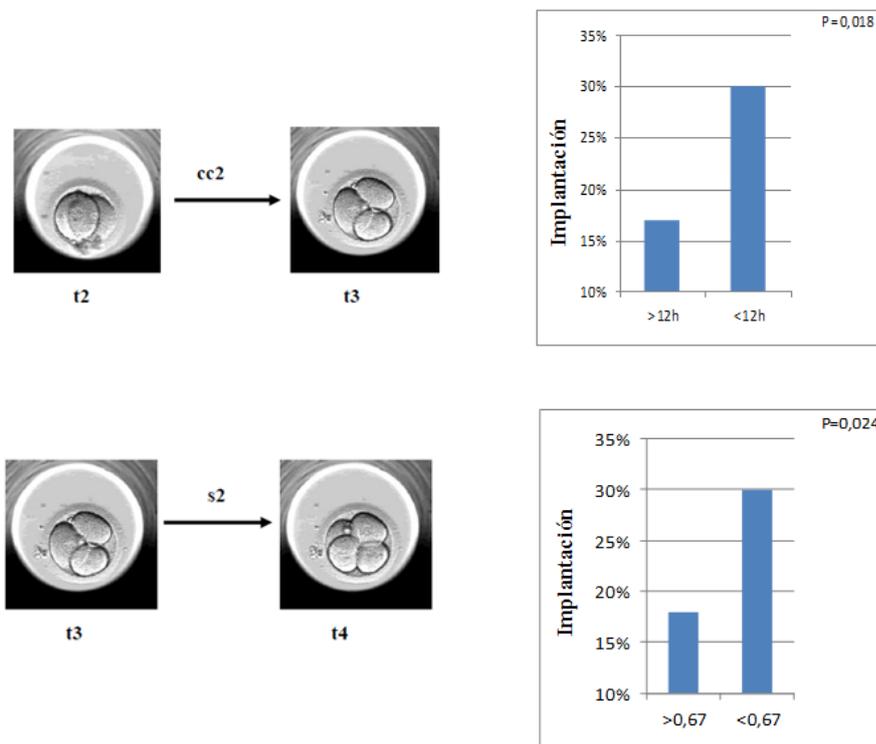


Figura 5b. Rangos óptimos para las variables cc_2 (t_3-t_2) y s_2 (t_4-t_3). Se observan diferencias significativas en las tasas de implantación entre embriones dentro y fuera del rango óptimo

Teniendo en cuenta estas diferencias se realizó un análisis de regresión logística para seleccionar y ordenar aquellas variables (expresadas como variables binarias dentro y fuera del rango óptimo) con mayor relevancia respecto a la tasa de implantación. El modelo identificó las variables t5 (OR = 3,31; IC 95% 1,65–6,66) seguido de s2 (OR = 2,04; IC 95% 1,07–4,07) y cc2 (OR = 1,84; IC 95% 0,95–3,58) como las variables más relevantes para describir embriones que implantan. Un análisis de curva ROC para determinar las propiedades predictivas de este modelo con respecto a las probabilidades de implantación dio un valor de área debajo de la curva de 0,720 (IC 95% 0,645-0,795).

En este mismo estudio se identificaron además tres fenómenos relacionados con un menor potencial de implantación del embrión:

a) El primero, y que solamente se puede detectar gracias a la tecnología time-lapse, es la división abrupta de 1 a 3 células. Normalmente los embriones se dividen de 1 a 2 y luego de 2 a 3 células. Sin embargo existe un comportamiento anormal en el cual el embrión pasa abruptamente de 1 a 3 células en menos de 5 horas. En este estudio se observó que aquellos embriones que presentaban este fenómeno raramente implantaban.

b) El segundo se refiere al tamaño de las blastómeras tras la primera división celular. Los resultados mostraron que los embriones de dos células con blastómeras asimétricas (refiriéndose como tal a una diferencia de tamaño mayor del 25% entre ambas) también tenían baja capacidad de implantación.

c) El tercer fenómeno hace referencia a la multinucleación en el estadio de 4 células. La presencia de una sola blastómera multinucleada tiene efectos importantes en cuanto a las tasas de implantación del embrión analizado.

Estos tres eventos son considerados hoy en día como criterios de “exclusión” en la selección de embriones a transferir.

A partir de estos resultados se plantea el diseño de un modelo multivariable para predecir la implantación basada en una combinación de: morfología estándar, criterios de exclusión y criterios de inclusión. La clasificación jerárquica comienza con un examen morfológico de todos los embriones para descartar a aquéllos que claramente no son viables; estos embriones no se tendrán en cuenta en el momento de la transferencia embrionaria y se descartarán (categoría F). En el siguiente paso, se excluyen los embriones que cumplan con alguno de los criterios de exclusión mencionados anteriormente: división directa de 1 a 3 células; embriones asimétricos en el estadio de 2 células, y multinucleación en 4 células (categoría E). Finalmente, se clasifica los embriones restantes siguiendo una estricta jerarquía basada en las variables binarias de tiempo t_5 , s_2 y cc_2 .

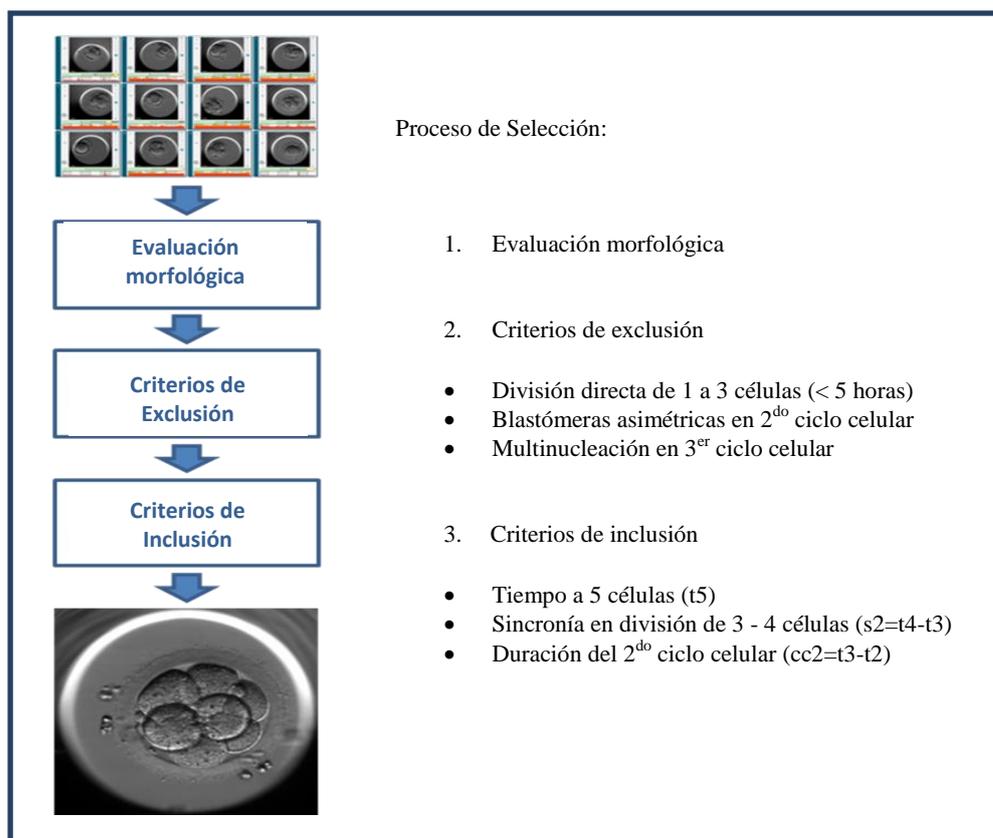


Figura 6. Modelo de selección embrionaria. El proceso de selección sigue 3 pasos: 1.- evaluación morfológica; 2.- criterios de exclusión; 3.- criterios de inclusión

En primer lugar, si los valores de t5 están incluidos dentro del rango óptimo (48,8-56,6 horas), el embrión se clasifica como A o B; si el valor de t5 se localiza fuera del rango óptimo, el embrión se define como C o D. Para el caso de s2, si el tiempo de división está dentro del rango óptimo ($\leq 0,76$ horas), el embrión se clasifica como A o C dependiendo del valor de t5; y si el valor de s2 está fuera del rango óptimo, el embrión se clasifica como B o D según t5. Finalmente, se puede categorizar a los embriones con un valor adicional positivo (+) si $cc2 \leq 11,9$ horas (A+/B+/C+/D+) o negativo (-) si $cc2 > 11,9$ horas (A-/B-/C-/D-) (Figuras 6 y 7).

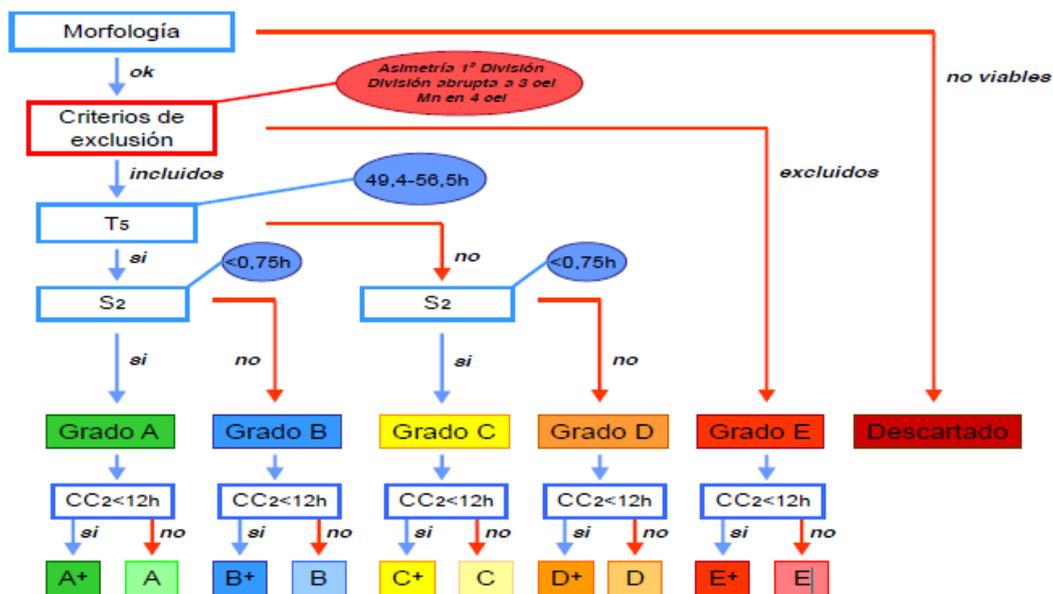


Figura 7. Algoritmo de selección embrionaria (Mesguer et al. 2011). $cc2$ ($t3-t2$) y $s2$ ($t4-t3$)

Basado en este algoritmo se lleva a cabo uno de los mayores estudios retrospectivos, comparando tasas de embarazo entre un incubador convencional y un TMS (Embryoscope®). Los resultados obtenidos, tras aplicar los factores de confusión que fueron relevantes, mostraron una mejora relativa del 20% en las tasas de embarazo en el TMS frente al incubador convencional. La tasa de embarazo por ciclo iniciado era de un 44,9%, por lo que una mejora relativa de un 20% implica que si esos ciclos

hubiesen sido cultivados en el TMS la tasa sería de un 53,9%, es decir, una mejora absoluta de un 9%. Estos resultados han sido confirmados a través de un estudio prospectivo aleatorio publicado este año (Rubio et al. 2014)

2.3.1. Marcadores en estadios tempranos que permiten predecir la capacidad de formación de blastocistos

El cultivo prolongado de los embriones hasta estadio de blastocisto surge como una posible estrategia para favorecer la selección de embriones con mayor potencial de implantación. Esto resulta particularmente atractivo en aquellos casos donde se realiza transferencia selectiva de un solo embrión por elección (eSET). Sin embargo, debemos tener en cuenta los posibles inconvenientes de hacer un cultivo prolongado; cabe mencionar: un mayor coste económico, el riesgo de cancelaciones de ciclos y los posibles problemas epigenéticos asociados a una prolongada exposición a condiciones *in vitro*.

Recientemente, se ha observado que el desarrollo embrionario a blastocisto está ligado a tiempos concretos en los estadios tempranos de desarrollo y se propone un algoritmo con el objetivo de diagnosticar tempranamente el potencial de un embrión (Wong et al. 2010). Las variables incluidas en el algoritmo son: duración de la primera división (0-33min), intervalo entre primera y segunda mitosis (7,8-14,3h) e intervalo entre la segunda y la tercera mitosis (0-5,8h). Aquellos embriones con potencial de llegar a blastocisto presentan tiempos dentro de estos rangos mientras que los que no llegan presentan citocinesis aberrantes, comportamientos inusuales y mayores tiempos en completar los procesos de citocinesis. De esta forma se propone que la información extra proporcionada por los TMS sea utilizada en un futuro para evitar el cultivo prolongado con el fin de seleccionar embriones con mayor potencial de implantación

más tempranamente. Los embriones analizados en este estudio no fueron transferidos, por lo que el análisis se basó exclusivamente en la calidad de los blastocistos y no en su implantación.

Por otro lado, se realizó un estudio retrospectivo evaluando 834 embriones provenientes del Embryoscope[®] (Cruz et al. 2012). El fin del estudio fue correlacionar parámetros cinéticos en estadios tempranos con la llegada a blastocisto. Como se puede observar en la **Figura 8** existen diferencias significativas en la mayoría de las variables tempranas entre aquellos embriones que llegan a formar blastocisto y aquellos que no. Asimismo se correlacionaron los tiempos exactos de las divisiones celulares con la calidad de los blastocistos obtenidos (óptimos vs. no óptimos). Para esto se tuvo en cuenta los criterios normalmente utilizados para clasificar a los blastocistos: se define como blastocisto “óptimo” a aquel blastocisto caracterizado por un trofoectodermo cohesivo de células finas y alargadas y una masa celular interna claramente compacta. Al igual que en el caso anterior se observaron diferencias significativas en las variables de desarrollo temprano entre los dos tipos de blastocistos (**Figura 9**). Con los resultados obtenidos se concluyó que la evaluación del desarrollo embrionario a través de la tecnología de time-lapse es una herramienta prometedora en la predicción de la formación y calidad morfológica de los blastocistos.

En un estudio reciente, también se ha observado que las divisiones celulares tempranas podían relacionarse con la capacidad del embrión de evolucionar a blastocisto e incluso de implantar (Dal Canto et al. 2012). En este caso, se observaron patrones de división similares hasta el estadio de 6 células en embriones capaces de evolucionar hasta blastocisto, y destacaron la importancia de los tiempos en los cuales los embriones alcanzaban los estadios de 7 y 8 células.

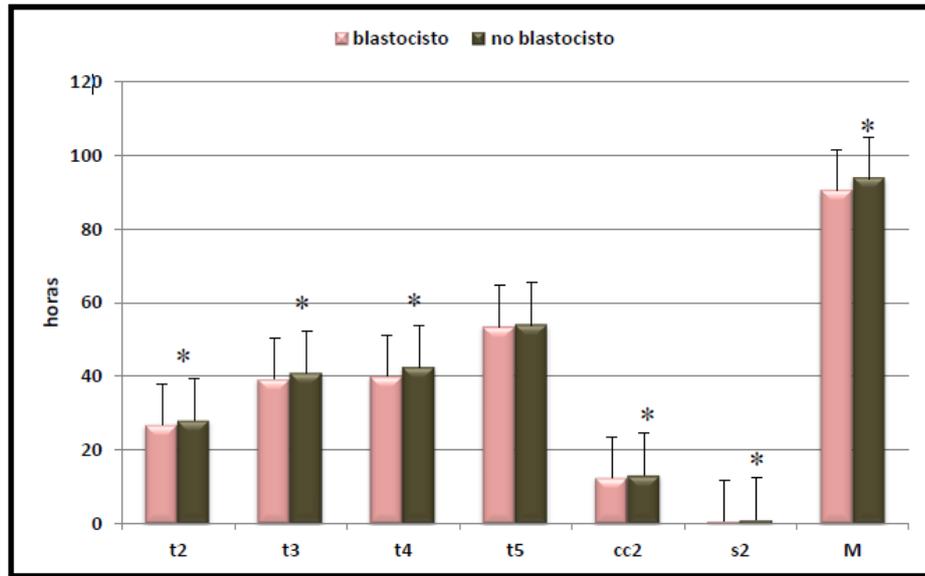


Figura 8. Cinética embrionaria y tasa de desarrollo a blastocisto (Cruz et al. 2012) cc2 (t3-t2) y s2 (t4-t3)

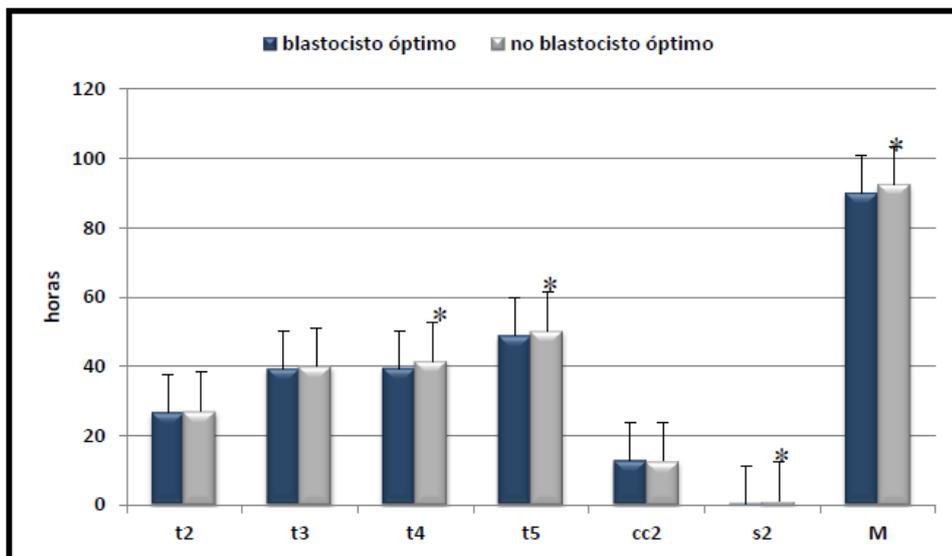


Figura 9. Cinética embrionaria y tasa de blastocisto óptimo/no óptimo (Cruz et al. 2012) cc2 (t3-t2) y s2 (t4-t3)

Al analizar el potencial de implantación, vieron que aquellos embriones que implantaban alcanzaban las 8 células antes que aquellos que no implantaban. Con estos resultados, concluyeron que las divisiones de 2 a 8 células ocurren antes en embriones con capacidad de desarrollarse a blastocisto y de implantar correctamente.

Con esta revisión, hemos comprobado que los algoritmos elaborados para la selección embrionaria varían entre los distintos grupos de trabajo. Probablemente sea debido a que los parámetros usados en cada caso no son exactamente los mismos. Sin embargo, podemos destacar algunos puntos en común. Si analizamos los tres parámetros que aparecen como predictivos en cuanto a tasas de implantación en el estudio de Wong (Wong et al. 2010), veremos que éstos se confirman en otros estudios. Los tiempos entre la primera y segunda mitosis así como la sincronía entre la segunda y tercera mitosis, que fueron parámetros definidos como relevantes en el algoritmo de Meseguer (Meseguer et al. 2011), son casi idénticos a los presentados por Wong (Wong et al. 2010). Asimismo en otro trabajo publicado se observó que los blastocistos de mejor calidad morfológica precisaban menores tiempos para completar la segunda y tercera división celular, confirmando los resultados de Wong (Hashimoto et al. 2012). De este modo, podemos ver que a pesar de que los objetivos o resultados parecen variar entre estudios, sí que existe un consenso en cuanto a los parámetros definidos como marcadores relevantes de selección embrionaria. La **figura 10** resume marcadores propuestos por diferentes grupos de estudio.

También podemos ver otras correlaciones entre los diferentes estudios. Tal y como hemos comentado anteriormente, el trabajo de Dal Canto (Dal Canto et al. 2012) encuentra mayor relevancia en las divisiones más tardías (7 y 8 células) que en las tempranas. Sin embargo, el grupo de Meseguer (Meseguer et al. 2011) observa que t_5 es el parámetro más relevante sin tener en cuenta tiempos de divisiones celulares posteriores. A pesar de que estas dos afirmaciones pueden parecer contradictorias, ambas divisiones corresponden al mismo ciclo celular por lo que realmente no son tan discrepantes. Conforme el embrión va evolucionando y el número de células va aumentando, la dificultad de evaluar los tiempos exactos de las divisiones celulares es

cada vez mayor. Por ello, los tiempos de las divisiones a partir de 5 ó 6 células pueden resultar menos precisos, sobre todo si el embrión presenta algo de fragmentación.

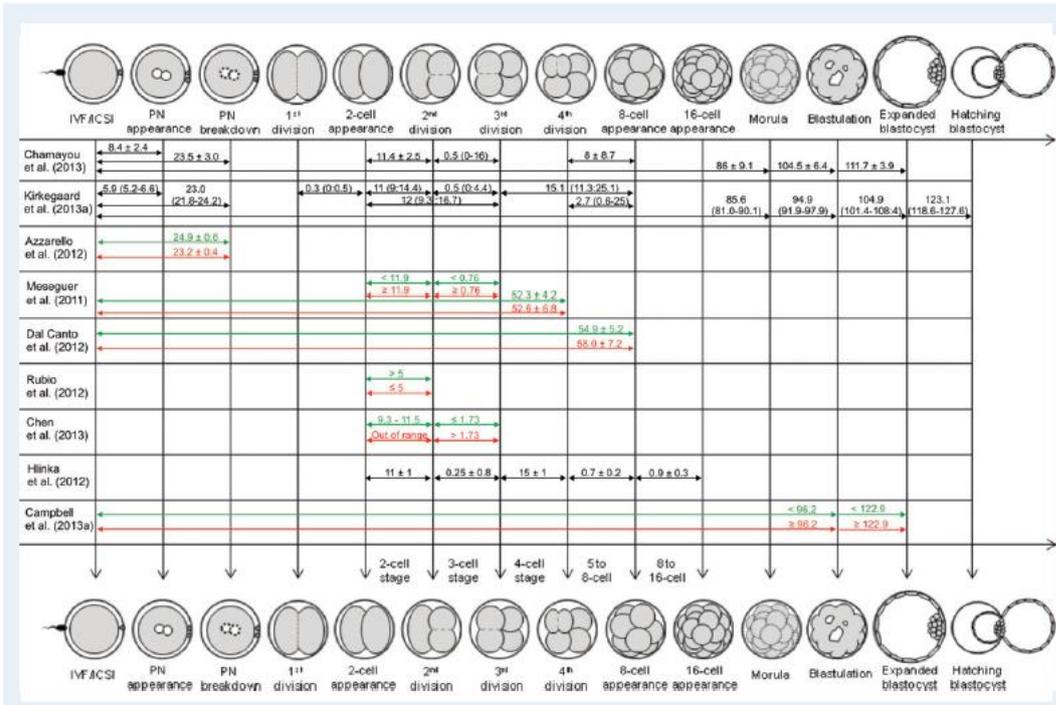


Figura 10. Esquema del desarrollo embrionario pre-implantatorio con sus correspondientes marcadores morfocinéticos. (Kaser and Racowsky 2014)

Los estudios comentados a lo largo del capítulo incluyen solamente procedimientos de ICSI. Una posible explicación al respecto es que los tiempos se expresan como horas post microinyección (hpi). En procedimientos de FIV, el punto o tiempo de partida es más difícil de definir. Si se hicieran comparaciones en cuanto a parámetros cinéticos teniendo en cuenta embriones originados a partir de ambos procedimientos (FIV-ICSI), los puntos de partida deberían definirse de diferente manera. Además, en el caso de los procedimientos de FIV convencional, la decumulación ovocitaria se lleva a cabo una vez que la fecundación ha tenido lugar. Por tanto, el análisis con time-lapse no podría realizarse hasta ese momento, no pudiendo beneficiarse de la disminución en la manipulación embrionaria.

Finalmente, es incuestionable que la tecnología time-lapse se está convirtiendo en una herramienta de gran utilidad para el embriólogo. Avances en este campo tendrán gran relevancia en el momento de implementar políticas de eSET en las clínicas ya que nos permitirá tomar decisiones basadas no sólo en el estado actual del embrión sino en una visión más completa y dinámica del desarrollo embrionario. Además es atractivo saber que esta tecnología nos brindará las herramientas necesarias para movernos desde la subjetividad hacia la objetividad en los laboratorios de FIV.

En los siguientes capítulos analizaremos si los marcadores morfocinéticos se ven afectados por el medio de cultivo utilizado en el laboratorio (factor extrínseco) o por la dotación cromosómica del embrión (factor intrínseco).

Time-lapse technology: evaluation of embryo quality and new markers for embryo selection

Expert Rev. Obstet. Gynecol. 7(2), 175–190 (2012)

Natalia Basile¹ and Marcos Meseguer^{*2}

¹IVI Madrid, Madrid, Spain
²IVI Valencia, Universidad de Valencia, Plaza de la Policía Local 3, Valencia 46015, Spain
 *Author for correspondence:
 Tel.: +34 963 050 988
 Fax: +34 963 050 999
marcos.meseguer@ivi.es

Current methods of embryo evaluation rely mainly on static observations of the embryo's morphology. These observations are inevitably restricted to specific times and, considering that the development of the embryo is a dynamic process, several critical stages in between observations may go unnoticed. These methods are also very subjective, and variations between embryologists may affect critical decisions that will, in turn, affect the overall success of the IVF clinics. On the other hand, an increased number of multiple pregnancies calls for a reduction in the number of embryos transferred, making the selection procedure even more challenging for the embryologist. Therefore, new markers that may aid the selection of embryos with higher implantation probabilities are needed. This review details what is known about time-lapse imaging, its application in embryology and the possible use of this technology as a novel selection tool.

