



