KEYWORDS: assisted reproduction technologies • embryo cleavage • embryo kinetics • exact timing • noninvasive markers • time lapse

Since the introduction of assisted reproduction technologies, over a million babies have been born worldwide using these technologies. From a clinical point of view, two major achievements are worth mentioning:

- Physicians have learned to handle the stimulation drugs, and new recombinant versions are pure and potent, as well as safer for the patient;
- An increased knowledge of the pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome has made the frequency of this syndrome almost anecdotal.

Nonetheless, there are still two prominent shortcomings:

- A low success rate due, in part, to an inability to objectively determine which embryo has the highest potential of implantation;
- An epidemic of multiple pregnancies due to the high number of embryos that are normally transferred into the uterus.

Multiple pregnancies not only bring medical complications to the mother (e.g., gestational

diabetes, hypertension and anemia) and the baby (extreme prematurity, low birthweight and neurological damage, among others), but they also induce many social and financial problems that cannot be ignored. A reduction in the number of embryos transferred is urgently needed, but concerns have been raised that reducing the number of embryos transferred may jeopardize the success rates of IVF clinics. In some countries, legislation has been very restrictive and only allows the transfer of a single embryo in cases of good prognosis. In other countries, the law establishes an upper limit, leaving the decision regarding the number of embryos to transfer up to the physician's discretion. Thus advances in assisted reproduction laboratories need to develop more accurate methods to choose the one embryo with the highest implantation potential. Improvements in the media and culture conditions (e.g., clean air, heated surfaces and triple gas incubators) are reflected in the good quality of the embryos grown in the laboratory, but much more remains to be accomplished with respect to the selection procedure.

Table 1. Blastocyst rate, proportion of transferred and frozen embryos incubated in the time-lapse incubator versus the standard incubator.

Incubator type	Blastocyst (%)	95% CI	Frozen (%)	95% CI	Transferred (%)	95% CI
TLI (n = 238)	54.8 (n = 130)	47.5–62.1	7.6 (n = 18)	2.8–12.4	21.0 (n = 50)	15.9–26.9
SI (n = 240)	50.6 (n = 121)	44.3–56.9	10.9 (n = 26)	7.0–14.8	24.1 (n = 58)	18.7–29.5
p-value	NS		NS		NS	

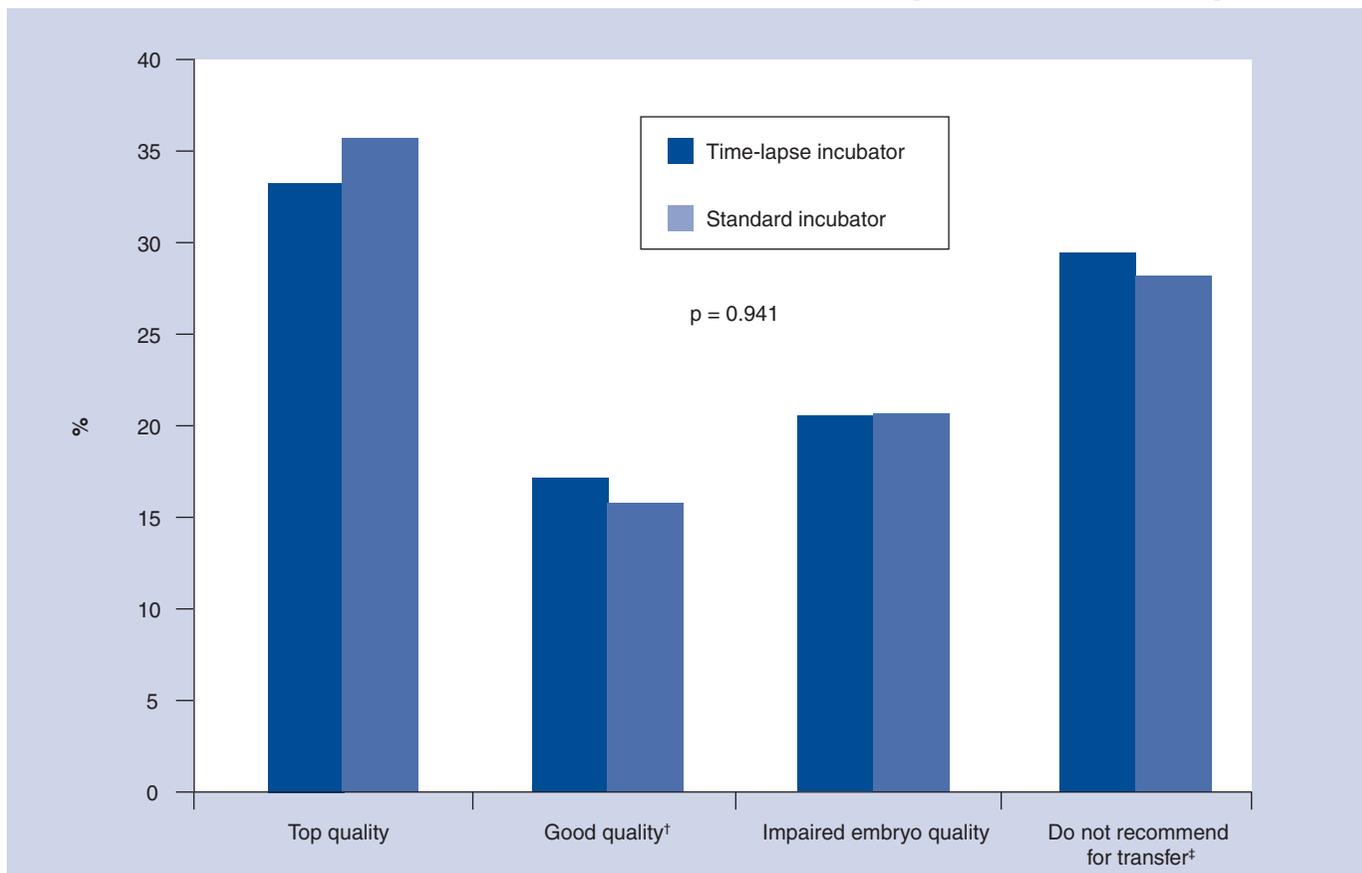
NS: Not significant; SI: Standard incubator; TLI: Time-lapse incubator.
Adapted with permission from Springer [38].

Kinetics of development

The study of cellular activity during the early stages of embryonic development has been the focus of many studies. For instance, the time between fertilization and the first cleavage is an objective parameter that can easily be determined with certain predictive values of embryo viability [1,2], and many authors have stressed its importance as a selection tool. Several explanations have been proposed to describe the mechanisms underlying the link between the first division and the future embryo development:

- The transition from one fertilized egg to a two-cell embryo depends on a highly regulated sequence of cellular processes that start with transient increases in intracellular calcium concentrations induced by the sperm's entry [3];

- Fidelity in DNA replication: the duration of the first S phase of the cell cycle appears to influence the formation of the blastocyst. A long S phase combined with a short G1 phase in the case of bovine embryos [4], or a short G2 phase in mouse embryos [5], improves the rate of blastocyst development. It is reasonable to suppose that zygotes with a shortened S phase are predisposed to an incomplete replication and/or aberrant DNA, which is not compatible with normal development to the blastocyst stage, and may impose a delay on G2 and M phases by activating a control point of the cell cycle at the level of DNA replication;
- Oocyte maturation: one related aspect is the capacity acquired by the oocyte to respond to calcium stimuli after sperm entrance.

**Figure 1. Embryo quality in standard incubator and time-lapse incubator.**

†Not for elective single-embryo transfer.

‡Includes all multinucleated embryos.

Table 2. Variables compared between patients whose embryos were cultured in the time-lapse incubator or standard incubator.

Incubator type	Patients (n)	Mean age (years)	Mean oocytes retrieved (n)	Number of transfers: one embryo	Number of transfers: two embryos	Number of transfers: three embryos	Abortion (%)	Mean FSH dose (pg/ml)	Mean LH dose (pg/ml)	Mean high-quality embryos (n)
SI	279	34.5 ± 3.6	11.1	65 (23%)	197 (71%)	17 (6%)	33 (12)	1777	161	3.57
TLI	77	34.2 ± 3.7	11.7	20 (26%)	53 (69%)	4 (5%)	11 (14)	1713	108	3.9
p-value		0.5	0.17	0.65	0.78	1	0.56	0.3	0.19	0.15
Statistical test		t-student	Mann–Whitney U	Fisher	Fisher	Fisher	Fisher	Mann–Whitney U	Mann–Whitney U	t-student

FSH: Follide-stimulating hormone; LH: Leutenizing hormone; SI: Standard incubator; TLI: Time-lapse incubator. Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

Transient increases in calcium are essential for cortical granule release, completion of meiosis and pronuclear formation [6], thus oocyte maturation is considered an important factor in determining the time of first cleavage [7];

- Inherent characteristics of gametes: the presence of the mouse *Ped* gene [8], as well as *HLA-F* [9] and *HLA-G* genes [10] in humans.

Current knowledge relating to the first cell cycle in human zygotes is based on observations made both in IVF and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles. Following the sperm's entry, oocyte metabolism intensifies, the second meiotic division is completed and the second polar body is extruded, which marks the beginning of the G1 phase of the first cell cycle [11]. Despite the observed variation in the duration and characteristics of the first cell cycle, we can draw the following general conclusions from studies based on static as well as time-lapse observations [12–14]:

- G1 phase begins with the appearance of the second polar body and the completion of the second meiotic division. Pronuclei appear, which are visible under light microscopy 7–8 h post-insemination/injection (hpi). Most of the zygotes enter the G1 phase approximately 3 hpi, and complete the G1 phase approximately 14 hpi, especially in the zygotes derived from ICSI;
- DNA synthesis (S phase) is initiated at 8–14 hpi and completed at 14–24 hpi;
- Early zygotes enter the G2 phase approximately 12 hpi and late zygotes approximately 30–31 hpi. The G2 phase takes approximately 5–6 h;
- The duration of the M phase is relatively constant (3 h), and takes place between the disappearance of the pronuclei and the first division of the zygote. Most of the zygotes enter the M phase between 24 and 30 hpi and complete their first cell cycle between 27 and 33 hpi.

The phenomenon of early cleavage and its impact on pregnancy rates was first studied by Edwards *et al.* [15]; from this point on, numerous studies have been published, in which the common idea is that the transfer of embryos with early cleavage improves pregnancy and implantation rates. Shoukir *et al.* were the first to demonstrate that the transfer of embryos that had completed their first division by 25 hpi after conventional IVF significantly improved pregnancy and implantation rates, compared with the transfer of those embryos that had not yet divided [1]. These results were also observed when compared with cycles that were of very good quality, but with 'no early cleavage', embryos were transferred. Later, Sakkas *et al.* obtained the same results but with embryos derived from ICSI cycles, where fertilization times are more defined [2]. A noteworthy aspect is that in the study by Shoukir *et al.*, the percentage of early cleavage embryos was lower than in the study by Sakkas *et al.* Still, both studies demonstrate the utility of 'early cleavage' as an indicator of embryo viability, and thus as a predictor of pregnancy. The fact that early embryos have a higher percentage of viability, regardless of the

Table 3. Results for intracytoplasmic sperm injection cycles between time-lapse incubator and standard incubator.

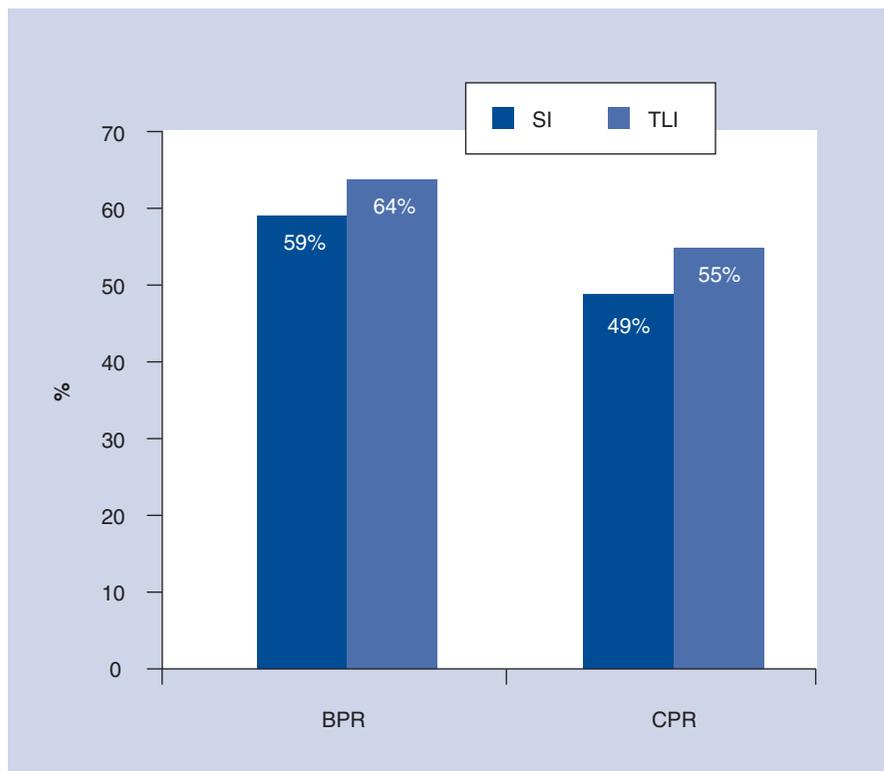
Pregnancy rate	SI, n (%)	TLI, n (%)	p-value	Statistical test
BPR	165 out of 279 (59)	49 out of 77 (64)	0.51	Fisher
CPR	138 out of 279 (49)	42 out of 77 (55)	0.44	Fisher

BPR: Biochemical pregnancy rate; CPR: Clinical pregnancy rate; SI: Standard incubator; TLI: Time-lapse incubator.
Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

insemination method utilized, rules out the effect of the time of fertilization but supports the possible involvement of intrinsic factors from the oocyte/embryo in the manifestation of this phenomenon.

Most early-cleavage studies compare data from cycles where at least one early-cleavage embryo was transferred with data from cycles where no early-cleavage embryos were transferred [1,2,16,17], which makes it rather difficult to know which embryo has implanted. To solve this issue, some research groups have focused on homogeneous transfers, where all the embryos transferred fall into a single category [18–23]; these studies clearly demonstrate an increase in pregnancy and implantation rates for early-cleavage embryos. It is worth mentioning the studies by Van Montfoort *et al.* [20] and Salumets *et al.* [22], where single embryo transfers were performed, thus providing a good opportunity to examine

the effect of early cleavage on embryo viability and implantation potential. Based on the association between early cleavage and pregnancy and implantation rates, a correlation between early cleavage and blastocyst developmental potential has been studied. Fenwick *et al.* demonstrated that early-cleavage embryos have better blastocyst formation rates, but questions whether if this is really a function of the time of the first cleavage, or if it is a reflection of an increased competence of the embryo cohort [24]. Therefore, we can assume that the study of the kinetics of development helps to discriminate between embryos of similar characteristics, enhancing the differences between them. However, owing to the characteristics of the current culture systems, monitoring of the embryo development has to be intermittent and we can end up losing accuracy in the results relating to embryo divisions; embryo observation that is linked to arbitrary times can be quite misleading when categorizing cell stage and timing of development [25]. With the introduction of time-lapse and digital-image analysis, we can not only get a full picture of the embryo development but also determine with precision the time of each cleavage and the time of any intracellular phenomena surrounding fertilization.

**Figure 2. Biochemical pregnancy rates and clinical pregnancy rates obtained for both incubators.**

BPR: Biochemical pregnancy rate; CPR: Clinical pregnancy rate; SI: Standard incubator; TLI: Time-lapse incubator.
Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

Time-lapse imaging: applications in embryology

The study of cell movement has been considered a fundamental step in understanding the dynamic nature of cells. Over the past 25 years, cell biology has benefited from the achievements in image-analysis technology. During the 1980s, the use of analog videos greatly expanded the use of the microscope as an analytical tool [26,27] and, more recently, analog systems have been replaced by digital ones [28,29]. Evaluations based on image-analysis systems add objectivity to the process of embryo selection. However, the automatic recognition of embryonic traits can be problematic owing to the quality of the image, the morphological differences depending on the developmental stage, the volume of the analyzed data, and the position and transparency of the embryo. Thanks to the development of bioinformatics, new programs have been created that allow the automatic analysis of the images obtained under the microscope. These programs also allow the quantitative assessment of key aspects of embryo development and morphology, and the storage of the data relating to these determinations. These data can

then be used to improve our knowledge on early embryonic development and lead to morphological classification systems that are more objective and sophisticated.

Time-lapse technology has been used for decades, especially in the research area [30–32], and lately the level of automatization achieved by some of the equipment in the market is making this technology more suitable for clinical use. Three possible setups are offered nowadays:

- To build an incubator around a commercially available microscope [33,34] (e.g., the Stage-top Incubator, Tokai-hit Ltd, Japan);
- To insert a microscope inside a commercially available incubator [35–37] (e.g., the Primo Vision, Cryo Innovations, Hungary; EmbryoGuard, IMT Ltd, Israel);
- To have all the items integrated in a single piece of equipment [38,39], (e.g., Embryoscope™, Unisense Fertilitect, Denmark; Live-Cell incubator, Sanyo, Japan; Bio-Station, Nikon, Japan).

Advantages

The new generation of systems that combine microscope and incubator offer the possibility to describe morphological characteristics without removing the embryos from the optimal conditions of gas and temperature. In contrast to the daily evaluations routinely performed in the IVF laboratory, the image-analysis systems offer a series of benefits that include not only the precise determination of cell divisions, but a closer monitoring of morphological events, such as irregular divisions, the formation and reabsorption of fragments [33,35,40], the initiation of compaction, and the appearance of the blastocoele cavity, among others. They also prevent incorrect interpretations of certain phenomena, such as confusing a large fragment with a cell at any given time, missing multinucleation that may appear during hours where we would normally not be checking the embryos, and categorizing a zygote as a two pronucleate (PN) when a third PN had been present at some point in time. We will discuss some of these points briefly.

Early cleavage

The timing of the first cleavage has been proposed as a marker for embryo selection, and several studies agree that transferring early-cleaving embryos leads to higher implantation rates [23,41]. However, the majority of these studies rely on single observations and several authors have addressed the need for more frequent ones. More frequent observations can impair or even arrest embryo development, due to the stress caused to the embryos while transferring them from the incubators to the inverted scopes. With time-lapse technology the advantage is clear: we can determine the exact onset and duration of the first and subsequent cell divisions automatically, without removing the embryos from their optimal culture conditions, and we can register as many observations as needed. With a conventional system, this would

Table 4. Exact time range and average, in hours after intracytoplasmic sperm injection, for pronuclei appearance and fading, first, second and third cleavage of human embryos.

Variable	Time range (h)		Average (h)
	Minimum	Maximum	
PN appearance	5.8	29.4	9.9
PN disappearance	17.7	37.5	23.7
First cleavage	19.9	40.5	26.7
Second cleavage	23.2	64.7	37.8
Third cleavage	25.34	63.87	39.3

PN: Pronucleate.
Data adapted from [39].

require the laboratory personnel to be on duty at odd hours, and it would be practically impossible to maintain a rigorous observation regimen.

Fragmentation

It is particularly useful in embryology to study the level of fragmentation, the appearance of which is common in early embryonic development. Estimation of the percentage and size of fragments during the early stages of embryo development forms part of almost all schemes of embryo classification. It is thought that specific patterns of fragment distribution, in space and time, are more closely related to the embryo competence than the fragmentation itself [42]. With a conventional system, it is difficult to distinguish between acute or progressive fragmentation, considering that the embryos are assessed only once a day. This highlights the importance of time-lapse technology, especially when taking into consideration the results of different studies that provide new insights about the morphodynamics of fragmentation, and show that this phenomenon is not stationary [33,40,43].

Multinucleation

The assessment of multinucleation represents another parameter strongly established in the IVF laboratory. Multinucleated embryos are frequently observed in the IVF laboratory, and the presence of multinucleation has been correlated with the incidence of chromosomal abnormalities, increased fragmentation, impaired cleavage and lower implantation rates [44–46].

A particular problem with the routine assessment of multinucleation is that the breakdown of the nuclear membrane normally occurs prior to cytokinesis and it only reforms in each daughter cell after the division is completed. It is, therefore, possible to miss multinucleation when observing embryos at specific time points only. By doing a continuous observation, multinucleation may be revealed during certain cell stages often missed with the standard methods of embryo evaluation. On the other hand, and on a more practical level, it should be mentioned that these types of incubation systems do not allow rotation of the embryos, and therefore cell nuclei may sometimes remain undetected owing to difficulties in their visualization (e.g., overlapping blastomeres, granular cytoplasm, and presence of cytoplasmic fragments).

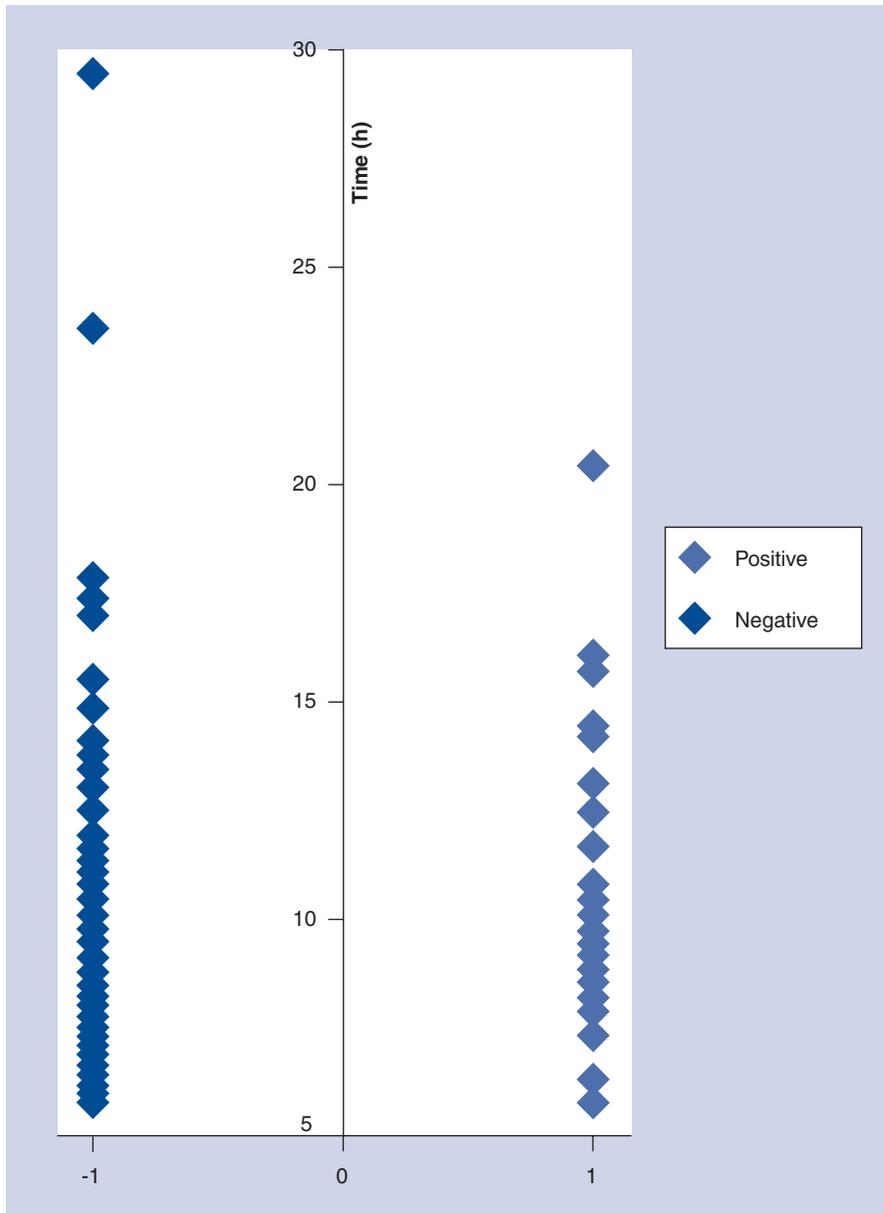


Figure 3. Time distribution for pronucleate appearance in human embryos. The vertical axis indicates the time (in h). Negative = 0% implantation (no embryo implanted), and positive = 100% implantation (all embryos implanted). Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

Synchrony

Synchronic cell divisions as well as synchronic nuclei appearance after the first cleavage have been associated with higher implantation rates in human embryos [43,47]. However, it has been suggested that embryos with uneven cell numbers derived from asynchronous cell divisions invariably fail to implant [47]. In the current system of embryo evaluation, asynchrony of cell division can only be determined if the embryo presents an odd cell number at the exact time of observation, whereas with a time-lapse system unattended and accurate assessment of the degree of asynchrony is always possible. Recent studies based on this new technology suggest that the synchrony between blastomeres in the second cell cycle represents

a strong marker to predict blastocyst formation [48], as well as being associated with higher implantation rates [39].

Nonetheless, the automatic analysis of embryo images represents several challenges for the scientific community. First, most morphological features analyzed are not perceived correctly the first time, and adjustments, usually related to the focus of the microscope, are needed; we must remember that the embryo is 3D and that some structures that are clearly visible on one plane can disappear in the next one. Therefore, an image-analysis system should include the possibility of taking images from different planes of the embryo in order to be reliable.

Although published studies describe some progress in the use of image-analysis technology on embryo development [49–51], the overall quantity of available material is scarce, even though there are increasing data supporting the fact that a sequential embryo assessment method, derived from multiple independent evaluations, is the best guide for assessing the potential of an embryo [52]. The new generation of systems that combine microscope and incubator offer the possibility of describing morphological characteristics without removing the embryos from the optimal conditions of gas and temperature, and thus of reducing the environmental stress experienced by the embryo.

Time-lapse studies

The first experiments in which time-lapse technology was introduced to study the kinetics of human embryonic development were aimed at validating its clinical utility as an incubation system [43,53–56]. Initial studies by Cruz *et al.* compared the blastocyst formation rate and the percentage of

useful embryos (transferred and frozen) in a prospective study in which oocytes from the same patient were randomly split between a standard incubator (SI) and the time-lapse incubator (TLI) after ICSI. No significant differences were observed for any of the variables studied (TABLE 1) [38].

According to the guidelines of the Spanish Association of Reproductive Biology [57], embryos are classified from A to D depending on their quality. In the same study by Cruz *et al.*, embryo quality was also analyzed and no differences were observed inside and outside of the TLI [38]. The following figure describes the percentage of embryos in each category for each of the two incubation systems (FIGURE 1) [M. CRUZ, PERS. COMM.]

Continuing to validate time-lapse technology for clinical use, Meseguer *et al.* [UNPUBLISHED DATA] compared biochemical pregnancy rates (BPR) and clinical pregnancy rates (CPR) between cycles in a SI and the TLI in a retrospective match cohort study. TABLE 2 presents the means, the p-values and the statistical tests used for the following variables: average age of patients, number of oocytes retrieved, number of embryos transferred, percentage of abortions, hormonal treatment and percentage of good-quality embryos cultured in the TLI and SI.

No significant differences were observed for any of the variables studied between the two groups considered ($p > 0.05$). This demonstrates the homogeneity of both groups, and allows us to make a reliable comparison of BPR and CPR obtained with both types of incubators, as observed in TABLE 3.

TABLE 3 shows that the BPR for TLI was 64% and for SI was 59%, with a p-value of 0.51. With respect to the CPR, a value of 55% was obtained for TLI and 49% for SI, with a p-value of 0.44. No significant differences were observed for ICSI cycles performed in both incubators. However, it is observed in FIGURE 2 that both the BPR and the CPR values were slightly higher in the TLI than in the SI, although this difference was not significant (FIGURE 2).

Time-lapse monitoring of embryo development has also led to the re-evaluation of the most relevant scoring criteria and strategies used in human embryology. An example of this is pronuclear scoring, analyzed by Montag *et al.* [58]. In this study, the distribution of nucleolar precursor bodies was evaluated at 14–15, 16–18 and 19–20 h after ICSI. During the first two intervals, 75% of the

pronuclear stage oocytes presented similar pronuclear scores and 25% of the oocytes showed a change in the pattern that resulted in a different score. The documented changes were mostly due to a move away from an asymmetric distribution of the nucleolar precursor bodies towards a more symmetric or perfectly aligned distribution. Another example presented in this same study by Montag *et al.* involved the classic assessment of embryo morphology [58]. Embryos assessed within a time span of 4 h (38, 40 and 42 h) presented a different morphology or blastomere number

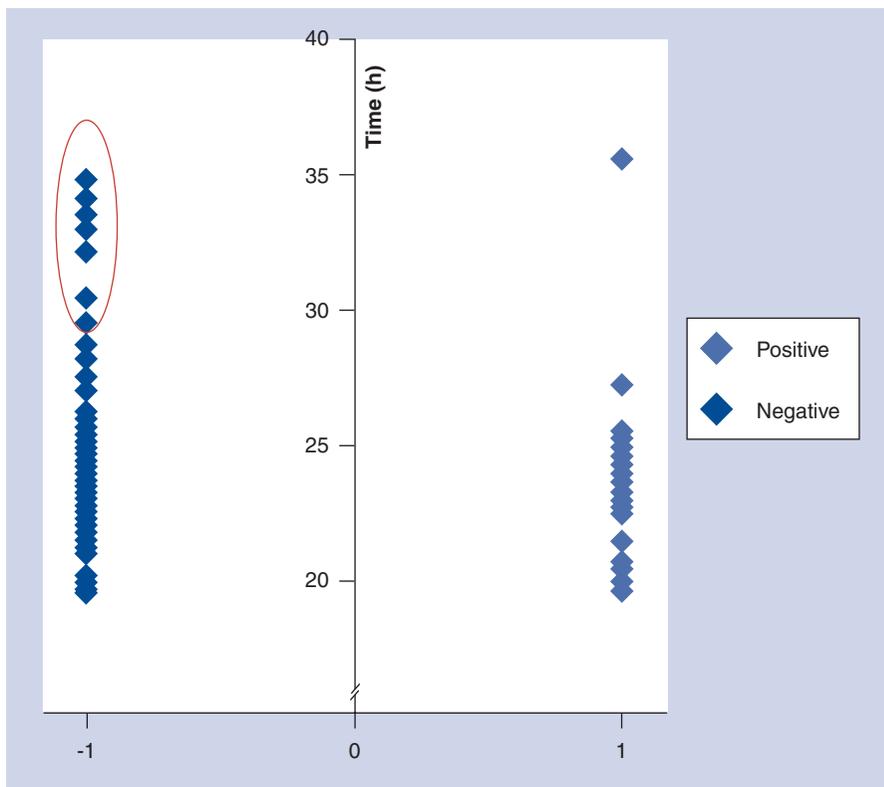


Figure 4. Time distribution for pronucleate disappearance in human embryos.

The vertical axis indicates the time (in h). Negative = 0% implantation (no embryo implanted), and positive = 100% implantation (all embryos implanted).

Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

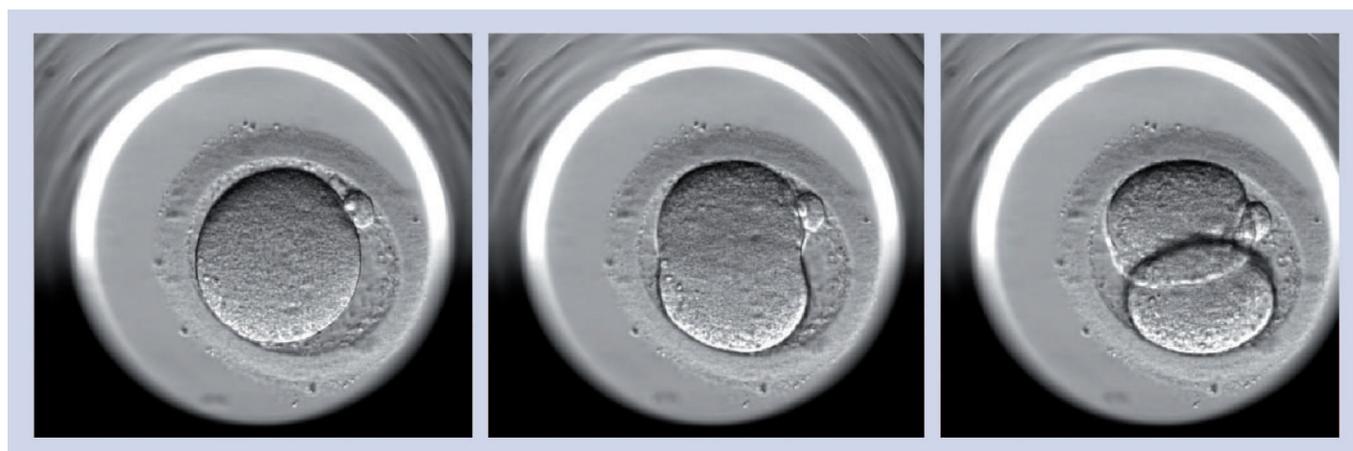


Figure 5. First embryonic division. A single-cell zygote divides into two daughter cells.

Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

in almost half of the embryos (49.1%), leading once again to a different score. As expected, when the same evaluation involved a shorter time span (40 and 42 h), it was demonstrated that a lower percentage (32.6%) would have been scored differently.

Time-lapse imaging as a selection tool

Correlation between embryo implantation & variables measured by time-lapse analysis

The analysis of videos generated from 159 human embryos incubated with a time-lapse system allowed us to determine time ranges for certain embryonic events, as presented in TABLE 4.

Out of the 159 embryos included in this experiment, 35 implanted and 124 did not implant. For both groups the timing of appearance and disappearance of the PN and the timing of the first (two cells), second (three cells) and third (four cells) embryo cleavages were studied. The following figures represent the time distribution for each embryonic event according to implantation (0% negative vs 100% positive):

- PN appearance (FIGURE 3);
- Disappearance of pronuclei (FIGURE 4).

The time distribution appears to be similar for PN appearance in both groups (between 5 and 17 h after ICSI). However, group 2 includes two embryos whose PN appeared too late (more than 24 h). As observed in FIGURE 3, the majority of the implanted embryos had formed PN at 15 h after ICSI, although in an isolated case, this time was extended to 20 h. These results agree with those by Fancsoviets *et al.* who propose that early PN disappearance (between 22 and 25 h) is a good indicator of

embryo viability. FIGURE 4 shows that the PN of a large number of implanted embryos had disappeared in this time range, and that it could even be extended from 20 to 25 h post microinjection [59]. Moreover, FIGURE 4 shows (marked with circle) that if the PN disappear too late (between 28 and 35 h after ICSI), embryos do not implant.

- First embryonic division (FIGURES 5 & 6).

Embryos that initiated the first cleavage too late (>32 h) failed to implant, except for one embryo that divided for the first time at 37 h but still presented normal kinetics on day 2 and day 3.

- Second and third embryonic division (FIGURE 7).

Embryos that initiate the second cleavage too early or too late (<27 h or >41 h) failed to implant. Similar results were observed for the third cleavage (<29 h or >43 h). We should note that the second embryo cleavage is a synchronous event that involves two cells dividing at the same time. However, asynchrony is observed on numerous occasions, allowing us to distinguish between a three-cell and a four-cell embryo. This asynchrony may take from a few minutes to hours, and later on in this article we will see that calculating this time may serve as a marker to select embryos with higher implantation rates.

In summary, these results allow us to present the following profile for implanting embryos:

- For embryos in which the appearance of PN occurs early (between 5 and 17 h post ICSI), the disappearance of PN will also occur early (between 20 and 25 h post ICSI);
- The first cleavage (two cells) should occur before 32 h and the second and third cleavage (three to four cells) should occur before 43 h post microinjection.

Mean averages for each embryo event were analyzed. TABLE 4 presents the mean time for the onset and disappearance of the PN, and for the first, second and third embryo cleavages (hours after ICSI) according to implantation (0 vs 100%) (TABLE 4).

Establishing kinetic markers

Based on the previous observations from time-lapse imaging in human embryos, we continued analyzing kinetic variables in order to establish new markers for embryo selection. When comparing the mean values for each event (TABLE 5), significant differences ($p < 0.05$; t-student) were observed between implanted and not implanted embryos. More specifically, the mean values for all variables were lower for all the embryos implanted compared with the embryos not implanted.

This would suggest that implanted embryos have a higher division rate than nonimplanted ones or, in other words, non-implanting embryos have a tendency to divide later. Considering that the mean is not an informative indicator of implantation (since the differences are very small), a better way to analyze differences between implanting and nonimplanting embryos would be to divide the initial samples into quartiles and establish optimal ranges for each embryo event. In a recent study by Meseguer *et al.*, optimal ranges were proposed for certain variables based

Table 5. Mean averages for each embryo event according to implantation (100 vs 0%).

Variable	Mean (h)
PN appearance	
Implanted	9.38
Not implanted	9.99
PN disappearance	
Implanted	23.02
Not implanted	24.82
First cleavage	
Implanted	25.9
Not implanted	26.6
Second cleavage	
Implanted	37.1
Not implanted	38.27
Third cleavage	
Implanted	37.5
Not implanted	39.8

PN: Pronucleate.
Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

on the analysis of 247 embryos that were cultured in a time-lapse system and transferred on day 3 of development [39]. The following figure describes the optimal ranges for PN appearance, time to two cell (t_2), time to three cell (t_3) and time to five cells (t_5) (FIGURE 8).

As the limits for the ranges were defined as quartiles, each one of them represents the same number of transferred embryos with known implantation outcomes. For all cleavage times there is a significant difference in implantation rate between embryos within the optimal range as opposed to those outside the range. However, it should be noted that the difference in implantation rates increases with successive cell divisions. For t_2 the difference in implantation rate is 12%, for t_3 it is 21%, and for t_5 it reaches 24%. The implantation rate of embryos with a t_5 within the optimal range is 2.6-times the implantation rate for embryos outside this range. Therefore, selection based on the timing of cleavage to the five-cell stage provides the best single criteria to select embryos with improved implantation potential.

Two other variables were considered in the study by Meseguer *et al.* [39]. The first one, defined as the second cell cycle (cc_2), represents the time from the division to a two-blastomere embryo until the time to the division to a three-blastomere embryo ($cc_2 = t_3 - t_2$ represents the duration of the period as a two-blastomere embryo). The second variable, defined as s_2 , represents the time from the division to a three-blastomere embryo until the time to the division to a four-blastomere embryo ($s_2 = t_4 - t_3$ represents the duration of the period as a three-blastomere embryo).

For both variables, that is the duration of the cc_2 and the synchrony from three-cell stage to four-cell stage (s_2), we found that embryos falling within optimal ranges had significantly higher implantation rates than those outside of the range (FIGURE 9).

Other studies have also analyzed the exact timing of certain embryonic events. Montag *et al.* observes a range from 22 to 36 h with a mean of 26.7 ± 3.2 h for the first cleavage in 59 embryos that were cultured beyond the two PN stage in a TLI. In this study, according to the definition of early cleavage, 57.6% (34 out of 59) of the embryos had cleaved by 25–26 h, and 42.3% (25 out of 59) cleaved later [58].

Another aspect worth mentioning is the possible correlation between implantation rates and certain morphological events that can only be determined through time-lapse analysis. Three

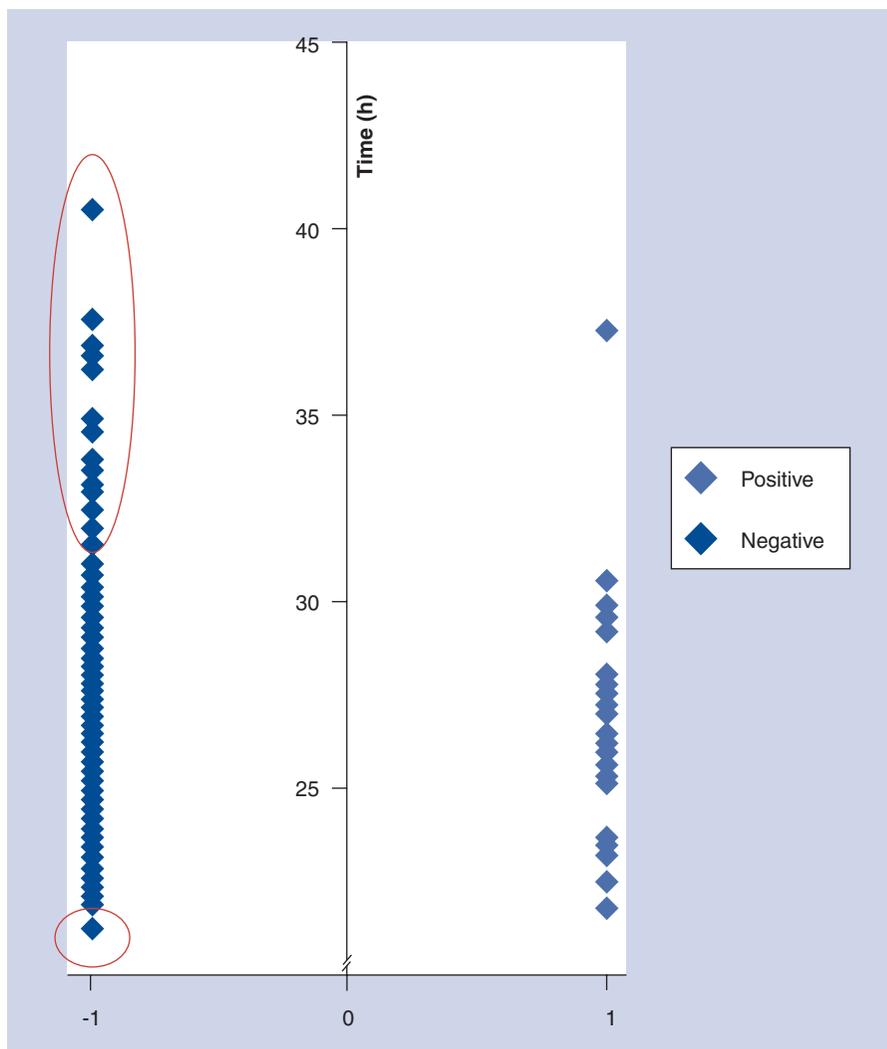


Figure 6. Time distribution for the first cleavage in human embryos. The vertical axis indicates the time (in h). Negative = 0% implantation (no embryo implanted), and positive = 100% implantation (all embryos implanted). The oblong circles highlight embryos dividing too early or late for the first time that fail to implant. Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

different morphological events have been correlated with poor implantation potential [39]:

- Direct cleavage from zygote to three-blastomere embryo, defined as: $cc_2 = t_3 - t_2 < 5$ h;
- Uneven blastomere size at the two-cell stage during the interphase where the nuclei are visible;
- Multinucleation at the four-cell stage during the interphase where the nuclei are visible.

Given the low implantation rates (four out of 48 embryos studied [8%]) for embryos presenting any of these features, using the above listed observations as exclusion criteria for embryo selection has been suggested.

A different approach is presented by Wong *et al.* In this study, time-lapse imaging and gene-expression profiling was used to predict progression to the blastocyst stage with >93% sensitivity

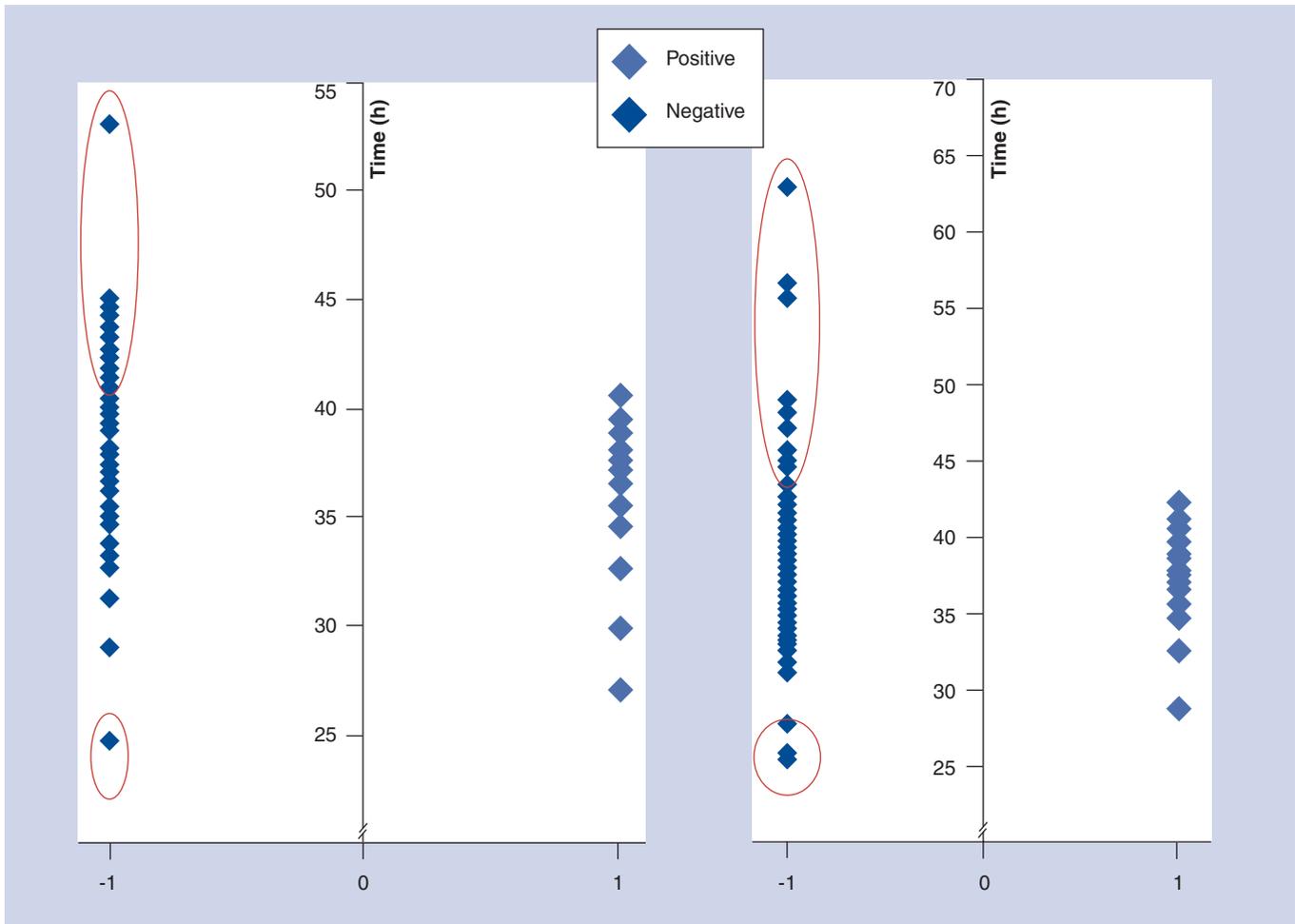


Figure 7. Time distribution for the second (left) and third (right) cleavage in human embryos. The vertical axis indicates the time (in h). Negative = 0% implantation (no embryo implanted), and positive = 100% implantation (all embryos implanted). Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

and specificity, by measuring three dynamic, noninvasive imaging parameters by day 2 after fertilization, but before embryonic genome activation [48]. In this study, cell imaging greatly benefits from an automatic software system for cell tracking that is coupled to the time-lapse system. The three parameters proposed include: duration of the first cytokinesis; time interval between the end of the first mitosis and the initiation of the second mitosis; and the time interval between the second and third mitosis. The third parameter represents the synchronicity in the formation of the two sets of granddaughter cells (equivalent to *s2* from the study by Meseguer *et al.*). The mean values and standard deviations for these three parameters for the embryos that had reached the blastocyst stage were: 14.3 ± 6.0 min; 11.1 ± 2.2 h; and 1.0 ± 1.6 h, respectively. It should be noted that embryos included in this study were derived from oocytes that were previously cryopreserved at the pronuclear stage, and therefore we should be cautious in extrapolating these results for fresh embryos. It should also be noted that the parameters proposed probably differ from the ones proposed by Meseguer *et al.*, because the end point for both studies is different. The first one predicts blastocyst formation whereas the second one predicts implantation.

In conclusion, we now have new markers based not only on timings but also on abnormal morphological events that can only be observed through time-lapse technology. An algorithm for embryo selection based on a combination of these markers plus the standard morphology has been described, as observed in FIGURE 10 [39]. Possible factors affecting these markers should be considered. A recent study [BASILE N *ET AL.*, UNPUBLISHED DATA] revealed no differences between commercially available culture media for any of the following variables: *t5*, *cc2* and *s2*. Considering that these variables are included in the above-mentioned algorithm, it would be safe to use it despite of the media utilized. Other external factors such as temperature, gas mixture and stimulation protocols should also be studied.

Expert commentary

The increasing pressure to reduce the number of embryos transferred to the uterus has led to the development of new strategies aimed at optimizing the predictive power of embryo viability. Studies comparing pregnancy and implantation rates depending on whether embryos are transferred at cleavage stage and/or blastocyst stage are still confusing, considering that some studies promote the

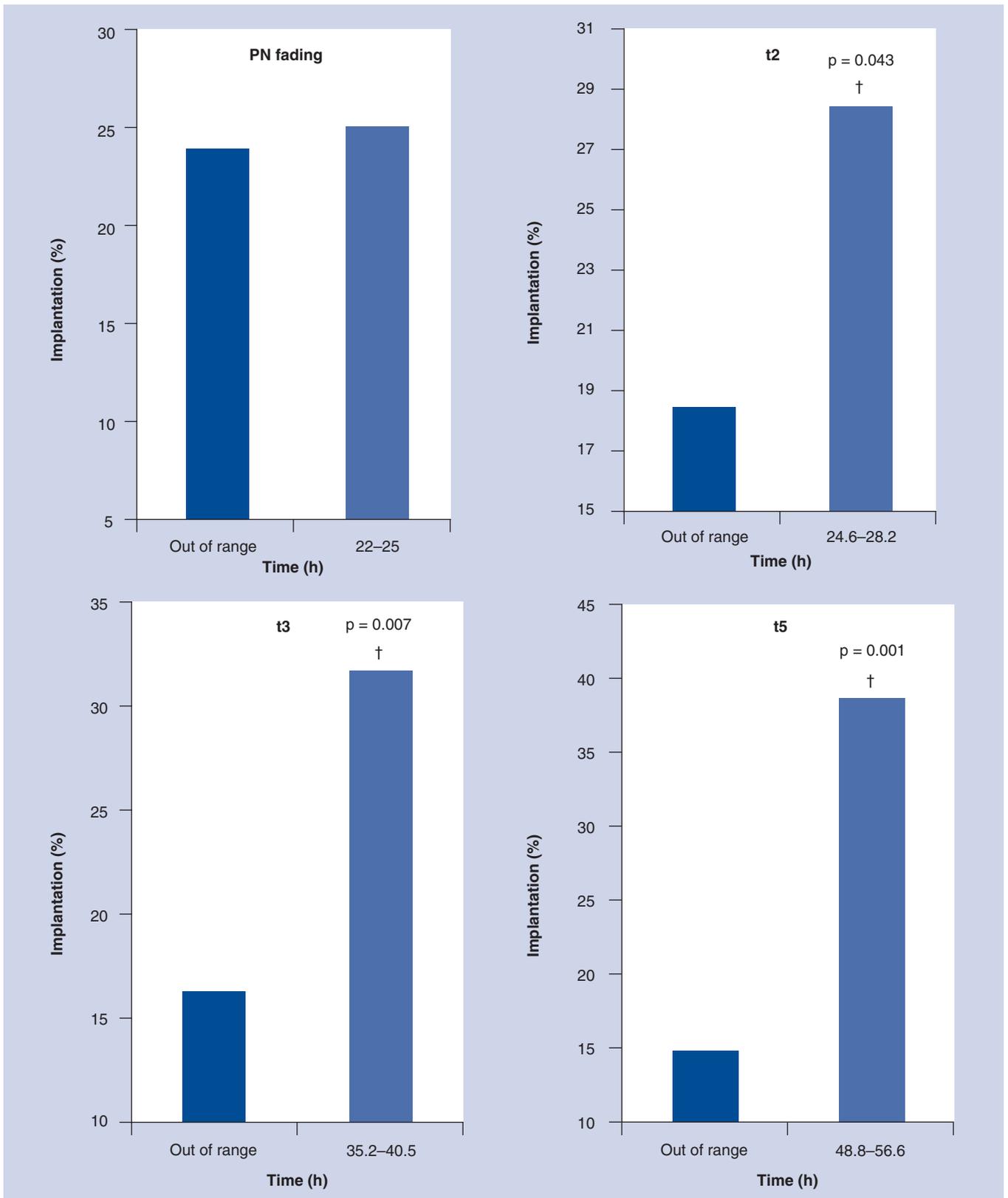


Figure 8. Optimal ranges for pronucleate fading, and time to two cell, time to three cell and time to five cell.

†Significant difference in implantation rate between embryos falling within and out of the optimal range.

PN: Pronucleate; t2: Time to two cell; t3: Time to three cell; t5: Time to five cell.

Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

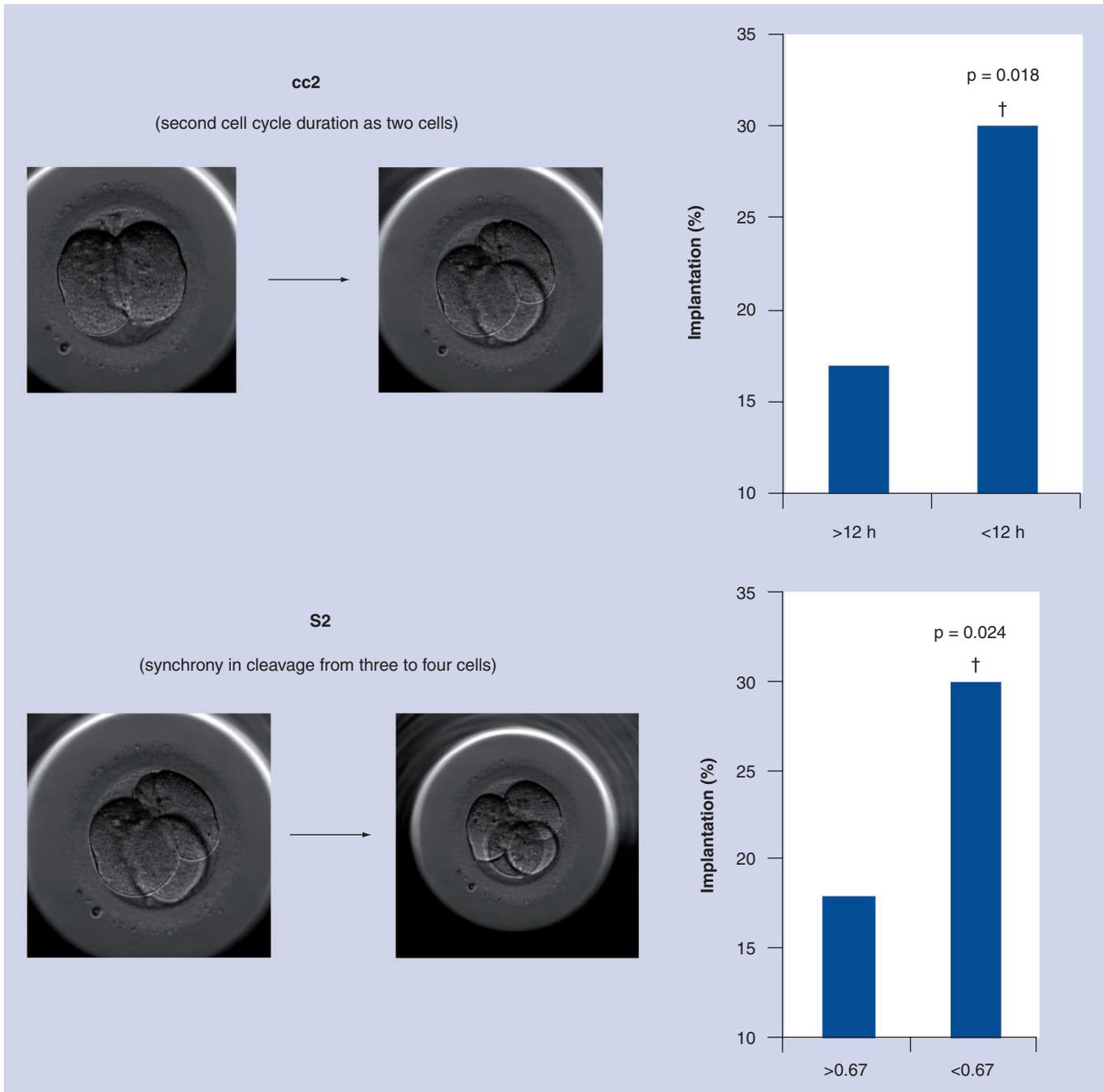


Figure 9. Optimal ranges for the interval limits second cell cycle and synchrony from two-cell stage to four-cell stage.

[†]Significant difference in implantation rate between embryos falling within and out of the optimal range.

cc2: Second cell cycle; s2: Synchrony from three-cell stage to four-cell stage.

Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

transfer of embryos on day 5 of culture [60–62] while others find no difference [63,64]. Alternative strategies suggest selecting embryos based on pronuclear morphology [65,66], or early cleavage times [12,67,68], and much of the past research has focused on exploring the utility of these determinations as possible markers of embryo competence. Alternatively, the combination of using a subjective score of embryo quality along with the rate of development in culture has proved effective in predicting possible pregnancies [69],

and other studies have stressed the importance of selecting critical points for maximizing the differences between the embryos [1].

It is true that information obtained from microscopic observations has contributed significantly to the great success of IVF; however, embryo selection based solely on static and subjective evaluations needs to be improved.

Even though we see the limitations of morphological static evaluations, the authors believe that embryo morphology still

remains an important parameter and that embryo selection should always begin with a morphological assessment. Oocyte and embryo morphological assessment has been reviewed recently in a consensus paper on embryo assessment by ALPHA and ESHRE [70], evidencing the importance of this approach. In order to identify embryos with the highest potential of implantation, a combination of morphology plus new markers based on time-lapse analysis is proposed. An increased use of blastocyst culture has probably slowed down the development of strategies based on earlier stages of embryo development, whether through static or time-lapse observations. Future studies should demonstrate (or not) the real advantage of time-lapse imaging versus a growing-to-blastocyst selection strategy.

Noninvasive analysis of embryo development based on time-lapse imaging is useful, not only to understand the morphological events associated with fertilization, but also to evaluate the physiological importance of these events during the early stages of embryonic development. Thus far, most of the human embryo research on morphokinetic development has been based on a small number of samples generated under diverse experimental conditions [11,43,48,54,56]. The majority of the studies that involve imaging have been limited to measurements of early development, such as pronuclear formation and fusion, and time of the first cleavage [12,24,43,70]. Nonetheless, the recent introduction of highly automatic time-lapse equipment has led to the discovery of new and interesting data that can be applied on a daily basis in a clinical setting. It may now be possible to predict blastocyst formation as early on as day 2 [48], and it is now known that the morphological scoring of the embryos can change in a very short time span [58] and that algorithms may now be used for embryo selection based on kinetic markers [39].

Five-year view

The study of embryo kinetics through time-lapse technology has given rise to new markers for embryo selection. It represents a new, exciting and powerful tool for viewing cellular activity and embryogenesis in a coherent and uninterrupted manner otherwise not available through the standard methods of embryo evaluation. Over the next 5 years, more clinics will start using this type of 'all-in-one' equipment, and hopefully more studies based on human embryos will enable us to continue learning about the dynamic process of embryo development; embryology knowledge as it is established nowadays will be partially rewritten. New markers have already been proposed, and the authors believe that prospective randomized studies will

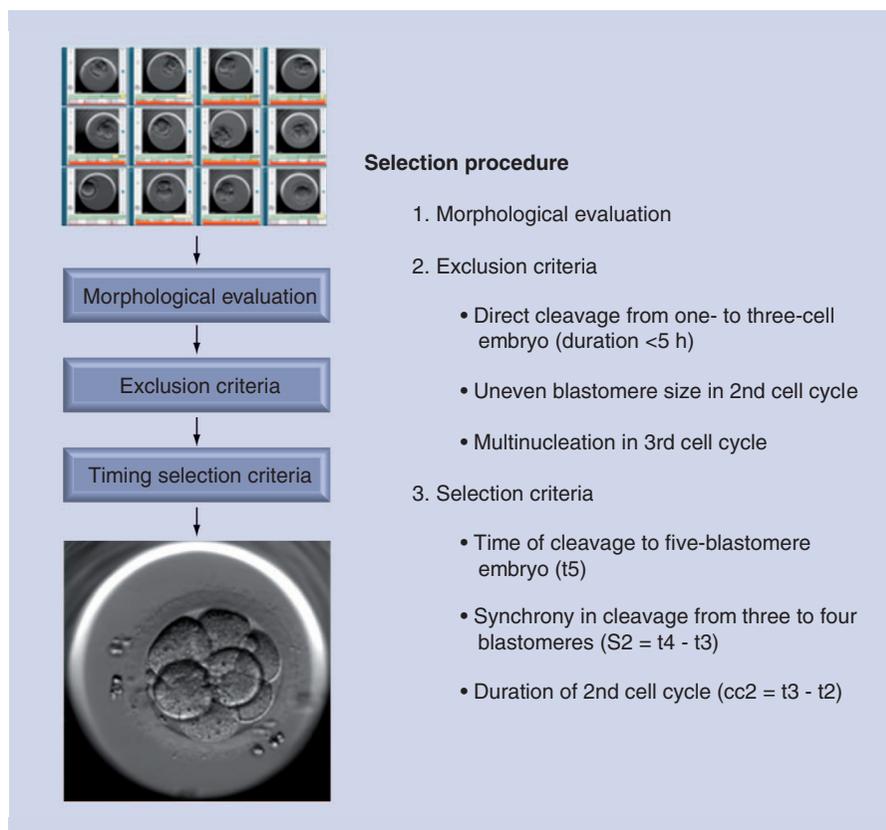


Figure 10. Exclusion and selection criteria based on time-lapse markers.

Data taken from [MESEGUER M, UNPUBLISHED DATA].

validate these markers for embryo selection. Automatization is a key aspect, and, in the next 5 years, we will most likely work with more improved software programs that will facilitate us to compare and select embryos automatically, based on predefined algorithms. Time-lapse technology will save time for the embryologist, while offering the availability of 24-h continuous observation. It will improve the effectiveness of IVF cycles, reducing costs and increasing the ability to identify embryos with higher viability. Progress in this scientific field will become especially relevant when implementing a policy of single-embryo transfer, considering that it offers the embryologist a system for decision-making that is much more powerful, and that it is based not only on the real-time status of the embryo but on a more authentic and dynamic view of the entire process of embryonic development.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- Multiple pregnancies still remain a problem in *in vitro* fertilization clinics.
- Current methods of embryo evaluation need to be improved in order to reduce the number of embryos transferred without jeopardizing the success rates.
- Time-lapse technology represents a tool that provides novel information about developmental parameters that differ between implanting and nonimplanting embryos.
- New markers based on time-lapse technology have been associated with higher implantation rates.
- Prospective studies are necessary in order to prove that selecting embryos through time-lapse parameters (morphokinetics) increases the implantation rate.
- Automatization has been crucial for the utility of this technology in a clinical setting.

References

Papers of special note have been highlighted as:

• of interest

•• of considerable interest

- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of *in vitro* fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum. Reprod.* 12(7), 1531–1536 (1997).
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnes D, Bianchi P, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.* 13(1), 182–187 (1998).
- Kline D, Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev. Biol.* 149, 80–89 (1992).
- Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y, Renard JP. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in the bovine zygotes. *Biol. Reprod.* 62, 1677–1684 (2000).
- Schabronath J, Gartner K. Paternal influence on timing of pronuclear DNA synthesis in naturally ovulated and fertilized mouse eggs. *Biol. Reprod.* 38, 744–749 (1988).
- Schultz RM, Kopf GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr. Topics Dev. Biol.* 30, 21–62 (1995).
- Herbert M, Gillespie JI, Murdoch AP. Development of calcium signaling mechanisms during maturation of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 3, 965–973 (1997).
- Goldbard SB, Warner CM. Genes affect the timing of early mouse embryo development. *Biol. Reprod.* 27, 419–424 (1982).
- Stroynowski I. Molecules related to class-I major histocompatibility complex antigens. *Annu. Rev. Immunol.* 8, 501–530 (1990).
- Juriscova A, Casper RF, MacLusky NJ, Mills G, Librach C. HLA-G expression during preimplantation human embryo development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93, 161–165 (1996).
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17–18 (1992).
- 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.* 12(3), 532–541 (1997).
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A. Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 9, 1743–1748 (1994).
- Plachot M. Fertilization. *Hum. Reprod.* 15(Suppl. 4), 19–30 (2000).
- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J *et al.* Factors influencing the success of *in vitro* fertilization for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 1, 3–23 (1984).
- Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum. Reprod.* 16, 2658–2661 (2001).
- Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum. Reprod.* 18, 1307–1312 (2003).
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early clearing *in vitro* fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil. Steril.* 76, 1150–1156 (2001).
- Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S. Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod. Biomed. Online* 2, 212–218 (2004).
- Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum. Reprod.* 19, 2103–2108 (2004).
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum. Reprod.* 16, 2652–2657 (2001).
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari A, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfers procedures. *Hum. Reprod.* 18, 821–825 (2003).
- Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY. Clinical value of early cleavage embryo. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 76, 293–297 (2002).
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos *in vitro*. *Hum. Reprod.* 17(2), 407–412 (2002).
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod.* 1(2), 91–148 (1995).
- Extensive review on embryo development with an emphasis on embryo metabolism and epigenetic regulation. It goes over the different factors that may affect the culture of preimplantation embryos *in vitro*.
- Inoué S. *Video Microscopy*. Plenum Press, New York, NY, USA (1986).
- Salmon ED. VE-DIC light microscopy and the discovery of kinesin. *Trends Cell Biol.* 5, 154–158 (1995).
- Inoué S, Spring K. *Video Microscopy, 2nd Edition*. Plenum Press, New York, NY, USA (1997).

- 29 Wolf D. Digital microscopy (Volume 72, second edition). *A Second Edition of Video Microscopy (Methods in Cell Biology)*. Sluder G (Ed.). Academic Press, MO, USA (2003).
- 30 Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J. Embryol. Exp. Morph.* 17, 481–490 (1967).
- 31 Massip A, Mulnard J. Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen–thawed cow blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 58(2), 475–478 (1980).
- 32 Grissart B, Massip A, Dessy F. Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium. *J. Reprod. Fertil.* 101, 257–264 (1994).
- 33 Hardarson T, Löfman C, Coull G, Sjogren A, Hamberger L, Edwards RG. Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reprod. Biomed. Online* 5, 36–38 (2002).
- 34 Holm P, Booth PJ, Callesen H. Kinetics of early *in vitro* development of bovine *in vivo*- and *in vitro*-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum containing media. *Reproduction* 123, 553–565 (2002).
- 35 Pribenzsky C, Losonczy E, Molnár M *et al.* Prediction of *in vitro* developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod. Biomed. Online* 20, 371–379 (2010).
- 36 Pribenzsky C, Mátyás S, Kovács P, Losonczy E, Zadori J, Vajta G. Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod. Biomed. Online* 21, 533–536 (2010).
- 37 Arav A, Aroyo A, Yavin S, Roth Z. Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and ‘shortest-half’ analysis. *Reprod. Biomed. Online* 17(5), 669–675 (2008).
- 38 Cruz M, Gadea B, Garrido N *et al.* Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28(7), 569–573 (2011).
- 39 Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe K, Ramsing N, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.* 26(10), 2658–2671 (2011).
- **Comprehensive analysis of embryo kinetics and its correlation with embryo implantation. Introduces new data based on time-lapse technology that can be applied on a clinical basis.**
- 40 Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. A microscopic and biochemical study of fragmentation phenotypes in stage-appropriate human embryos. *Hum. Reprod.* 16(4), 719–729 (2001).
- 41 Hesters L, Prisant N, Fanchin R *et al.* Impact of early cleaved zygote morphology on embryo development and *in vitro* fertilization–embryo transfer outcome: a prospective study. *Fertil. Steril.* 89, 1677–1684 (2008).
- 42 Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil. Steril.* 71, 836–842 (1999).
- 43 Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI fertilized oocytes. *Reprod. Biomed. Online* 17(3), 385–391 (2008).
- 44 Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M *et al.* Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum. Reprod.* 18(5), 1062–1069 (2003).
- 45 Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munné S. Fertilization and early embryology: the presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum. Reprod.* 11(7), 1492–1498 (1996).
- 46 Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 13(4), 960–963 (1998).
- 47 Scott L, Finn A, O’Leary T, McLellan S, Hill J. Morphological parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum. Reprod.* 22(1), 230–240 (2007).
- 48 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.* 28(10), 1115–1121 (2010).
- **Interesting correlation of time-lapse image analysis and gene-expression profiling with embryo development from zygote to the blastocyst stage.**
- 49 Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Hum. Reprod.* 19(2), 288–293 (2004).
- 50 Agerholm IE, Hnida C, Cruger DG *et al.* Nuclei size in relation to nuclear status and aneuploidy rate for 13 chromosomes in donated four cells embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 25, 95–102 (2008).
- 51 Beuchat A, Thevenaz P, Unser M *et al.* Quantitative morphometrical characterization of human pronuclear zygotes. *Hum. Reprod.* 23(9), 1983–1992 (2008).
- 52 Neuber E, Mahutte NG, Arici A, Sakkas D. Sequential embryo assessment outperforms investigator-driven morphological assessment at selecting a good quality blastocyst. *Fertil. Steril.* 85(3), 794–796 (2006).
- 53 Mio Y. Morphological analysis of human embryonic development using time-lapse cinematography. *J. Mamm. Ova. Res.* 23, 27–35 (2006).
- 54 Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during *in vitro* development of human embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 199, 660 e1–e5 (2008).
- 55 Mio Y. The beginning of human life under time-lapse cinematography. *Periodicum Biologorum* 111(3), 323–327 (2009).
- 56 Nakahara T, Iwase A, Goto M *et al.* Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 27, 93–96 (2010).
- 57 ASEBIR 2008. Cuadernos de embriología clínica. In: *Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos (2º Ed)*. Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), Madrid, Spain (2008).
- 58 Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological system is relevant in human embryo development? *Placenta* 32, S252–S256 (2011).
- **Points out the fact that static observations may be misleading, presenting data that compares time-lapse imaging with standard morphological observations.**
- 59 Fancsovit P, Toth L, Takacs ZF, Murber A, Papp Z, Urbancsek J. Early pronuclear breakdown is a good indicator of embryo quality and viability. *Fertil. Steril.* 84, 881–887 (2005).

- 60 Milki AA, Hinckley M, Fisch J, Dasig D, Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil. Steril.* 73, 126–129 (2000).
- 61 Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 13, 3434–3440 (1998).
- 62 Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an *in vitro* fertilization program. *Fertil. Steril.* 73, 1035–1040 (1999).
- 63 Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum. Reprod.* 15, 1947–1952 (2000).
- 64 Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. Implantation rates after *in vitro* fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days in culture. *Fertil. Steril.* 73, 117–122 (2000).
- 65 Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. Morphology of human pronuclear embryo is positively related to blastocyst development. *Hum. Reprod.* 15, 2394–2403 (2000).
- 66 Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* 14, 1318–1323 (1999).
- 67 Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R *et al.* Timing of oocyte activation, pronucleus formation, and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or *in vitro* fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum. Reprod.* 13, 1060–1062 (1998).
- 68 Capmany G, Taylor A, Braude PR, Bolton VN. Timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 299–306 (1996).
- 69 Cummings JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in *in vitro* fertilization: its values in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J. In Vitro Fert. Embryo Transf.* 3, 284–295 (1986).
- 70 ALPHA Scientists In Reproductive Medicine, ESHRE Special Interest Group Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum. Reprod.* 26(6), 1270–1283 (2011).
- **Global consensus aimed at establishing common terminology and standardizing laboratory practice related to embryo morphology assessment so that more effective comparisons can be made between treatment outcomes among the different clinics.**

CAPÍTULO III.

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA

El tipo de medio de cultivo no afecta la cinética embrionaria: un estudio en ovocitos de la misma cohorte a través de la tecnología time-lapse

Natalia Basile, Dean Morbeck, Juan García-Velasco

Fernando Bronet, Marcos Meseguer

Human Reproduction (FI: 4,585)

Vol.28, No.3 pp. 634-41, 2013

Desde la introducción de la tecnología time-lapse en los laboratorios de FIV distintos marcadores cinéticos han sido identificados y asociados a una mejor calidad y viabilidad embrionaria así como a mayores tasas de implantación (Azzarello et al. 2012, Dal Canto et al. 2012, Meseguer et al. 2011, Wong et al. 2010). Por ello, hoy en día resulta necesaria una comprensión exhaustiva de la cinética embrionaria incluyendo un conocimiento de los distintos factores intrínsecos o extrínsecos que pudieran afectarla (Bellver et al. 2013, Freour et al. 2013, Munoz et al. 2012). Dentro de los factores extrínsecos, uno que juega un papel fundamental es el medio de cultivo. En este estudio nos planteamos estudiar los efectos del medio de cultivo sobre la cinética embrionaria intentando responder la siguiente pregunta: ¿podemos utilizar los mismos marcadores

asociados a una mayor tasa de implantación independientemente del medio de cultivo utilizado?

Para ello hemos elaborado un estudio utilizando pacientes incluidas en el programa de ovodonación de IVI Madrid. Se eligió este grupo particular de pacientes con el fin de minimizar las variaciones asociadas a una mala calidad ovocitaria en pacientes infértiles. El principal objetivo fue analizar los tiempos de división desde estadio de 2 PN hasta el estadio de 5 células y el cálculo del porcentaje de embriones dentro de los rangos óptimos definidos para las 3 variables asociadas a una mayor tasa de implantación: s2, cc2 y t5. Dentro de los objetivos secundarios se incluyó: evaluación morfológica estándar y resultados clínicos.

3.1. Material y Métodos

Todas las donantes incluidas en el estudio tuvieron entre 18-30 años de edad (media: 26,9 DE = 4.7), ciclos menstruales normales (26-34 días de duración), IMC de 18-28 Kg/m² y útero y ovarios normales según ecografía. Como criterio de inclusión se pautó un mínimo de 10 ovocitos en punción, de los cuales 8 debían ser maduros MII. Dentro de los criterios de exclusión se consideraron: factor masculino severo (concentración espermática < 5 x 10⁶/ml), receptoras con malformación uterina, varones con FISH de espermatozoides anormal y varones portadores de enfermedades génicas o cromosómicas. Un total de 75 receptoras recibieron un total de 723 ovocitos MII (media: 9,2, rango = 8-13).

3.1.1 Estimulación y punción ovárica

La estimulación ovárica de las donantes se llevó a cabo siguiendo un protocolo con antagonistas y FSHr y la maduración final se realizó con agonistas de GnRH. Durante la punción ovárica, 36 horas después de la administración del agonista de GnRH, el ginecólogo procuró aspirar el mismo número de folículos por tubo enviado al laboratorio. Es en este punto donde se realiza la separación de los ovocitos entre los dos medios de cultivo. Los medios de cultivo a comparar fueron: Sage[®] (Sage, CT, USA) y Global[®] (Life-Global, CT, USA). Ambos medios de cultivo se encuentran disponibles comercialmente. Todos los procedimientos del laboratorio a partir de este momento se realizaron respetando y manteniendo por separado el número de ovocitos asignado a cada medio de cultivo en el momento de la punción. El esquema de trabajo está representado en la **Figura 11**.

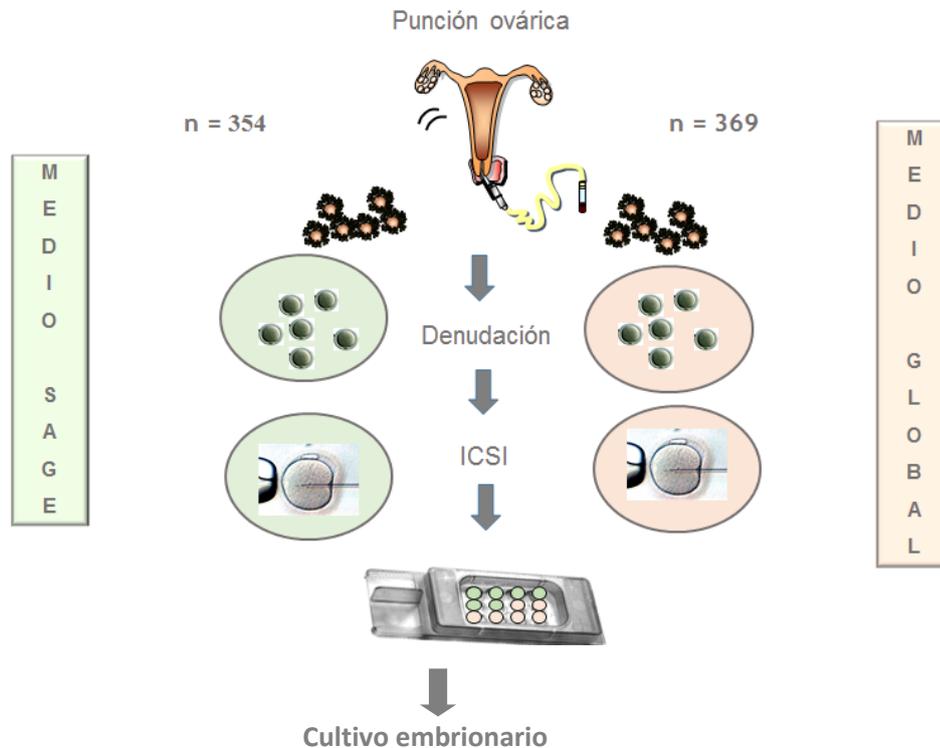


Figura 11. Esquema de trabajo. Los ovocitos se separan en el momento de la punción ovárica y se mantienen en medios de cultivo diferentes durante la denudación, ICSI y cultivo embrionario

3.1.2 Denudación, ICSI y cultivo embrionario

Tras la punción ovárica, los ovocitos fueron incubados por 4 horas en una incubadora convencional a 37°C y 6.2% CO₂. La denudación de los ovocitos se realizó mecánicamente con enzima hialuronidasa y posteriormente se procedió a hacer el ICSI. Una vez inyectados, los ovocitos fueron colocados en pocillos individuales dentro de la placa de cultivo EmbryoSlide[®]. El EmbryoSlide se compone de 12 pocillos individuales y a los efectos del estudio 6 de ellos fueron llenados con medio Sage[®] y 6 con medio Global[®]. Los cigotos obtenidos fueron cultivados dentro del Embryoscope[®] hasta día 3 de desarrollo embrionario (**Figura 12**).



Figura 12. Cultivo embrionario en sistema time-lapse Embryoscope hasta día 3 de desarrollo

3.1.3 Registro y análisis de imágenes

Las series de imágenes se registraron en tiempo real y se analizaron retrospectivamente mediante el software EmbryoViewer[®]; gracias a esta herramienta fue posible registrar no sólo las características morfológicas del embrión sino también los tiempos exactos en los que transcurrieron las divisiones celulares desde el momento de la fecundación. La medición de estos tiempos se llevó a cabo en horas post ICSI

(hpi). Además, este software nos presenta una gráfica que refleja la cantidad de movimiento producido entre dos imágenes consecutivas de la filmación; este parámetro se denomina actividad blastomérica, se genera de forma automática e indica los puntos en los que se produce movimiento durante el desarrollo. Normalmente este movimiento coincide con las divisiones celulares. Se registraron las siguientes variables de tiempo:

Variables Individuales:

- **t0 (h)**: tiempo de microinyección.
- **pf (hpi)**: desaparición de pronúcleos.
- **t2 (hpi)**: tiempo de la división hacia un embrión de 2-células.
- **t3 (hpi)**: tiempo de la división hacia un embrión de 3-células.
- **t4 (hpi)**: tiempo de la división hacia un embrión de 4-células.
- **t5 (hpi)**: tiempo de la división hacia un embrión de 5-células.

Además de estas variables individuales también se midieron los intervalos entre algunas divisiones consecutivas (ver representación gráfica en capítulo 2). Estos intervalos resultan de particular interés porque representan la duración de los ciclos celulares así como la sincronía en las divisiones. A continuación se describen las variables compuestas medidas:

Variables compuestas:

- **cc2 (h)** = $(t3-t2)$: duración del segundo ciclo celular; periodo de tiempo en el que observamos un embrión de 2-células.
- **cc3 (h)** = $(t5-t3)$: tiempo que tarda el embrión en la transición de 3-células a 5-células.

- $s2(h) = (t4-t3)$: sincronía en la transición desde un embrión de 3-células a un embrión de 4-células.

3.1.4 Categorías morfocinéticas

La categorización de embriones se llevó a cabo siguiendo el algoritmo descrito anteriormente (Meseguer et al. 2011) En este modelo los embriones son evaluados inicialmente por morfología convencional, luego se excluyen los que presentan algún criterio de exclusión (división directa, blastómeras asimétricas o multinucleación) y finalmente se clasifican siguiendo la jerarquía basada en las variables t5, s2 y cc2.

3.1.5. Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron con una T-Student en la comparación de medias (horas) y con un test de Chi-cuadrado en la comparación de proporciones. Se consideró la presencia de significación estadística cuando el valor de $p < 0.05$. El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS.

3.2. Resultados

3.2.1. Tiempos de división y porcentajes dentro de los rangos óptimos

Un total de 723 ovocitos fueron divididos entre los dos medios de cultivo, 369 en Global[®] y 354 en Sage[®]. El porcentaje de ovocitos fecundados fue de 71,3% (IC 95% 66,7-75,9) en Global[®] y 76% (IC 95% 71,5-80,4) en Sage[®]. La **Tabla 2** describe

los tiempos exactos de división celular en función del medio de cultivo. Se puede observar que no hay diferencias significativas para ninguna de las variables estudiadas.

Tabla 2. Media de tiempos para las distintas variables en función del medio de cultivo utilizado

Variable	Medio de cultivo	N	Media	IC95%		Mínimo	Máximo
				L.inferior	L.Superior		
2PN	Sage	269	8.35	8.04	8.65	4.72	30.14
	Global	263	8.16	7.82	8.51	4.43	30.14
PNF	Sage	269	23.41	22.77	24.04	6.16	54.02
	Global	263	23.56	22.92	24.21	6.84	51.34
t2 (h)	Sage	269	27.26	26.60	27.91	19.18	57.35
	Global	263	26.71	26.12	27.30	18.52	53.19
t3 (h)	Sage	269	38.08	37.32	38.83	22.40	64.12
	Global	263	37.84	37.08	38.61	23.05	65.29
t4 (h)	Sage	269	40.15	39.39	41.91	24.44	68.07
	Global	263	40.20	39.36	41.04	25.45	74.85
t5 (h)	Sage	239	51.27	50.15	52.39	27.18	101.69
	Global	242	51.14	50.15	52.13	32.71	77.53
cc2 (h)	Sage	269	10.91	10.37	11.45	.00	26.88
	Global	263	11.17	10.61	11.74	.00	37.19
s2 (h)	Sage	269	2.19	1.73	2.64	.00	18.67
	Global	263	2.70	2.13	3.27	.00	25.51

PNF: tiempo de “pronuclear fading”, t2 (tiempo a 2 células), t3 (tiempo a 3 células), t4 (tiempo a 4 células), t5 (tiempo a 5 células), cc2 (t3-t2), s2 (t4-t3)

Seguidamente, se analizó el porcentaje de embriones dentro de los rangos óptimos definidos en el algoritmo (Meseguer et al. 2011) para las variables relacionadas con implantación t5, s2 y cc2. Tampoco se observaron diferencias significativas en función del medio de cultivo utilizado (**Tabla 3**).

Tabla 3. Porcentaje de embriones dentro de los rangos óptimos definidos para las variables t5, s2 y cc2

Medio Cultivo	t5			s2			cc2		
	N	Fuera de rango (%)	48,8-56,6 h (%)	N	Fuera de rango (%)	< 0,75 h	N	Fuera de rango (%)	< 12 h
Global	242	62,0% 150/242	38,0% 92/242	263	49,0% 129/263	51,0% 134/263	269	46,8% 126/269	53,2% 143/269
Sage	239	59,8% 143/239	40,2% 96/239	269	49,4% 133/269	50,6% 136/269	274	47,8% 131/274	52,2% 143/274
P			NS			NS			NS

t5 (tiempo a 5 células), cc2 (t3-t2), s2 (t4-t3)

3.2.2. Morfología estándar y resultados clínicos

Como objetivo secundario se analizaron la calidad embrionaria y los resultados clínicos. Para analizar la calidad embrionaria se tuvo en cuenta el número de células y la fragmentación en D2 y D3. También se analizó el porcentaje de embriones catalogados como óptimos en D2 (4 células, 0-15% fragmentación, blastómeras simétricas y sin multinucleación) y en D3 (7-8 células, 0-15% fragmentación, blastómeras simétricas y sin multinucleación). Los resultados respecto a la calidad embrionaria se ven descritos en la **Tabla 4**.

Tabla4. Calidad embrionaria en función del medio de cultivo utilizado

Variable	Medio cultivo	N	Media	IC95%	
				Límite inferior	Límite superior
Células D2	Sage	269	3,91	3,78	4,04
	Global	263	3,96	3,83	4,10
Fragmentos D2	Sage	269	6,47%	5,54	7,40
	Global	263	5,66%	4,50	6,82
Óptimo D2	Sage	269	51,1%	45,2	56,8
	Global	263	52,2%	46,3	58,1
Células D3	Sage	239	6,72	6,47	6,97
	Global	242	7,16	6,88	7,45
Fragmentos D3	Sage	239	6,33%	5,34	7,32
	Global	242	5,43%	4,63	6,23
Óptimo D3	Sage	239	52,8%	47,0	58,6
	Global	242	46,5%	40,6	52,4

Se transfirieron un total de 139 embriones. De ellos, 49 implantaron (saco gestacional con latido cardíaco positivo) lo cual resultó en una tasa de implantación del 35,8%. De los embriones transferidos, 73 fueron cultivados en Global[®] (52,5% IC 95% 44,9-61,6) y 66 en Sage[®] (47,5% IC 95% 38,4-55,1). Hubo un total de 73 transferencias embrionarias: 25 transferencias puras con embriones solo de medio Global (n=45); 17 transferencias puras con embriones solo de medio Sage[®] (n=32) y 31 transferencias mixtas (n=62) con embriones provenientes de ambos medios. Las tasas de embarazo clínico e implantación fueron similares para los tres tipos de transferencias: 48,0% (IC 95% 28,4-67,6) y 42,0% (IC 95% 22,5-61,4) con Global[®]; 58,8% (IC 95% 35,4-82,2) y 38,2% (IC 95% 15,0-61,4) con Sage[®] y 58,1 (IC 95% 40,7-75,4) y 37,1% (IC 95% 22,1-52,1) en las transferencias mixtas.

3.3. Discusión

Este estudio revela que la cinética embrionaria no varía entre los dos medios de cultivo analizados. Dicha similitud se refleja a su vez en los resultados clínicos representados por las tasas de embarazo clínico e implantación. Además, representa un modelo nuevo de comparación entre dos medios de cultivo diferentes ya que utiliza una monitorización continua del desarrollo embrionario y no la microscopía estática convencional.

Se debe tener en cuenta la gran cantidad de factores de confusión que se pueden presentar cuando evaluamos desarrollo embrionario. Es por ello que este estudio intentó, en cierta medida, minimizar dichos factores a través de un diseño en el que i) se utilizaron ovocitos de donantes para evitar variabilidad proveniente de pacientes infértiles, ii) se utilizaron ovocitos de la misma cohorte, reduciendo así las variaciones

entre las donantes y iii) todas las condiciones de cultivo, excepto el medio de cultivo, fueron idénticas: tipo de incubadora, temperatura, concentración de CO₂, humedad y material fungible en contacto con los embriones.

Es interesante también tener en cuenta los tipos de medio de cultivo elegidos para este trabajo. Si bien existen numerosos tipos y marcas en el mercado, todos ellos basan su composición en uno de estos dos principios: i) ofrecer al embrión los nutrientes de forma secuencial en función del estadio de desarrollo: “medios secuenciales” o ii) ofrecer al embrión todos los nutrientes desde el inicio independientemente del estadio de desarrollo: “medios simples”. Ambos tipos de medio poseen diferencias sutiles respecto a su composición de sustratos energéticos, fosfatos y otros micronutrientes, sin embargo, la gran diferencia reside en el tipo de aminoácidos que contienen. En este caso, Global[®] se trata de un medio simple y Sage[®] de uno secuencial. Resulta interesante observar que la morfocinética no varía entre dos medios de cultivo tan diferentes, permitiéndonos así utilizar marcadores morfocinéticos de selección embrionaria independientemente del medio de cultivo utilizado. Se debe reconocer sin embargo que no podemos extender esta conclusión a todos los medios de cultivo disponibles en el mercado pero sí para los dos medios utilizados actualmente en IVI Madrid.

Por otro lado, la decisión de utilizar ovocitos de donantes si bien tiene sus ventajas, nos limita el hecho de poder generalizar estos resultados a otros grupos de pacientes. Por ende, se necesitan más estudios para confirmar estos resultados en distintos grupos de pacientes infértiles. Finalmente, debemos recordar que el medio de cultivo es solo una parte dentro del sistema de cultivo y que representa solo uno de los muchos factores que pueden afectar al desarrollo embrionario.

Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes

Natalia Basile^{1,*}, Dean Morbeck², Juan García-Velasco¹,
Fernando Bronet¹, and Marcos Meseguer³

¹Instituto Valenciano de Infertilidad, Av. Del Talgo 68 (28023), Madrid, Spain ²Department of Obstetrics and Gynecology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA ³Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

*Correspondence address. Tel: +34-91-180-2900; Fax: +34-91-180-2910; E-mail: natalia.basile@ivi.es

Submitted on August 5, 2012; resubmitted on November 5, 2012; accepted on December 12, 2012

STUDY QUESTION: Are the morphokinetics of growing embryos affected by the type of culture media utilized?

SUMMARY ANSWER: Morphokinetic parameters used for embryo selection are not affected between the two different concept culture media analyzed.

WHAT IS KNOWN ALREADY: Studies on the effect of culture media on human embryos have focused on evaluating different in-house and commercially available media as well as comparing outcomes among different commercial media. Nonetheless, the evaluation of embryo development in these studies was based on static observations and very little is known from a dynamic point of view.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION: Prospective cohort study, October 2010 and April 2011.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS: University-affiliated infertility center. Patients undergoing egg donation ($n = 75$) in which embryos were cultured with two different types of media in a time-lapse system. Embryo development was analyzed with time-lapse imaging for single step media (Global[®]) and sequential media (Sage[®] Cleavage). Variables studied included the timing to two cells (t_2), three cells (t_3), four cells (t_4) and five cells (t_5) as well as the length of the second cell cycle ($cc_2 = t_3 - t_2$) and the synchrony in the division from two to four cells ($s_2 = t_4 - t_3$). Implantation and clinical pregnancy rates were also analyzed.

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE: No statistically significant differences were observed between the two media for all the variables analyzed. When analyzing the percentage of embryos falling within the optimal ranges proposed for s_2 , cc_2 and t_5 , we did not find significant differences between the two media. Pregnancy and implantation rates were similar for the three types of transfers: 48.0% (CI 95% 28.4–67.6) and 42.0% (CI 95% 22.5–61.4) with Global media; 58.8% (CI 95% 35.4–82.2) and 38.2% (CI 95% 15.0–61.4) with Cleavage media; and 58.1% (CI 95% 40.7–75.4) and 37.1% (CI 95% 22.1–52.1) with mixed transferred, respectively. Multiple implantations (twins) were also similar among the three groups, with 24.0% (CI 95% 9.3–45.1) for transfers with embryos cultured in Global media, 17.6% (CI 95% 3.7–43.3) for transfers with embryos cultured in Cleavage media and 22.5% (CI 95% 9.5–41.0) with mixed transfers.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION: The study was not powered to test differences in pregnancy rates between the two culture media, as this was not the hypothesis tested. Results are based on observations with embryos from oocyte donors and need to be repeated with embryos from infertile patients of different ages.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS: The absence of differences in morphokinetics between two different media concepts validates the algorithm for embryo selection in diverse culture conditions.

STUDY FUNDING/COMPETING INTEREST(S): No specific funding was obtained for this study; it was solely funded by IVI. None of the authors have any economic affiliation with Unisense Fertiltech A/S but IVI is a minor shareholder in Unisense Fertiltech A/S.

TRIAL REGISTRATION NUMBER: Not applicable.

Key words: embryo kinetics / culture media / time-lapse

Introduction

Time-lapse image technology is a new tool for *in vitro* fertilization (IVF) laboratories that provides several advantages for embryo assessment (Lemmen et al., 2008; Pribenszky et al., 2010; Wong et al., 2010; Cruz et al., 2011; Meseguer et al., 2011; Montag et al., 2011). These advantages improve embryo selection that ultimately results in improved clinical and implantation rates (Meseguer et al., 2011, 2012). With the advent of this new technology a thorough understanding of embryo kinetics and how they might be affected by external as well as intrinsic factors is necessary. One example of an external factor that may affect timing of embryo development is the type of media used for embryo culture.

It is well known that optimal culture conditions and culture media composition are critical for the development of embryos *in vitro* (Pool, 2002, 2005; Behr and Wang, 2004). Studies on the effect of culture media on human embryos have focused on evaluating different in-house and commercially available media (Quinn et al., 1985; Gardner and Lane, 1997; Quinn, 2004; Balaban and Urman, 2005; Lane and Gardner, 2007) as well as comparing outcomes among different commercial media (Van Langendonck et al., 2001; Aoki et al., 2005; Balaban and Urman, 2005; Xella et al., 2010). Although differences in clinical outcomes and embryo development were observed in some of these studies, the evaluation of embryos was based on static observations of embryo morphology. Static observations are inevitably linked to specific time-points and considering that the development of the embryo is a dynamic process, several critical stages can go unnoticed. Finally, since grading of embryo morphology is subjective, it is prone to substantial inter-observer and moderate intra-observer variations (Baxter Bendus et al., 2006).

Time-lapse imaging of cell division kinetics provides an objective measure of embryo development. Using this quantitative and objective assessment of embryo development, the purpose of this study was to evaluate the effect of two types of culture media on early markers of embryo development in sibling oocytes.

Materials and Methods

A prospective cohort study was designed and approved by the Institutional Review Board of the Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) (IRB reference: 0711-C-034-MM, 10/2008), which regulates and approves clinical use of IVF procedures for research at IVI. In addition, the project complies with the Spanish law governing Assisted Reproductive Technologies (14/2006). The study involved a total of 75 recipients from our oocyte donation program who received a total of 723 metaphase II (MII) oocytes (mean: 9.2, range = 8–13).

Oocyte donation cycles were used for this study to minimize variations associated with oocyte quality due to female infertility. All donors were between 18 and 30 years old (mean: 26.9 SD = 4.7) with normal menstrual cycles (26–34 days of duration), a body mass index of 18–28 kg/m² and normal ovaries and uterus as observed by transvaginal ultrasound. Donors were also screened for normal karyotype and had no family history or hereditary chromosomal diseases (Garrido et al., 2002). Inclusion criteria included a minimum of 10 oocytes at retrieval, of which eight had to be mature MII. Oocytes for each donor were allocated randomly to two types of media at the moment of retrieval and kept separate throughout every procedure in the IVF laboratory as explained in the following sections. Exclusion criteria included severe male factor (sperm

concentration <5 × 10⁶/ml), recipients with uterine malformations, male carriers of chromosomal or genetic diseases and males with abnormal sperm fluorescence *in situ* hybridization analysis.

Primary end-points included exact timings of embryo cleavage from 2PN to five-cell stage and percentage of embryos falling within optimal ranges for the morphokinetic variables: S2, CC2 and T5. Secondary end-points included standard morphological assessment and clinical outcomes.

Ovarian stimulation

Ovarian stimulation was carried out as described previously (Garcia-Velasco et al., 2011). In brief, donors started ovarian contraceptive pills (OCPs; Microgynon30, Organon) on Day 1–2 of the menses of the previous cycle and continued for 12–16 days. Five days after stopping OCPs they received a starting dose of recombinant FSH (Puregon[®], Organon, Madrid-Spain; Gonal F[®], Serono, Madrid-Spain) ranging from 150 to 225 IU (maximum). GnRH antagonist (0.25 mg ganirelix, Orgalutran[®], Organon) was administered daily starting on Day 5 or 6 after FSH administration. GnRH agonist triggering with 2 amps of triptorelin 0.1 ml (Decapeptyl, IpsenPharma, Barcelona, Spain) was performed as soon as two leading follicles reached a mean diameter ≥ 17 mm.

Oocyte retrieval, denudation, ICSI and embryo culture

Oocyte retrieval was performed 36 h after hCG under ultrasound guidance. During the retrieval the physician was required to aspirate a similar quantity/size of follicles per tube handed to the laboratory. After follicle aspiration was finished the oocytes were randomly selected and evenly distributed by two independent biologists according to a randomization table. The two groups included: media 1a: Global[®] For Fertilization (Life-Global[®], CT, USA) (*n* = 369) and media 2a: Quinn's Advantage[®] Fertilization medium (Sage[®], CT, USA) (*n* = 354). After retrieval, oocytes were kept in culture for 4 h at 37.3°C and 6.2% CO₂ before oocyte denudation. Oocyte denudation was performed separately for the two different groups of oocytes by mechanically pipetting in 40 IU/ml of hyaluronidase (LifeGlobal). Subsequently, ICSI was performed on all oocytes. Once injected, the oocytes were placed in individual wells of a pre-equilibrated EmbryoSlide (EmbryoSlide[®], Unisense FertilTech, Aarhus, Denmark). The EmbryoSlide[®] is constructed with a central depression containing 12 individual wells. For the purpose of this study half of the wells were filled with 20 μl of media 1b: Global[®] medium (Life-Global[®]) and the other half with 20 μl of medium 2b: Quinn's Advantage[®] Cleavage medium (Sage[®]). Protein supplementation was performed with 10% of human serum albumin from Global and Sage, respectively. The depression containing the wells was covered with an overlay of 1.4 ml mineral oil (LifeGuard[®] Oil, LifeGlobal[®]) to prevent evaporation. The slides were prepared at least 4 h in advance and left in an incubator to pre-equilibrate at 37.2°C in a 6.2% CO₂ atmosphere. The time-lapse system (TMS) utilized, EmbryoScopeTM (ES; Unisense FertilTech), consists of an incubator with a built-in microscope to automatically acquire images of up to 72 individual embryos from six different patients and in up to seven focal planes. Images were acquired with low intensity red light with exposure times varying from 15 to 30 ms. The total light exposure with the TMS was lower than the exposure to which embryos are normally exposed during routine microscopy in the IVF laboratory (Ottosen et al., 2007).

Time lapse analysis and recording of kinetic parameters

The exact timing for each embryo division was calculated in hours after microinjection. Images of each embryo were retrospectively analyzed

with EmbryoViewer external image analysis software (EV; Unisense FertiTech, Aarhus, Denmark). Images were acquired every 20 min in seven different focal planes during 72 h of culture. With the EV, embryonic developmental events were annotated with the corresponding timing in hours after microinjection. We defined time of cleavage as the first time point where a complete separation between newly formed blastomeres was observed. Markers of development included: 2PN, when two pronuclei were visible; pronuclear fading (PNF) at the time when both PN were no longer visible; the first cell division leading to two cells (t_2), and subsequently the second (3 cells, t_3), third (4 cells, t_4) and fourth (5 cells, t_5) cell divisions. We also calculated the intervals between two consecutive cleavages and defined cc_2 (duration of the second cell cycle) as the time from the division to a two-blastomere embryo until the time to the division to a three-blastomere embryo ($cc_2 = t_3 - t_2$) and s_2 (second synchrony) as the time from the division to a three-blastomere embryo until the time to the division to a four-blastomere embryo ($s_2 = t_4 - t_3$). In other words, cc_2 represents the duration an embryo consists of two cells and s_2 represents the duration an embryo consists of exactly three cells.

In a previous study (Meseguer *et al.*, 2011), optimal ranges for specific markers for embryo selection were determined and used to develop a selection algorithm. These markers, known as t_5 , s_2 and cc_2 , have optimal ranges of 48.8–56.6, <0.75 and <12 h, respectively. Correlations between morphokinetic parameters characterizing early embryo development and embryo implantation formed the basis for a proposed hierarchical classification procedure for the selection of viable embryos for transfer. The first step of the procedure including t_5 and s_2 , allocates all evaluated embryos into five categories with decreasing implantation potential from grade A to grade E. The further inclusion of cc_2 allocates all evaluated embryos into 10 subcategories from A+ to E.

The present study focused on the variables included in this algorithm and not others because there is now strong evidence that this algorithm can improve clinical pregnancy rates presumably from stable culture conditions as well as morphokinetic selection (Meseguer *et al.*, 2012). Moreover, a multi-centered study has revealed that some of the embryo features described in such algorithm are strongly correlated with implantation justifying the use of this algorithm in different clinical settings (Rubio *et al.*, 2012).

In the present study, the two first levels of this grading procedure were evaluated with t_5 as the primary timing variable and s_2 as the secondary timing variable; if the value of t_5 fell inside the optimal range, the embryo was graded as A or B; if the value of t_5 fell outside the optimal range, the embryo was graded as C or D. If both s_2 and t_5 were within the optimal range, the embryo was graded as A; if t_5 was within the

optimal range but s_2 was outside the optimal range, the embryo was graded as B. If s_2 was within the optimal range but t_5 was outside the optimal range, the embryo was graded as C. If both s_2 and t_5 were outside the optimal range, the embryo was graded as D. Embryos that fulfilled any of the three following criteria: (i) uneven blastomere size at the two-cell stage, (ii) abrupt division from one to three or more cells or (iii) multinucleation at the four-cell stage were designated as grade E (Table I).

Previous results demonstrate that implantation rates are highest for grade A and lowest for grade E embryos with intermediate rates for grades B, C and D.

Embryo transfer

Embryo transfer was performed on Day 3 of development under abdominal ultrasound guidance. Normally, two embryos were transferred, although in some cases only one embryo was transferred due to patient wishes or clinical recommendation. Surplus embryos were frozen using our standard vitrification protocol (Cobo *et al.*, 2010).

Statistical analysis

The results were analyzed using a student's *t*-test for comparison of timings (h) and χ^2 -test for comparison of proportions. A *P* value <0.05 was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The timings followed normal distribution and, as a consequence, a parametric test was employed. Our calculations of sample size have been based on the number of embryos randomized. Considering an equivalent hypothesis and using a 1.5 h difference for s_2 , we determined sample size required to be 488 embryos total using α risk = 0.05 and power 80% (N2EM!, SPSS).

Results

Timing of embryo development events and percentages within optimal ranges

A total of 723 oocytes were allocated to the two types of culture media. Of the 723 oocytes, 369 were cultured in Global and 354 were treated in Cleavage. On Day 1, 263 (71.3%, CI 95% 66.7–75.9) oocytes were correctly fertilized in the Global group and 269 (76.0%, CI 95% 71.5–80.4) oocytes were correctly fertilized in the Cleavage group. Table II shows the averages of all the timings of embryo cleavage (from 2PN to t_5) together with the variables that define intervals for each type of media used. No statistically significant differences were observed between the two media for all the variables analyzed. When analyzing the percentage of embryos falling within the optimal ranges proposed for s_2 , cc_2 and t_5 , we did not find significant differences between the two media (Table III). When we compared the percentages of non-symmetric two-cell embryo and direct cleavage embryos (cleavage from two to three <5 h; DC 1–3) we found similar results but a significantly larger fraction of multinucleated embryos at the four-cell stage were observed in Global media (Fig. 1). Distribution of embryos according to the morphokinetic algorithm was similar between culture media (Table IV).

Standard morphology assessment and clinical outcome

Table V describes the mean average for number of cells and fragmentation on Day 2 and Day 3 of development and the percentage of

Table I Hierarchical classification based on morphokinetic parameters.

Embryo morphokinetic grade	Optimal t_5 (48.8–56.6 h)	Optimal s_2 (<0.75 h)
A	Yes	Yes
B	Yes	No
C	No	Yes
D	No	No
E ^a		

^aEmbryos with one or more of the following: uneven blastomere size at two-cell stage, direct division from one to three or more cells, multinucleation at the four-cell stage.

Table II Mean for the different variables according to the media utilized.

Variable	Culture media	N	Mean	CI 95%		Minimum	Maximum
				Lower limit	Upper limit		
2PN	Sage	269	8.35	8.04	8.65	4.72	30.14
	Global	263	8.16	7.82	8.51	4.43	30.14
PNF	Sage	269	23.41	22.77	24.04	6.16	54.02
	Global	263	23.56	22.92	24.21	6.84	51.34
t2 (h)	Sage	269	27.26	26.60	27.91	19.18	57.35
	Global	263	26.71	26.12	27.30	18.52	53.19
t3 (h)	Sage	269	38.08	37.32	38.83	22.40	64.12
	Global	263	37.84	37.08	38.61	23.05	65.29
t4 (h)	Sage	269	40.15	39.39	41.91	24.44	68.07
	Global	263	40.20	39.36	41.04	25.45	74.85
t5 (h)	Sage	239	51.27	50.15	52.39	27.18	101.69
	Global	242	51.14	50.15	52.13	32.71	77.53
cc2 (h)	Sage	269	10.91	10.37	11.45	.00	26.88
	Global	263	11.17	10.61	11.74	.00	37.19
s2 (h)	Sage	269	2.19	1.73	2.64	.00	18.67
	Global	263	2.70	2.13	3.27	.00	25.51

2PN time of pronuclear appearance, PNF time of pronuclear fading, t2 (time to 2 cells), t3 (time to 3 cells), t4 (time to 4 cells), t5 (time to 5 cells), cc2 (t3 – t2), s2 (t4 – t3).

Table III Percentage of embryos falling within optimal ranges for t5, s2 and cc2 according to the media utilized.

Culture media	t5			s2			cc2		
	N	Out of range (%)	48.8–56.6 h (%)	N	Out of range (%)	<0.75 h	N	Out of range (%)	<12 h
Global	242	62.0 (150/242)	38.0 (92/242)	263	49.0 (129/263)	51.0 (134/263)	269	46.8 (126/269)	53.2 (143/269)
Sage	239	59.8 (143/239)	40.2 (96/239)	269	49.4 (133/269)	50.6 (136/269)	274	47.8 (131/274)	52.2 (143/274)
P			NS			NS			NS

t5 (time to 2 cells), cc2 (t3 – t2), s2 (t4 – t3).

optimal Day 2 embryos (4 cells, 0–15% fragmentation, symmetric cells and no multinucleation) and Day 3 embryos (7–8 cells, 0–15% fragmentation, symmetric cells and no multinucleation). No statistically significant differences were observed for any of these variables according to the media utilized.

A total of 49 embryos implanted successfully (gestational sac with fetal heartbeat) out of the 139 transferred, for an implantation rate of 35.8% (CI 95% 27.7–43.8). Of the embryos transferred, 73 were cultured with Global media (52.5% CI 95% 44.9–61.6) and 66 with Cleavage media (47.5% CI 95% 38.4–55.1).

There were 73 transfers: 25 cycles where the transferred embryos ($n = 45$) were cultured with Global media; 17 cycles where the transferred embryos ($n = 32$) were cultured in Cleavage media; and 31 mixed-transfer cycles where the transferred embryos ($n = 62$) were from both Global and Cleavage media. Pregnancy and implantation rates were similar for the three types of transfers: 48.0% (CI 95% 28.4–67.6) and 42.0% (CI 95% 22.5–61.4) with Global media; 58.8% (CI 95% 35.4–82.2) and 38.2% (CI 95% 15.0–61.4) with

Cleavage media; and 58.1% (CI 95% 40.7–75.4) and 37.1% (CI 95% 22.1–52.1) with mixed transferred.

Discussion

Time-lapse imaging provides a new and potentially powerful tool for the embryology laboratory. As with any new technology, a thorough analysis of factors that may affect accuracy is necessary to assure that results are consistent across clinical laboratory platforms. In this study, we used time-lapse imaging to demonstrate that kinetics of embryo growth are similar for two distinct types of culture media. The comparable morphokinetics translated into similar clinical outcomes, measured as clinical pregnancy and implantation rates. This study presents a novel approach to comparison of culture media since the analysis is based on continuous monitoring of embryo development as opposed to conventional static evaluations.

The large number of confounding factors inherent in clinical embryology must be taken into consideration when analyzing embryo

development patterns. To minimize such factors, we designed a study where (i) the oocyte source was anonymous donors, thus reducing variation in oocyte quality due to female infertility, (ii) sibling oocytes were compared with reduced variation between donors and (iii) culture conditions were identical between sibling oocytes and embryos, thus reducing the effect of variations in temperature, gas concentration, humidity, incubation system and contact supplies.

Although there are several different types of culture media on the market, we chose to compare media based on two fundamentally different approaches to embryo culture. The media are from two different manufacturers: Cleavage is based on a sequential culture system whereas Global represents a single media culture system. Since the introduction of IVF, a large variety of media formulations ranging from simple salt solutions to highly complex media have been used; this evolution can be attributed to an increased knowledge in the biochemistry, metabolic requirements, genetics and epigenetics of mammalian embryos. Although the exact formulations of the two media compared are not made public, there are likely subtle differences in energy substrates, phosphate and other micronutrients. In contrast, the most significant difference between media designed for cleavage-stage embryos versus media designed for both pre- and post-compaction development is the type of amino acid supplementation. Whereas Global media contains both essential and non-essential amino acids, Sage Cleavage contains only non-essential amino acids. Although there is significant debate over the merits of these two culture approaches (Lane and Gardner 2007; Biggers and Summers,

2008), most evidence indicates that these markedly different approaches to metabolic support during pre-implantation development result in comparable clinical outcomes. Indeed, while it should be noted that the objective of this study was not to evaluate which culture system provides better clinical outcomes, pregnancy and implantation rates were similar between the two culture media. In addition, the outcomes were similar for mixed transfers, where transferred embryos were selected from each treatment. Although there is some evidence that metabolic requirements of individual embryos vary and using more than one culture media could improve outcomes (Wirleitner *et al.*, 2010), our results do not support this hypothesis.

The present finding that culture media with significant differences in composition result in very similar embryo growth kinetics provides promising evidence that morphokinetic benchmarks can be developed and used irrespective of a laboratory's choice of culture media. It remains to be seen whether this holds true for all media formulations. Although previous comparisons of embryo culture media suggest that embryo growth rates are affected by media composition, careful interpretation is necessary due to differences in methodology (e.g. static observations at unspecified or poorly controlled time points, patient versus sibling oocyte comparison and heterogeneous patient populations) as well as the types of culture media compared (e.g. comparison of older versus newer generation culture media). Many studies that show differences in embryo grade do not provide specific cell number data (Parinaud *et al.*, 1998; Mauri *et al.*, 2001; Macklon *et al.*, 2002; Aoki *et al.*, 2005; Xella *et al.*, 2010; Hambiliki *et al.*, 2011), but rather incorporate cell number in the overall embryo grade. In contrast, in studies where average cell numbers on Day 2 or Day 3 were reported, significant differences were noted, both in studies that used earlier generation culture media (Staessen *et al.*, 1998; Karamalegos and Bolton, 1999; Van Langendonck *et al.*, 2001) as well as in more recent reports with media that has subsequently been improved or discontinued (Zollner *et al.*, 2004; Balaban and Urman, 2005; Dumoulin *et al.*, 2010). Only one study has compared single step to sequential media (Sepulveda *et al.*, 2009), comparing Global to Irvine's Embryo Cleavage Media in a donor oocyte program but with treatment randomized between patients rather than within patients (sibling oocytes). While there was a small increase in the percentage of embryos at the four-cell stage on Day 2 or ≥ 6 cells on Day 3 in Global media, the study design and single observation (without an indication of exact timing post-insemination) limits comparisons to the current study. These reports nonetheless provide evidence that further studies are warranted to validate morphokinetic benchmarks for various culture media.

As clinical laboratories embrace time-lapse technology, additional studies are essential for providing validation and improvement of

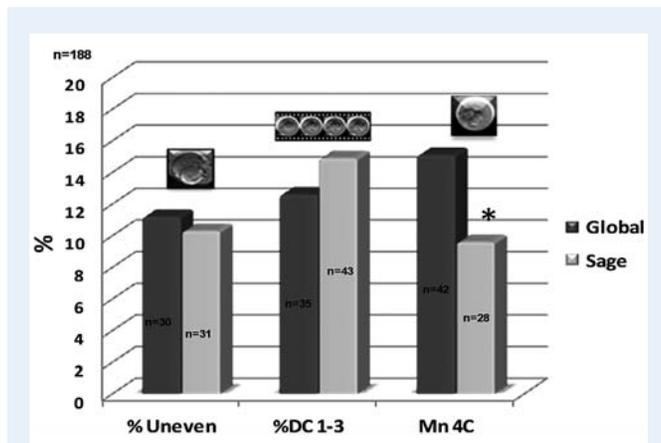


Figure 1 Percentage of embryos presenting exclusion criteria. (a) Uneven blastomere size at the two-cell stage (%Uneven), (b) DC: direct cleavage from 1 to 3 cells (<5 h) (%DC 1–3) and (c) Mn: multinucleation at the four-cell stage (Mn 4C).

Table IV Embryo morphokinetic categories according to the media utilized.

Embryo morphokinetic categories	A	B	C	D	E	Total
Global	13.3% (33)	14.5% (36)	30.1% (75)	15.7% (39)	26.5% (66)	249
Sage	19.2% (48)	15.6% (39)	23.6% (59)	17.6% (44)	24.0% (60)	250

Number of embryos and the corresponding percentage of embryo morphokinetic categories according to the media used. $P = 0.249$.

Table V Mean for the different morphological variables according to the media utilized.

Variable	Culture media	N	Mean/%	CI 95%	
				Lower limit	Upper limit
Cells D2	Sage	269	3.91	3.78	4.04
	Global	263	3.96	3.83	4.10
Fragm D2	Sage	269	6.47%	5.54	7.40
	Global	263	5.66%	4.50	6.82
Optimal D2	Sage	269	51.1%	45.2	56.8
	Global	263	52.2%	46.3	58.1
Cells D3	Sage	239	6.72	6.47	6.97
	Global	242	7.16	6.88	7.45
Fragm D3	Sage	239	6.33%	5.34	7.32
	Global	242	5.43%	4.63	6.23
Optimal D3	Sage	239	52.8%	47.0	58.6
	Global	242	46.5%	40.6	52.4

Number of blastomeres (Cells D2), % of fragmentation (FragD2) and % of good morphology embryos (Optimal D2) at Day 2, 48 post-ICSI. Number of blastomeres (Cells D3), % of fragmentation (FragD3) and good morphology embryos (Optimal D3) at Day 3, 72 post-ICSI.

proposed selection algorithms (Meseguer et al., 2011). The effects of both intrinsic and extrinsic factors should be assessed. For example, intrinsic factors that affect the timing of embryo development include ooplasm maturity (Lechniak et al., 2008) and paternal effects which may affect the duration of synthesis phase (S-phase). It has also been suggested that chromosomal abnormalities may delay DNA replication (Escrich et al., 2010), thus altering the length of cell cycles and divisions. Examples of other external factors that may impact embryo kinetics include protein supplementation, oxygen concentration and insemination method.

Although our study was designed to minimize variations by using sibling oocytes from presumed fertile oocyte donors, a limitation of this approach is that these findings may not apply broadly to infertile patients with differing etiology. Thus, further studies are needed to confirm these findings with other patient groups. Another potential limitation is that embryo transfers were performed on Day 3 and thus no information is available on later stages of development or the relationship between early events and blastocyst formation. However, since many infertile patients are not eligible for blastocyst transfers due to limited number of embryos, the relationship between early timing events and implantation potential will continue to play a role in embryo selection and thus it is important to know if these events are affected by culture media.

In the present study, we applied a morphokinetic algorithm to a comparison of two culture media. We based our analysis on specific markers, which included eight discriminative morphokinetic parameters identified as 2PN, PNF, t2, t3, t4, t5, cc2 and s2 (Meseguer et al., 2011). An optimal range was identified for each parameter, which was correlated with a significantly higher probability of implantation. Moreover, a logistic regression analysis was used to identify the most promising variables characterizing implanting embryos and finally an algorithm for embryo selection was proposed, which included t5, cc2 and s2. Embryo development in the selected culture media was

remarkably similar, suggesting that cell kinetics may not be culture media dependent. While small differences were observed in the proportion of multinucleated embryos at the four-cell stage, the impact of these observations is not known nor was it the focus of this study. The significance of multinucleation, in terms of the types and stages of development, is currently under further investigation given the new information available with time-lapse imaging. However, it remains to be seen whether these results apply to other media, thus limiting our ability to state that these markers are universally applicable. Finally, it is important to recognize that culture media is only part of the culture system and that it represents one of the many factors that may affect embryo kinetics. Future studies should consider the effect of other parameters such as infertility diagnosis, stimulation protocols and other extrinsic culture conditions.

Acknowledgements

The authors thank David Agudo, Manuela Alonso, Eva Huguet, Carlos Lopez Feijoo and María Cruz for their clinical and technical support for the study.

Authors' roles

N.B. played a role in the conception and design, analysis and interpretation of data, drafting of the manuscript and final approval. D.M. was involved in drafting the manuscript and revising it critically for important intellectual content. F.B. took part in data interpretation and final approval of the manuscript. J.G-V. took part in data interpretation and final approval of the manuscript. M.M. was involved in conception and design, acquisition and analysis of data, drafting manuscript and its final approval.

Funding

This work has not received any financial support from any commercial entity and the instrumentation, disposables and utensils belong to IVI.

Conflict of interest

None of the authors have any economic affiliation with Unisense Fertitech A/S, but IVI is a minor shareholder in Unisense Fertitech A/S.

References

- Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM, Parker-Jones K, Hatasaka HH, Gibson M, Huang I, Carrell DT. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod Biomed Online* 2005; **10**:600–606.
- Balaban B, Urman B. Comparison of two sequential media for culturing cleavage-stage embryos and blastocysts: embryo characteristics and clinical outcome. *Reprod Biomed Online* 2005; **10**:485–491.
- Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006; **86**:1608–1615.
- Behr B, Wang H. Effects of culture conditions on IVF outcome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004; **115**(Suppl 1):S72–S76.
- Biggers JD, Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 2008; **90**:473–483.
- Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010; **25**:2239–2246.
- Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011; **28**:569–573.
- Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, Schreurs IL, Dunselman GA, Kester AD, Geraedts JP et al. Effect of *in vitro* culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod* 2010; **25**:605–612.
- Esrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escriba MJ. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril* 2010; **93**:2557–2564.
- Garcia-Velasco JA, Bermejo A, Ruiz F, Martinez-Salazar J, Requena A, Pellicer A. Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist protocol vs the long protocol: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril* 2011; **96**:590–593.
- Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; **3**:367–382.
- Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Hum Reprod* 2002; **17**:3142–3148.
- Hambiliki F, Sandell P, Yaldir F, Stavreus-Evers A. A prospective randomized sibling-oocyte study of two media systems for culturing cleavage-stage embryos-impact on fertilization rate. *J Assist Reprod Genet* 2011; **28**:335–341.
- Karamalegos C, Bolton VN. A prospective comparison of 'in house' and commercially prepared Earle's balanced salt solution in human *in vitro* fertilization. *Hum Reprod* 1999; **14**:1842–1846.
- Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; **21**:83–100.
- Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P. Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol* 2008; **8**:23–42.
- 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**:385–391.
- Macklon NS, Pieters MH, Hassan MA, Jeucken PH, Eijkemans MJ, Fauser BC. A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for *in vitro* human blastocyst development. *Hum Reprod* 2002; **17**:2700–2705.
- Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Franco JG Jr. A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. *J Assist Reprod Genet* 2001; **18**:378–381.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011; **26**:2658–2671.
- Meseguer M, Rubio I, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome in comparison with standard incubator; a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012; **98**:1481–1489.
- Montag M, Liebenthron J, Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta* 2011; **32**(Suppl 3):S252–S256.
- Ottosen LD, Hindkjaer J, Ingerslev J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet* 2007; **24**:99–103.
- Parinaud J, Veiga A, Vieitez G, Busquets A, Milhet P, Calderon G, Richoille G, Barri P. Randomized comparison of three media used for embryo culture after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; **13**(Suppl 4):212–217.
- Pool TB. Recent advances in the production of viable human embryos *in vitro*. *Reprod Biomed Online* 2002; **4**:294–302.
- Pool TB. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety. *Semin Reprod Med* 2005; **23**:309–318.
- Pribenszky C, Losonczi E, Molnar M, Lang Z, Matyas S, Rajczy K, Molnar K, Kovacs P, Nagy P, Conceicao J et al. Prediction of *in vitro* developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 2010; **20**:371–379.
- Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2004; **81**:27–29.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985; **44**:493–498.
- Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, Bellver J, Meseguer M. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012; **98**:1458–1463.
- Sepulveda S, Garcia J, Arriaga E, Diaz J, Noriega-Portella L, Noriega-Hoces L. *In vitro* development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 2009; **91**:1765–1770.
- Staessen C, Janssenswillen C, De Clerck E, Van Steirteghem A. Controlled comparison of commercial media for human *in vitro* fertilization: Menezo B2 medium versus Medi-Cult universal and BMI medium. *Hum Reprod* 1998; **13**:2548–2554.
- Van Langendonck A, Demille D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertil Steril* 2001; **76**:1023–1031.
- Wirleitner B, Vanderzwalmen P, Stecher A, Zech MH, Zintz M, Zech NH. Individual demands of human embryos on IVF culture medium: influence

- on blastocyst development and pregnancy outcome. *Reprod Biomed Online* 2010;**21**:776–782.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1115–1121.
- Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, Giulini S, La Marca A, Tirelli A, Volpe A. Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril* 2010;**93**:1859–1863.
- Zollner KP, Zollner U, Schneider M, Dietl J, Steck T. Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit* 2004;**10**:CR1–CR7.

CAPÍTULO IV.

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL CONTENIDO CROMOSÓMICO EN LA CINÉTICA EMBRIONARIA

La morfocinética embrionaria como herramienta para aumentar las probabilidades de seleccionar embriones cromosómicamente normales a través de un método no invasivo

Natalia Basile, María del Carmen Nogales, Fernando Bronet, Mireia Florensa, Marissa Riqueiros, Lorena Rodrigo, Juan García-Velasco, Marcos Meseguer

Fertility and Sterility (FI: 4,295)

Vol.101, No.3 pp. 699-704, 2014

El diagnóstico genético pre-implantacional (DGP) es una herramienta ampliamente utilizada en los laboratorios de FIV. Nos permite detectar anomalías cromosómicas y génicas presentes en un alto nivel de los embriones humanos generados in vitro y que representan una de las principales causas de aborto en el primer trimestre de embarazo (Gianaroli et al. 2002, Kuliev et al. 2005, Marquez et al. 2000, Munne et al. 2004, Munne et al. 2007). Sin embargo, el DGP, es una técnica costosa e invasiva que no siempre puede ser utilizada por las pacientes ya sea por cuestiones legales, económicas y/o sociales. Es en estos casos donde una técnica alternativa podría jugar un papel importante especialmente si ayudase a seleccionar embriones con mayor probabilidad de ser cromosómicamente normales. El objetivo de este estudio fue el de

analizar el comportamiento morfocinético de los embriones cromosómicamente normales y anormales y así desarrollar una herramienta de selección no invasiva que aumente las probabilidades de seleccionar embriones cromosómicamente normales. Para ello hemos elaborado un estudio con pacientes incluidas en el programa de DGP de IVI Madrid e IVI Barcelona por fallo de implantación (FI) o aborto de repetición (AR).

4.1. Material y Métodos

El desarrollo embrionario de 125 pacientes con FI o AR fue analizado retrospectivamente utilizando el Embryoscope[®]. De estas 125 pacientes, 77 recibieron transferencia embrionaria entre Marzo del 2011 y Agosto del 2012. La biopsia embrionaria se realizó en D3 de cultivo y el screening genético a través de array CGH. El número total de embriones analizados fue de 504. Se define FI como la incapacidad de concebir después de 3 ciclos de FIV. Se define AR como dos o más abortos antes de la semana 20 de embarazo.

4.1.1. Estimulación ovárica, punción, cultivo y biopsia embrionaria

La estimulación ovárica se llevó a cabo según un protocolo descrito previamente (Garcia-Velasco et al. 2011). La punción ovárica tuvo lugar 36 horas después de la administración de hCG. Una vez obtenidos, los ovocitos fueron mantenidos en cultivo por 4 horas en una incubadora convencional a 37°C y 5.8% CO₂. La denudación de los ovocitos se realizó mecánicamente con enzima hialuronidasa y posteriormente se procedió a hacer el ICSI.

Una vez inyectados, los ovocitos fueron colocados en pocillos individuales dentro de la placa de cultivo EmbryoSlide®. El EmbryoSlide® se compone de 12 pocillos individuales y a los efectos de este estudio todos los pocillos fueron llenados con el mismo medio de cultivo: Vitrolife®. Los cigotos obtenidos fueron cultivados dentro del Embryoscope® hasta día 3 de desarrollo embrionario. Seguidamente se realizó la biopsia de una única blastómera en todos los embriones que tuvieran 6 o más blastómeras y menos de 25% de fragmentos (Mir et al. 2013). La transferencia embrionaria se realizó en día 5 de cultivo (aproximadamente 120 horas) en todos aquellos pacientes con embriones diagnosticados como normales. La **Figura 13** describe el esquema de trabajo.

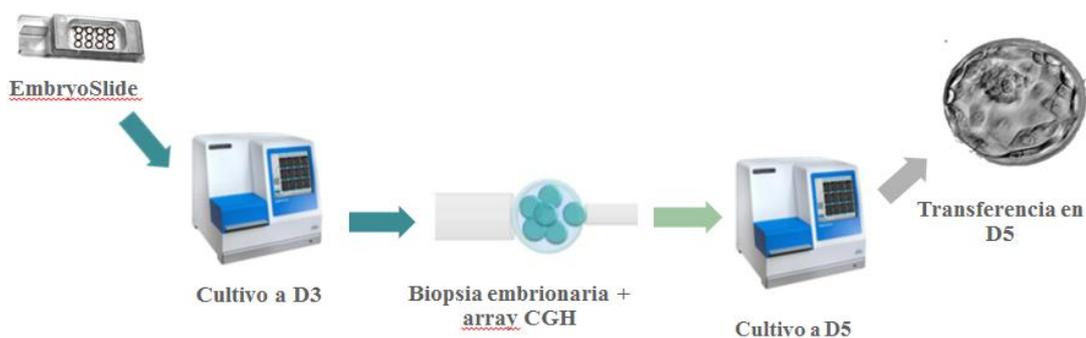


Figura 13. Esquema de trabajo: Los embriones son cultivados hasta día 3 en el EmbryoScope®. Luego se realiza la biopsia embrionaria y en día 5 se transfieren aquellos pacientes con embriones cromosómicamente normales

4.1.2 Análisis Cromosómico

Para el análisis cromosómico el ADN de la blastómera fue amplificado utilizando el sistema de amplificación Sureplex DNA (BlueGnome). Posteriormente, el ADN amplificado y el ADN control fueron marcados con los fluorocromos Cy3 y Cy5. Seguidamente las muestras fueron hibridadas por 6-12 horas a través del 34sure array (BlueGnome). Los resultados finales fueron obtenidos en día 5 mediante scanner de

láser. El análisis final de los datos se llevó a cabo a través del software BlueFuse. El protocolo se completó en 24 horas.

4.1.3. Registro y análisis de imágenes

El registro y análisis de las series de imágenes se llevaron a cabo según lo descrito en el capítulo anterior. Las variables medidas fueron las mismas con el agregado de la variable t5-t2. Se define t5-t2 como el intervalo de tiempo (en horas) entre 2 y 5 células que combina los conceptos de ciclo celular y sincronía.

4.1.4. Análisis Estadístico

Para describir la distribución de probabilidades de embriones cromosómicamente normales, los resultados cinéticos fueron transformados de variables continuas a variables categóricas. Para ello se recurre al uso de “cuartiles” que dividen la serie estadística en cuatro grupos con igual cantidad de términos. Mediante este procedimiento, se evitaron los sesgos introducidos por los valores extremos, es decir, un sólo valor aberrante puede inflar su valor y aportar una impresión confusa de la variación que existe en el grueso de los datos. Una vez que se establecieron los cuartiles, se calculó el porcentaje de embriones cromosómicamente normales en cada uno de los cuartiles con el objetivo de determinar la distribución de normalidad cromosómica en cada una de las categorías. Las variables continuas se analizaron con una T-Student cuando se compararon dos grupos y con ANOVA cuando se compararon más grupos. Para variables categóricas se utilizó Chi-cuadrado. Se consideró la presencia de significación estadística cuando el valor de $p < 0.05$. Para cada variable se definió un “rango óptimo” resultado de la combinación de los cuartiles con mayor

porcentaje de embriones normales. Posteriormente se llevó a cabo un análisis de regresión logística para identificar aquellas variables más relevantes en relación a la normalidad cromosómica y así generar un modelo de selección. Una curva ROC se utilizó para analizar el valor predictivo de dicho modelo. Todo el análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS.

4.2. Resultados

La edad media de las pacientes incluidas en el estudio fue de 36,1 años (IC 95% 35,3-36,9). La indicación para DGP fue AR en un 51,9% de las pacientes y FI en un 48,1%. Un total de 52 embriones, de los 114 transferidos, implantó (saco gestacional con latido cardíaco positivo) resultando en una tasa de implantación del 46,5% (IC 95% 37,3-55,6). La tasa de embarazo evolutivo por transferencia fue del 54,5% (n= 42; IC 95% 43,4-65,6)

Tabla 5. Tiempos medios para todas las variables en embriones normales y anormales

Variable	Dotación cromosómica	N	Media	95% IC		Mínimo	Máximo	P
				L. inferior	L. superior			
2PN	Normal	130	8,8	8,5	9,1	5,9	14,1	,353
	Anormal	317	9,0	8,7	9,3	3,8	23,3	
PNF	Normal	142	24,0	23,2	24,8	8,7	63,5	,368
	Anormal	356	24,5	24,0	25,1	17,0	70,6	
t2 (h)	Normal	143	26,4	25,9	26,8	20,4	41,7	,118
	Anormal	361	26,8	26,5	27,2	19,3	41,6	
t3 (h)	Normal	143	37,9	37,3	38,6	26,8	47,5	,139
	Anormal	360	37,2	36,7	37,7	23,0	49,5	
t4 (h)	Normal	142	39,9	39,2	40,6	27,1	54,7	,567
	Anormal	357	39,6	39,1	40,1	23,0	59,1	
t5 (h)	Normal	130	51,8	50,8	52,8	27,1	70,6	,001
	Anormal	328	49,4	48,6	50,2	26,0	72,7	
cc2 (h)	Normal	143	11,5	11,1	12,0	0,0	17,3	,004
	Anormal	360	10,4	9,9	10,8	0,0	18,4	
cc3 (h)	Normal	130	14,0	13,2	14,8	0,0	35,9	,002
	Anormal	329	12,2	11,5	12,8	0,0	33,8	
t5-t2(h)	Normal	130	25,5	24,6	26,4	1,0	47,9	,000
	Anormal	328	22,6	21,8	23,3	0,0	45,4	

PN: pronúcleos, PNF: tiempo de “pronuclear fading”, t2 (tiempo a 2 células), t3 (tiempo a 3 células), t4 (tiempo a 4 células), t5 (tiempo a 5 células), cc2 (t3-t2), cc3 (t5-t3), s2 (t4-t3)

Un total de 986 ovocitos inyectados fueron cultivados en el Embryoscope®; 717 fecundaron (72,5%; IC 95% 69,7-75,3) y 504 (70,3%; IC 95% 66,3-74,3) fueron analizados por arrayCGH. De los embriones analizados, 143 (28%; IC 95% 24,4-32,2) resultaron cromosómicamente normales.

Con respecto a la cinética embrionaria, se observó que los tiempos medios para todas las variables individuales y compuestas eran menores en los embriones diagnosticados como anormales que en los normales, lo que sugiere que los embriones anormales se dividen más tempranamente que los normales. Estas diferencias resultaron significativas para algunas de las variables como ser: t5, cc2, cc3 y t5-t2 (**Tabla 5**). Asimismo, una vez definidos los rangos óptimos para cada una de las variables, se observó que para algunas de ellas la proporción de embriones dentro y fuera del rango óptimo era significativamente diferente como podemos observar en la **Figura 14**.

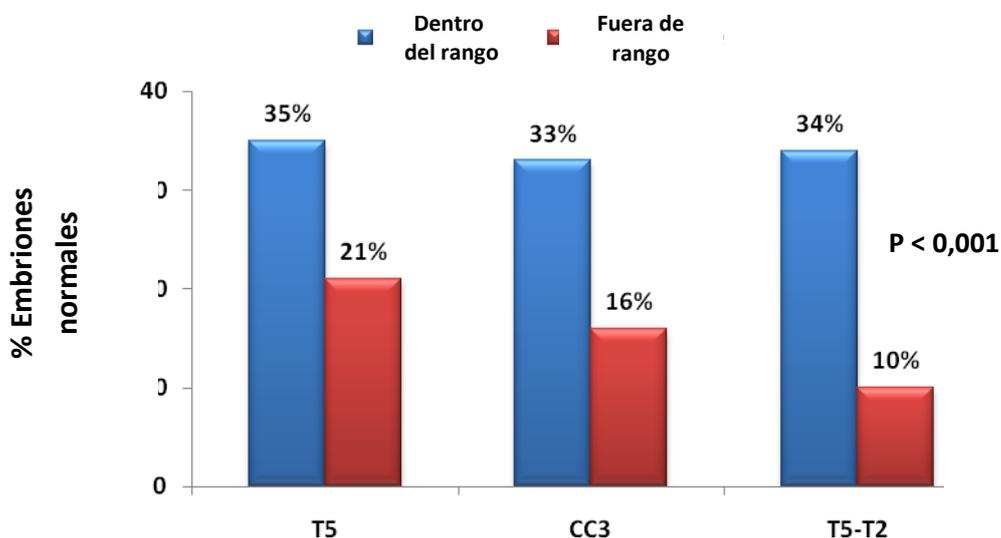


Figura 14. Porcentaje de embriones normales dentro y fuera de los rangos óptimos definidos para las variables t5 (47,2-58,2h), cc3 (11,7-18,2h) y t5-t2 (> 20,5h).

La **Tabla 6**, a su vez, describe este fenómeno en mayor detalle: los embriones dentro del rango óptimo para t5 (47,2-58,2 h), cc3 (11,7-18,2h) y t5-t2 (> 20,5 h) tienen una proporción significativamente mayor de embriones normales que aquellos fuera del rango óptimo (34,7%, 33,4% y 34,4% vs. 20,9%, 16,3% y 10,4% respectivamente).

Tabla 6. Porcentaje de embriones normales y anormales dentro y fuera de los rangos óptimos definidos para t5, cc3 y t5-t2

	N	Anormal	Normal
t5			
Fuera rango	230	79,1% (IC 95% 70,9-84,4) 182/230	20,9% (IC 95% 15,7-26,1) 48/230
47,2-58,2 h	274	65,3% (IC 95% 57,8-69,2) 179/274	34,7% (IC 95% 29,1-40,3) 95/274
P			< 0,001
cc3			
Fuera rango	148	83,7% (IC 95% 77,8-89,7) 113/135	16,3% (IC 95% 10,3-22,3) 24/148
11,7-18,2 h	356	66,6% (IC 95% 61,7-71,5) 215/323	33,4% (IC 95% 28,5-38,3) 119/356
P			< 0,001
t5-t2			
Fuera rango	126	89,6% (IC 95% 84,3-94,9) 113/126	10,4% (IC 95% 5,1-15,7) 13/126
> 20,5 h	378	65,6% (IC 95% 60,8-70,4) 248/378	34,4% (IC 95% 29,6-39,2) 130/378
P			< 0,001

t5 (tiempo a 5 células), cc3 (t5-t3)

Teniendo en cuenta estas diferencias se realizó un análisis de regresión logística para seleccionar y ordenar aquellas variables (expresadas como variables binarias dentro y fuera del rango óptimo) con mayor relevancia en relación a normalidad cromosómica. El modelo identificó las variables t5-t2 (OR = 2,853; IC 95% 1,763-4,616) y cc3 (OR = 2,095; IC 95% 1,356-3,238) como las más relevantes. Un análisis de curva ROC para determinar las propiedades predictivas de este modelo dio un valor de área debajo de la curva de 0,634 (IC 95% 0,581-0,687).

Utilizando los datos de la regresión logística se creó un algoritmo que clasifica a los embriones en 4 categorías desde la A hasta la D (**Figura 15**). El proceso se llevó a

cabo de la siguiente manera: en primer lugar, si los valores de $t5-t2$ estaban incluidos dentro del intervalo óptimo (47,2-58,2 horas), el embrión se clasificó como A o B; si el valor de $t5-t2$ se localizaba fuera del rango óptimo, el embrión se definió como C o D.

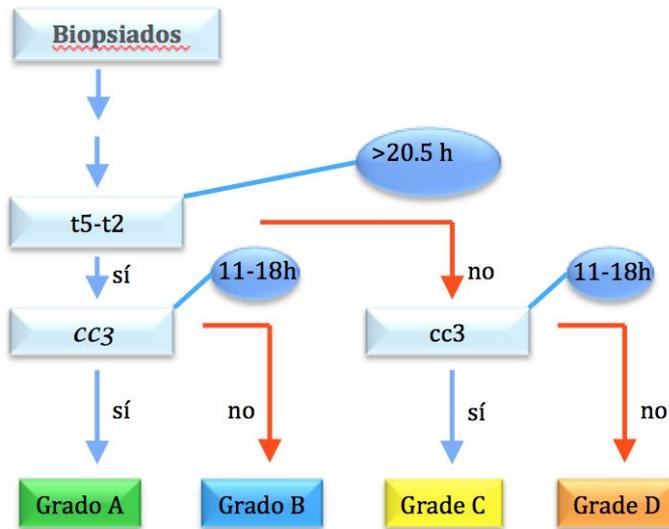


Figura 15. Algoritmo de selección embrionaria. Los embriones son clasificados en categorías A-D en función de las variables $t5-t2$ y $cc3$ ($t5-t3$)

Para el caso de $cc3$, si el tiempo de división estaba dentro del valor adecuado (11,7-18,2 horas), el embrión era A o C dependiendo del valor de $t5-t2$; de forma parecida, si el valor de $cc3$ estaba fuera del rango óptimo, el embrión se clasificó como B o D según $t5-t2$. La **Figura 16** describe el porcentaje de embriones normales para cada una de las diferentes categorías: A 35,9%; B 26,4%; C 12,10% y D 9,8%).

4.3. Discusión

Este estudio combinó la tecnología time-lapse y el DGP para analizar y comparar el comportamiento morfocinético de los embriones normales y anormales. Las observaciones en un número elevado de embriones (n=504) dieron lugar a la creación de un algoritmo que podría aumentar la probabilidad de seleccionar embriones cromosómicamente normales a través de un método no invasivo.

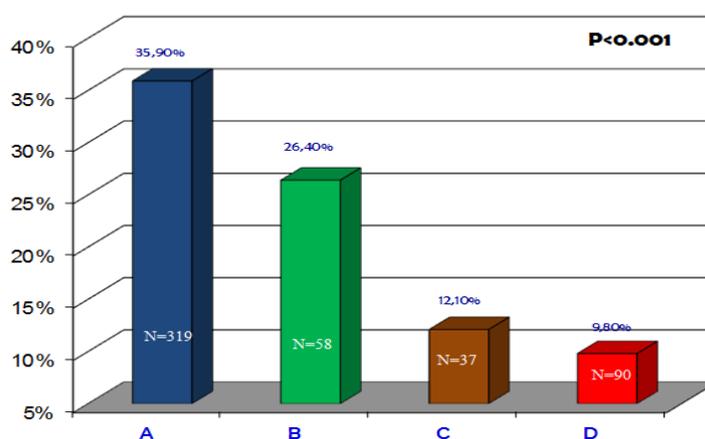


Figura 16. Porcentaje de embriones normales en función de las categorías.
La N representa el número de embriones en cada categoría

El impacto del contenido cromosómico en la morfología y el desarrollo embrionario ha sido estudiado con anterioridad desde un punto de vista estático (Alfarawati et al. 2011, Magli et al. 2007, Munne et al. 1995). En este estudio introducimos un nuevo método para dicho análisis, resultando interesante destacar que las variables incluídas en el algoritmo (t5-t2 y cc3) pueden ser detectadas tan tempranamente como en día 2 de desarrollo. Esto representa una gran ventaja con respecto a otros modelos (Campbell et al. 2013) ya que el algoritmo puede ser aplicado no solo en pacientes que se transfieren en estadio de blastocisto sino también en pacientes con transferencia en día 3.

Existen una gran cantidad de embriones que son cromosómicamente anormales (Gianaroli et al. 2002, Marquez et al. 2000) y esto constituye una de las principales causas de fracaso en Reproducción Asistida. Esto justifica ampliamente el uso del PGS o del time-lapse siempre que el PGS no fuera posible o indicado. Debemos resaltar que la selección de embriones a través de este algoritmo no debe considerarse como un reemplazo al PGS, sin embargo, representa una excelente alternativa para pacientes de buen pronóstico que no estén indicadas para PGS. Asimismo aquellas pacientes que sí estén indicadas para PGS, ya sea por fallo de implantación o aborto de repetición, y que por motivos económicos, sociales y/o legales no pudieran acceder al PGS, entonces esta nueva herramienta podría aumentar sus probabilidades de éxito en reproducción asistida.

Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis

Natalia Basile, Ph.D.,^a Maria del Carmen Nogales, Ph.D.,^a Fernando Bronet, Ph.D.,^a Mireia Florensa, Ph.D.,^b Marissa Riqueiros, Ph.D.,^b Lorena Rodrigo, Ph.D.,^c Juan García-Velasco, M.D.,^a and Marcos Meseguer, Ph.D.^d

^a IVI Madrid, Madrid; ^b IVI Barcelona, Barcelona; ^c IVIOMICS, Valencia; and ^d Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

Objective: To study the differences in the cleavage time between chromosomally normal and abnormal embryos and to elaborate an algorithm to increase the probability of noninvasively selecting chromosomally normal embryos.

Design: Retrospective cohort study.

Setting: University-affiliated infertility center.

Patient(s): Preimplantation genetic screening patients ($n = 125$; $n = 77$ with ET), including cases of repeated implantation failure or recurrent miscarriage. A total of 504 embryos were analyzed.

Intervention(s): Embryo culture within a time-lapse system.

Main Outcome Measure(s): Kinetic variables included the time to 2 (t_2), 3 (t_3), 4 (t_4), and 5 (t_5) cells as well as the length of the second ($cc_2 = t_3 - t_2$) and third ($cc_3 = t_5 - t_3$) cell cycle, the synchrony in the division from 2 to 4 cells ($s_2 = t_4 - t_3$), and the interval $t_5 - t_2$. Implantation and clinical pregnancy rates were also analyzed.

Result(s): A logistic regression analysis identified $t_5 - t_2$ (odds ratio [OR] = 2.853; 95% confidence interval [CI], 1.763–4.616), followed by cc_3 (OR = 2.095; 95% CI, 1.356–3.238) as the most relevant variables related to normal chromosomal content. On the basis of these results, an algorithm for embryo selection is proposed to classify embryos from A to D. Each category exhibited significant differences in the percentage of normal embryos (A, 35.9%; B, 26.4%; C, 12.1%; D, 9.8%).

Conclusion(s): Chromosomally normal and abnormal embryos have different kinetic behavior.

On the basis of these differences, the proposed algorithm serves as a tool to classify embryos and to increase the probability of noninvasively selecting normal embryos. (Fertil Steril® 2014;101:699–704. ©2014 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Embryo kinetics, chromosome, arrayCGH, time lapse

Discuss: You can discuss this article with its authors and with other ASRM members at <http://fertstertforum.com/basilen-embryos-time-lapse-morphokinetics/>



Use your smartphone to scan this QR code and connect to the discussion forum for this article now.*

* Download a free QR code scanner by searching for "QR scanner" in your smartphone's app store or app marketplace.

Tremendous advances have occurred in the field of assisted reproduction technology (ART) over the past 30 years as the result of a combination of different factors in the IVF laboratory, including the introduction of groundbreaking techniques,

such as intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (1, 2), great improvements in culture media, and the introduction of preimplantation genetic diagnosis (PGD) (3). From a clinical point of view, physicians have learned to handle more pure and more powerful stimulation

drugs that, along with increasing knowledge about the pathophysiology of ovarian hyperstimulation syndrome, have made the frequency of this syndrome almost anecdotic and the process of preparing a patient for IVF a controlled situation.

However, IVF success rates remain relatively low, with clinical pregnancy rates (PRs) of ~30% per transfer as reported by the Society for Assisted Reproductive Technology and by the European registers of the European Society of Human Reproduction and Embryology (<https://www.sartcorsonline.com>, 4). In addition, the number

Received July 29, 2013; revised November 19, 2013; accepted December 4, 2013; published online January 11, 2014.

N.B. has nothing to disclose. M.d.C.N. has nothing to disclose. F.B. has nothing to disclose. M.F. has nothing to disclose. M.R. has nothing to disclose. L.R. has nothing to disclose. J.G.-V. has nothing to disclose. M.M. has nothing to disclose.

IVI is a minor shareholder in Unisense Fertilitech A/S.

Reprint requests: Natalia Basile, Ph.D., IVI Madrid, Avenue Del Talgo 68, Madrid, Spain (E-mail: natalia.basile@ivi.es).

Fertility and Sterility® Vol. 101, No. 3, March 2014 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2014 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.005>

of multiple births still remains a concern, and the pressing need to reduce the number of transferred embryos demands better selection methods. Thus, a big question remains: how can we move on to single ET (SET) programs while maintaining, or even improving, our clinical outcomes?

One approach could be based on the method used to evaluate and select embryos in the laboratory. Before the introduction of time-lapse technology, embryo grading and, most importantly, embryo selection were based only on static observations. These observations are inevitably linked to specific time points during the day and do not describe a dynamic process, such as embryo development, well enough. This subjective procedure has large flaws, such as inter- and intraobserver variation (5, 6), and controversial benefits for almost every scoring system.

The problem with applying a static scoring system to a dynamic process was solved in our laboratories by the introduction of time-lapse technology. Since that step, new kinetic markers associated with higher implantation potential have been proposed (7), the safety of these systems validated (8–11), and the effects of different intrinsic and extrinsic factors on the morphokinetic behavior of the human embryo analyzed (12–15). A morphokinetic era has evidently started in IVF.

Another approach could be based on the genetic screening of embryos. Several studies have demonstrated that chromosomal abnormalities are one of the most common causes of abnormal embryos in IVF (16–20), which translates into poor clinical outcomes. A recent publication highlighted the inherent imprecision of SET when conventional morphology is used alone, observing a 44.9% aneuploidy rate for blastocysts from patients with good prognosis (21).

Thus, embryo selection using morphokinetic markers combined with preimplantation genetic screening (PGS) could be the solution. Even though time-lapse technology is increasingly used in IVF laboratories, PGS is not always possible owing to legal or social reasons or simply because the clinic cannot perform the technique. The objective of the present study was to analyze the morphokinetic behavior of chromosomally normal and abnormal embryos to develop a new selection tool that increases the probability of noninvasively selecting chromosomally normal embryos. We retrospectively analyzed embryos using array-comparative genome hybridization (arrayCGH).

MATERIALS AND METHODS

Embryo development was retrospectively analyzed using a time-lapse imaging system (Embryoscope, Unisense Fertilitech) in a total of 125 consecutive patients undergoing PGS ($n = 504$ embryos); of those, 77 received an ET between March 2011 and August 2012. All procedures and protocols were approved by the Institutional Review Board, which regulates and approves database analysis and clinical IVF procedures for research at IVI.

Embryo biopsy was done on day 3 and comprehensive chromosome screening performed through arrayCGH. This study included patients undergoing PGS for recurrent miscarriage (RM) and repeated implantation failure (RIF) only. RM was defined as two or more miscarriages before 20 weeks of pregnancy, and RIF was defined as the failure of a couple to

conceive after 10 or more good-quality embryos transferred or after three IVF cycles (22).

Ovarian Stimulation

Ovarian stimulation was carried out as described elsewhere (23). Briefly, patients received a starting dose of recombinant FSH (Puregon, MSD; Gonal F, Merck-Serono) ranging from 150 to a maximum of 225 IU. GnRH antagonist (0.25 mg Ganirelix, Orgalutran) was administered daily starting on day 5 or 6 after FSH administration. Recombinant hCG (Ovitrelle, Merck-Serono) was administered as soon as two leading follicles reached a mean diameter ≥ 17 mm.

Oocyte Retrieval, Embryo Culture, and Embryo Biopsy

Oocyte retrieval was performed 36 hours after hCG under ultrasound guidance. After retrieval, the oocytes were kept in culture for 4 hours at 37.3°C and 5.8% CO₂ until oocyte denudation. Oocyte denudation was performed by mechanically pipetting with 40 IU/mL of hyaluronidase (Vitrolife). ICSI was subsequently performed on all metaphase II oocytes. Fertilized oocytes were cultured individually in microdroplets of culture media (Vitrolife) until the day of blastomere biopsy. Biopsy was performed on day 3 for all embryos that were made up of 6 or more cells with less than 25% fragmentation as described elsewhere (24). Briefly, embryos were placed individually on a droplet containing Ca⁺²/Mg⁺²-free medium (G-PGD, Vitrolife), and the zona pellucida was perforated using laser technology (OCTAX). Patients with normal embryos were scheduled for blastocyst transfer on day 5 (approximately 120 hours) of development. Treatment cycles were selected at random for investigation by time-lapse image acquisition and subsequent retrospective analysis of the morphokinetic parameters of embryo development.

ArrayCGH

ArrayCGH was performed as described elsewhere (24). Briefly, a single cell from embryos was amplified using the Sureplex DNA amplification system (BlueGnome). Amplification quality was ensured by gel electrophoresis (Lonza). Cy3 and Cy5 fluorophores were used to label the sample and control DNA, respectively. Labeling mixes were combined and hybridized on a 24sure array (BlueGnome) for 6–12 hours. Final results were obtained on day 5 using a laser scanner (710 Innoscan, Innosys; and Powerscanner, TECAN). BlueFuse software was used to analyze the data (BlueGnome). The entire protocol for arrayCGH analysis was completed in 24 hours.

Time Lapse Analysis and Recording of Kinetic Parameters

The exact times for each embryo division and developmental parameters were calculated in hours postmicroinjection (hpi). Time-lapse images of each embryo were retrospectively analyzed using an EmbryoViewer software workstation (Unisense Fertilitech). Images were acquired every 15 minutes in five different focal planes over 120 hours of culture.

Development markers included the visibility of two pronuclei (2PN); pronuclear fading (PNF) when both pronuclei were no longer visible; the first cell division leading to two cells (t2); and subsequently the second (3 cells, t3), third (4 cells, t4), and fourth (5 cells, t5) cell divisions. We also calculated the intervals between two consecutive cleavages and defined the duration of the second cell cycle (cc2) as the time from division into a two-blastomere embryo to division into a three-blastomere embryo ($cc2 = t3 - t2$) and second synchrony (s2) as the time from division into a three-blastomere embryo to division into a four-blastomere embryo ($s2 = t4 - t3$). The duration of the third cell cycle was defined as cc3 ($cc3 = t5 - t3$), and the interval between 2 and 5 cells as the variable $t5 - t2$, which combines the concepts of cell cycle and synchrony.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to test whether the mean times for embryonic events were significantly different between chromosomally normal and abnormal embryos. To describe the distribution of the probability of chromosomally normal embryos, times were converted from continuous variables into categorical variables by dividing them into groups based on their quartiles. Using this procedure, we avoided bias caused by differences in the total number of embryos in each category. Next, we calculated the percentage of chromosomally normal embryos for each time quartile to assess the distribution of normality in the different categories. Continuous data were analyzed using Student's *t*-test when comparing two groups or ANOVA followed by Bonferroni's and Scheffe's post hoc analysis when multiple groups were considered. χ^2 -tests were used to compare categorical data. For each time variable, the optimal range was defined as the combined range spanned by the two quartiles or as the range spanned by the one quartile with the highest proportion of normal embryo rates. A binary variable was defined by the value inside if the value of the time variable was inside, and vice versa for outside, the optimal range. The odds ratio (OR) of the effect of all binary variables generated for embryonic chromosomal normality was expressed in terms of the 95% confidence interval (95% CI) and significance. The effect of optimal ranges and other binary variables on chromosomal normality were quantified by logistic regression analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to test the predictive value of all variables included in the model with respect to chromosomal normality. ROC curve analysis provides area under the curve (AUC) values between 0.5 and 1 and can be interpreted as a measurement of the global classification ability of the model.

RESULTS

The mean age of our female population was 36.1 years (95% CI, 35.3–36.9). The primary etiology of female factor infertility as an indication for PGS was RM in 40 women (51.9%) and RIF in 37 women (48.1%). Average E_2 levels before hCG injection were 1,706 pg/mL (95% CI, 1494–1917). A total of 52 of the 114 transferred embryos were successfully implanted (gestational sac), resulting in a 46.48% (95% CI, 37.3–55.66) implantation rate. The biochemical PR per transfer was

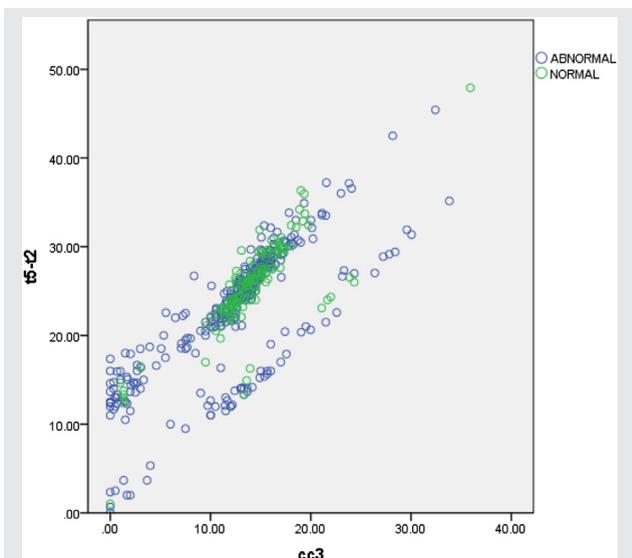
63.3% ($n = 49$; 95% CI, 52.5–74.1), and the ongoing PR per transfer was 54.5% ($n = 42$; 95% CI, 43.4–65.6).

A total of 986 microinjected oocytes were cultured inside the time-lapse system; 717 were fertilized (72.5%; 95% CI, 69.7–75.3), and 504 (70.3%; 95% CI, 66.3–74.3) were analyzed by arrayCGH. Among the analyzed embryos, 143 (28.3%; 95% CI, 24.4–32.2) had normal chromosome content. [Supplemental Table 1](#) shows the mean times for each cell division and for the intervals between consecutive divisions. Significant differences were observed between normal and abnormal embryos for $t5$, cc2, cc3, and $t5 - t2$. [Figure 1](#) clearly shows a higher proportion of normal embryos within the optimal ranges defined for $t5 - t2$ and cc3. [Table 1](#) describes the distribution in more detail: embryos falling within optimal ranges for $t5$ (47.2–58.2 hours), cc3 (11.7–18.2 hours), and $t5 - t2$ (>20.5 hours) exhibited a significantly greater proportion of normal embryos than those falling outside these ranges (34.7%, 33.4%, and 34.4% vs. 20.9%, 16.3%, and 10.4%, respectively).

Logistic regression analysis was used to select and organize the relevance of observed events (expressed as binary variables inside or outside the optimal range) to the selection of embryos with a higher probability of being chromosomally normal. The model identified $t5 - t2$ (OR = 2.853; 95% CI, 1.763–4.616) and cc3 (OR = 2.095; 95% CI, 1.356–3.238) as the most relevant variables related to normal chromosomal content. A ROC analysis to determine the predictive properties of this model with respect to chromosomal normality gave an AUC value of 0.634 (95% CI, 0.581–0.687).

Using the data provided by logistic regression, we created a hierarchical model using the corresponding decision tree procedure, which subdivided embryos into four categories (A–D) as shown in [Figure 2](#). The classification procedure based on the binary variables $t5 - t2$ and cc3 was as follows. First, if the

FIGURE 1



Distribution of chromosomally normal (green circles) and abnormal (blue circles) embryos in relation to the variables $t5 - t2$ and cc3. A greater proportion of green circles is observed within the optimal ranges proposed for $t5 - t2$ (>20.5 hours) and cc3 (11.7–18.2 hours).

Basile. Embryo kinetics and chromosomal content. *Fertil Steril* 2014.

TABLE 1

Percentage of normal and abnormal embryos in and out of defined optimal ranges.

	N	Abnormal	Normal
t5			
Out	230	79.1% (95% CI, 70.9–84.4) 182/230	20.9% (95% CI, 15.7–26.1) 48/230
47.2–58.2 hours	274	65.3% (95% CI, 57.8–69.2) 179/274	34.7% (95% CI, 29.1–40.3) 95/274
P value			< .001
cc3			
Out	148	83.7% (95% CI, 77.8–89.7) 124/148	16.3% (95% CI, 10.3–22.3) 24/148
11.7–18.2 hours	356	66.6% (95% CI, 61.7–71.5) 237/356	33.4% (95% CI, 28.5–38.3) 119/356
P value			< .001
t5 – t2			
<20.5 hours	126	89.6% (95% CI, 84.3–94.9) 113/126	10.4% (95% CI, 5.1–15.7) 13/126
>20.5 hours	378	65.6% (95% CI, 60.8–70.4) 248/378	34.4% (95% CI, 29.6–39.2) 130/378
P value			< .001

Note: t2: time to 2 cell stage; t3: time to 3 cell stage; t5: time to 5 cell stage; cc3= t5 – t3; t5 – t2: interval between 2 and 5 cells.

Basile. Embryo kinetics and chromosomal content. Fertil Steril 2014.

value of t5 – t2 fell inside the optimal range, the embryo was categorized as A or B; if the value of t5 – t2 fell outside the optimal range, the embryo was categorized as C or D. If the value of cc3 fell inside the optimal range, the embryo was categorized as A or C depending on t5 – t2; similarly, if the value of cc3 fell outside the optimal range, the embryo was categorized as B or D depending on t5 – t2. Figure 3 describes a significant decrease in the percentage of normal embryos between the different categories (A, 35.9%; B, 26.4%; C, 12.10%; and D, 9.8%). Regarding blastocyst formation, from 504 embryos analyzed, 54.2% (n = 273) reached blastocyst stage on day 5 of development. Regarding those embryos with normal chromosome content, 79.0% reached blastocyst stage (n = 113). The percentages of blastocysts between the different categories were as follows: A, 66.5% (n = 212); B, 48.5% (n = 28); C, 25.0% (n = 9); and D, 26.6% (n = 24; P < .0001).

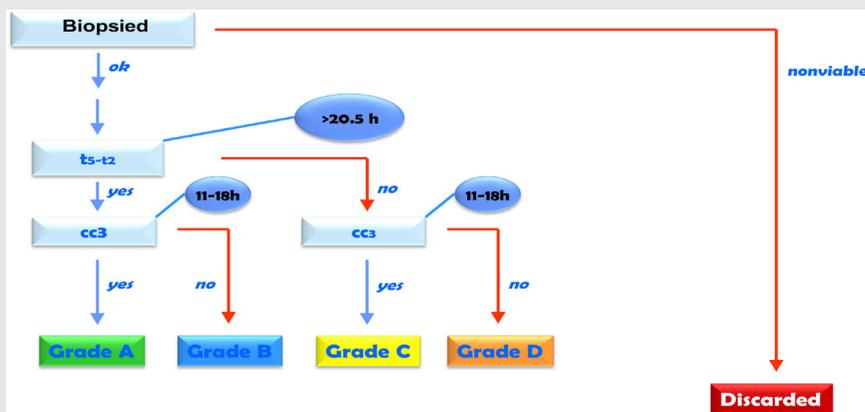
DISCUSSION

This study combined time-lapse technology and PGS to analyze and compare the morphokinetic behavior of chromo-

somally normal and abnormal embryos. Observations in a large number of embryos (n = 504) resulted in an algorithm that can increase the probability of selecting chromosomally normal embryos in the absence of PGS.

The impact of chromosomal content on embryo morphology and development has been described extensively from a static point of view (20, 25–28). More recently, and as a consequence of the increasing use of time-lapse technology in IVF laboratories, the same approach has been carried out in a more dynamic manner. Davies et al. (29) reported delayed first and second cleavage and prolonged transitions between 2 and 4 cells among embryos with complex aneuploidies (n = 62 cleavage-stage embryos). The same study reported that irregular divisions (transition from 1 to 3 and 2 to 5 cells) and the disappearance of asynchronous pronuclei predominate in embryos with multiple aneuploidies. Chavez et al. (30) observed that chromosomally normal embryos display strict and tightly clustered cell cycle parameters up to the 4-cell stage, but only 30% of aneuploid embryos exhibit values within normal time ranges (n = 68 cleavage-stage embryos). On the other hand, Campbell et al. (31) reported no difference between euploid

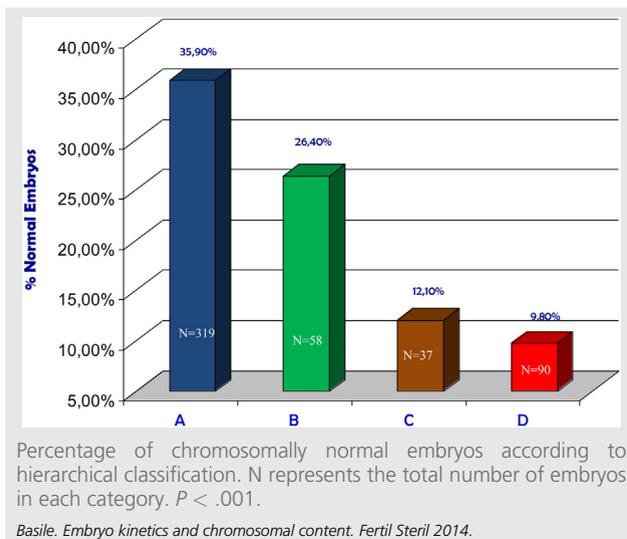
FIGURE 2



Hierarchical classification of embryos based on the embryos available for biopsy, interval t5 – t2, and the duration of the third cell cycle (cc3). The algorithm classified embryos into four categories based on the expected percentage of chromosomally normal embryos.

Basile. Embryo kinetics and chromosomal content. Fertil Steril 2014.

FIGURE 3



and aneuploid embryos during early stages of development. However, in the periblastulation phase, aneuploid embryos had a significant delay in development compared with euploid embryos ($n = 98$ blastocysts). This study gave rise to an aneuploidy risk model based on the time from insemination to the start of blastulation (tSB) and the time from insemination to the formation of a full blastocyst (tB). More specifically, embryos with $tB < 122.9$ hpi and $tSB < 96.2$ hpi are classified as having low risk; embryos having $tB < 122.9$ hpi and $tSB \geq 96.2$ hpi are classified as having medium risk; and embryos having $tB \geq 122.9$ hpi are classified as having high risk. An elegant study by the same group applied the aneuploidy risk model to evaluate its effectiveness and potential clinical impact for unselected IVF patients without undergoing PGS after analyzing embryos with known implantation data (KID embryos). The study revealed significant differences in fetal heart rate ($n = 88$ KID embryos) and live-birth rate ($n = 44$ KID embryos) between risk classes (low, medium, high) (32). In agreement with the Davies et al. study but in opposition to Campbell et al.'s, our group found differences in the morphokinetic behavior of chromosomally normal and abnormal embryos during early stages of development, but with a much larger data set ($n = 504$ embryos), which is 5 times higher than the data sets from previous publications, giving our results statistical power and reducing the chances of random findings.

Interestingly, the variables included in our algorithm ($t5 - t2$ and $cc3 = t5 - t3$) can be detected as early as day 2 of development, avoiding the need to culture to the blastocyst stage to make a combined decision (morphology + kinetic markers associated with normal chromosomal content). Additionally, the algorithm here proposed is related to blastocyst formation and strengthens the relation of our findings to those reported by Campbell et al. but with a larger sample size. This aspect is a great advantage over Campbell et al.'s model because it can be applied not only to patients undergoing blastocyst transfer but also to those undergoing transfers on day 3 of development, a common situation in many IVF clinics. In addition, and considering

again that the variables can be detected as early as day 2 (before embryo biopsy on day 3), our assumption would be that this algorithm could be applied regardless of the day of biopsy (day 3 vs. day 5), although we do not have data to support it. Another difference is that in Campbell et al.'s study, embryo biopsy was performed on day 5. In our study, we performed embryo biopsy of a single blastomere on day 3 with the existing probability of mosaicism that may bias the results of the study. However, in our program, confirmation rates on embryos biopsied on day 3, diagnosed as abnormal and rebiopsied on day 5, are similar to those biopsied directly on day 5, diagnosed as abnormal and rebiopsied on day 5, with results close to 97% (23).

High levels of in vitro-generated human embryos are chromosomally abnormal (33, 34), which constitutes one of the most common causes of IVF failure. This problem justifies the use of PGS and, if PGS is not possible, the use of time-lapse imaging to increase the probability of selecting chromosomally normal embryos. Moreover, embryo selection through time-lapse imaging is a noninvasive approach that can be applied not only to patients at risk of having chromosomally abnormal embryos but also to young patients, especially considering the high percentage of aneuploid oocytes and embryos reported in young donors (27) and good-prognosis patients (21). The observed discordance between ploidy status and morphology stresses the point that, without the extra information gained from PGS, we allow the transfer of morphologically normal, but still reproductively incompetent, embryos.

The selection of embryos through time-lapse technology should not be considered as a replacement for PGS. However, it does represent an excellent selection tool for good-prognosis patients who are not indicated for PGS or for patients who are indicated for PGS (history of implantation failure or early pregnancy loss) but who for any legal, social, or economic reasons do not wish or cannot have PGS performed. In these situations, a clear benefit is gained with morphokinetic screening and selection using the algorithm. In regards to cost, we must acknowledge that time-lapse technology currently involves expensive equipment and, in the short term, the cost differences between PGS and time-lapse are minimal. In the near future, we expect a reduced cost for PGS owing to the introduction of quantitative polymerase chain reaction, as well as less expensive time-lapse equipment owing to the existing competition between different brands.

Finally, careful assessment should be performed before generalizing the use of time-dependent variables and algorithms for selecting embryos in different clinical settings. Embryo development is a dynamic process that can be affected by several extrinsic and intrinsic factors (12–15). At this point, several algorithms are available for the clinical selection of embryos for transfer (7, 30, 35). Here we provide a new alternative that needs to be compared clinically in prospective studies in which all the alternatives are validated and their utility proven. This work is underway.

Acknowledgments: The authors thank María Cruz and the entire IVF and PGD team for their enthusiasm and support.

REFERENCES

1. Van Steirteghem A, Nagy Z, Liu J, Joris H, Verheyen G, Smits J, et al. Intracytoplasmic sperm injection. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol* 1994;8:85–93.
2. Palermo GD, Cohen J, Alikani M, Adler A, Rosenwaks Z. Intracytoplasmic sperm injection: a novel treatment for all forms of male factor infertility. *Fertil Steril* 1995;63:1231–40.
3. Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, Delhanty JD, Winston RM, Tuddenham EG. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989;1:347–9.
4. Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, Bhattacharya S, Castilla JA, Korsak V, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2012;27:2571–84.
5. Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;86:1608–15.
6. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:237–49.
7. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;1–14.
8. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012;98:1481–9.
9. Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:569–73.
10. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grondahl ML, Kesmodel US, Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:565–72.
11. Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, et al. Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:93–6.
12. Basile N, Morbeck D, Garcia-Velasco J, Bronet F, Meseguer M. Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Hum Reprod* 2013;28:634–41.
13. 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;29:891–900.
14. Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L, Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013;28:794–800.
15. Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012;25:382–9.
16. Munne S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J, Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004;24:638–43.
17. Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007;14:628–34.
18. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 2009;15:577–83.
19. Kuliev A, Cieslak J, Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:193–8.
20. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007;87:534–41.
21. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24.
22. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 2002;17:233–46.
23. Garcia-Velasco JA, Bermejo A, Ruiz F, Martinez-Salazar J, Requena A, Pellicer A. Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist protocol vs the long protocol: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril* 2011;96:590–3.
24. Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendia P, Mateu E, Milan-Sanchez M, et al. False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:143–9.
25. Magli MC, Gianaroli L, Munne S, Ferraretti AP. Incidence of chromosomal abnormalities from a morphologically normal cohort of embryos in poor-prognosis patients. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:297–301.
26. Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382–91.
27. Munne S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* 2006;12:234–53.
28. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011;95:520–4.
29. Davies S, Christopikou D, Tsova E, Karagianni A, Handyside AH, Mastrominas M. Delayed cleavage division and a prolonged transition between 2- and 4-cell stages in embryos identified as aneuploidy at the 8-cell stage by array-CGH. *Hum Reprod* 2012;27:ii84–6.
30. Chavez SL, Loewke KE, Han J, Moussavi F, Colls P, Munne S, et al. Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nat Commun* 2012;3:1251.
31. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013;26:477–85.
32. Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Thornton S. Retrospective analysis of outcomes after IVF using an aneuploidy risk model derived from time-lapse imaging without PGS. *Reprod Biomed Online* 2013;27:140–6.
33. Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000;1:17–26.
34. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C, Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002;4(Suppl 3):31–6.
35. Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115–21.

SUPPLEMENTAL TABLE 1

Mean times for the different variables according to chromosomal normality.

Variable	Chromosomal status	n	Mean	95% CI		Minimum	Maximum	P value
				Lower limit	Upper limit			
2PN	Normal	143	8.8	8.5	9.1	5.9	14.1	.353
	Abnormal	361	9.0	8.7	9.3	3.8	23.3	
PNF	Normal	143	24.0	23.2	24.8	16.7	63.5	.368
	Abnormal	361	24.5	24.0	25.1	17.0	70.6	
t2 (hours)	Normal	143	26.4	25.9	26.8	20.4	41.7	.118
	Abnormal	361	26.8	26.5	27.2	19.3	41.6	
t3 (hours)	Normal	143	37.9	37.3	38.6	26.8	47.5	.139
	Abnormal	361	37.2	36.7	37.7	23.0	49.5	
t4 (hours)	Normal	143	39.9	39.2	40.6	27.1	54.7	.567
	Abnormal	361	39.6	39.1	40.1	23.0	59.1	
t5 (hours)	Normal	143	51.8	50.8	52.8	27.1	70.6	.001
	Abnormal	361	49.4	48.6	50.2	26.0	72.7	
cc2 (hours)	Normal	143	11.5	11.1	12.0	0.0	17.3	.004
	Abnormal	361	10.4	9.9	10.8	0.0	18.4	
cc3 (hours)	Normal	143	14.0	13.2	14.8	0.0	35.9	.002
	Abnormal	361	12.2	11.5	12.8	0.0	33.8	
t5 – t2 (hours)	Normal	143	25.5	24.6	26.4	1.0	47.9	.000
	Abnormal	361	22.6	21.8	23.3	0.0	45.4	

Note: 2PN = time of pronuclear appearance; PNF = time of pnf; t2 = time to 2 cells; t3 = time to 3 cells; t4 = time to 4 cells; t5 = time to 5 cells; cc2 = t3 – t2; cc3 = t5 – t3.

Basile. Embryo kinetics and chromosomal content. Fertil Steril 2014.

CAPÍTULO V.
CONCLUSIONES

La presente tesis que estudia el efecto de los diferentes factores intrínsecos y extrínsecos en la morfocinética embrionaria nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- La utilización de medios de cultivo secuenciales o de único uso en nuestro laboratorio no afecta a la cinética embrionaria ni a su dinámica morfológica. Esto nos permite utilizar los marcadores morfocinéticos desarrollados por nuestro grupo independientemente del medio de cultivo que hayamos utilizado.

- Este estudio mediante morfocinética representa un nuevo modelo de control de calidad para la implementación de nuevos medios de cultivo ya que utiliza una monitorización continua del desarrollo embrionario y no la microscopía estática convencional.

- El contenido cromosómico de los embriones afecta al comportamiento morfocinético de los mismos.

- Debido a estas diferencias hemos desarrollado un algoritmo de clasificación embrionaria basado en un árbol de decisión que permite clasificar los embriones en 4 categorías en función de su probabilidad de ser cromosómicamente normal.

- El algoritmo morfocinético de aneuploidías constituye una nueva herramienta diagnóstica para aquellas pacientes sin indicación de DGP por alto riesgo de aneuploidías o para aquellas pacientes que sí están indicadas para DGP pero que por motivos sociales, económicos y/o legales no pueden acceder a ello.

CAPÍTULO VI.
BIBLIOGRAFÍA

- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutierrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG and Wells D. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 2011;95:520-524.
- Azzarello A, Hoest T and Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Hum Reprod* 2012;27:2649-2657.
- Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK and Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;86:1608-1615.
- Bellver J, Mifsud A, Grau N, Privitera L and Meseguer M. Similar morphokinetic patterns in embryos derived from obese and normoweight infertile women: a time-lapse study. *Hum Reprod* 2013;28:794-800.
- Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M and Hickman CF. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online* 2013;26:477-485.
- Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C and Guglielmino A. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:703-710.
- Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B and Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:891-900.
- Cole RJ. Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morphol* 1967;17:481-490.

- Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martinez M, Perez-Cano I, Munoz M and Meseguer M. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:569-573.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M and Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012;25:371-381.
- Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R and Fadini R. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online* 2012;25:474-480.
- Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani S and Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;16:749-756.
- Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A and Simon C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008;23:1993-2000.
- Dumollard R, Duchen M and Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;77:21-49.
- Freour T, Dessolle L, Lammers J, Lattes S and Barriere P. Comparison of embryo morphokinetics after in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection in smoking and nonsmoking women. *Fertil Steril* 2013;99:1944-1950.
- Garcia-Velasco JA, Bermejo A, Ruiz F, Martinez-Salazar J, Requena A and Pellicer A. Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist

- protocol vs the long protocol: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril* 2011;96:590-593.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Tabanelli C, Trombetta C and Boudjema E. The role of preimplantation diagnosis for aneuploidies. *Reprod Biomed Online* 2002;4 Suppl 3:31-36.
- Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A and Sirard MA. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008;23:1118-1127.
- Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT and Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2004;71:1108-1119.
- Hashimoto S, Kato N, Saeki K and Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril* 2012;97:332-337.
- Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ and Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002;17:999-1005.
- Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:21.
- Kaser DJ and Racowsky C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod Update* 2014;20:617-631.

- Katz-Jaffe MG and Gardner DK. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception?. *Reprod Biomed Online* 2008;17:497-501.
- Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Grondahl ML, Kesmodel US and Ingerslev HJ. A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:565-572.
- Kuliev A, Cieslak J and Verlinsky Y. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human oocytes. *Cytogenet Genome Res* 2005;111:193-198.
- Lemmen JG, Agerholm I and Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;17:385-391.
- Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yauger BJ and Larsen FW. Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2008;90:2138-2143.
- Lunenfeld B, Van Steirteghem A and Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update* 2004;10:317-326.
- Macklon NS, Stouffer RL, Giudice LC and Fauser BC. The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocr Rev* 2006;27:170-207.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A and Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007;87:534-541.

- Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M and Munne S. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000;1:17-26.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N and Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;1-14.
- Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J and Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril* 2012:.
- Mio Y and Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199:660.e1-660.e5.
- Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendia P, Mateu E, Milan-Sanchez M, Peinado V, Pellicer A, Remohi J, Simon C *et al.* False positive rate of an arrayCGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:143-149.
- Montag M, Liebenthron J and Koster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development?. *Placenta* 2011;32 Suppl 3:S252-6.
- Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J and Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;64:382-391.
- Munne S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M *et al.* Maternal age, morphology, development and

chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod Biomed Online* 2007;14:628-634.

Munne S, Sandalinas M, Magli C, Gianaroli L, Cohen J and Warburton D. Increased rate of aneuploid embryos in young women with previous aneuploid conceptions. *Prenat Diagn* 2004;24:638-643.

Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I and Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012;25:382-389.

Nakahara T, Iwase A, Goto M, Harata T, Suzuki M, Ienaga M, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Kikkawa F *et al.* Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:93-96.

Ottosen LD, Hindkjaer J and Ingerslev J. Light exposure of the ovum and preimplantation embryo during ART procedures. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:99-103.

Overström EW. In vitro assessment of blastocyst differentiation. In New York, USA: Plenum Press, (ed) The mammalian preimplantation embryo. 1987, pp. 95-116.

Palermo G, Joris H, Devroey P and Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-18.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Baroni E and Greco E. Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* 2005;10:669-681.

- Rubio I, Galan A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J and Meseguer M. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril* 2014:.
- Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escriba MJ, Bellver J and Meseguer M. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertil Steril* 2012:.
- Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N and Meseguer M. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril* 2011;96:618-623.e2.
- Wong C, Chen AA, Behr B and Shen S. Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. *Reprod Biomed Online* 2013;26:120-129.
- Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM and Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;28:1115-1121.
- World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. *WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10* 2001:.

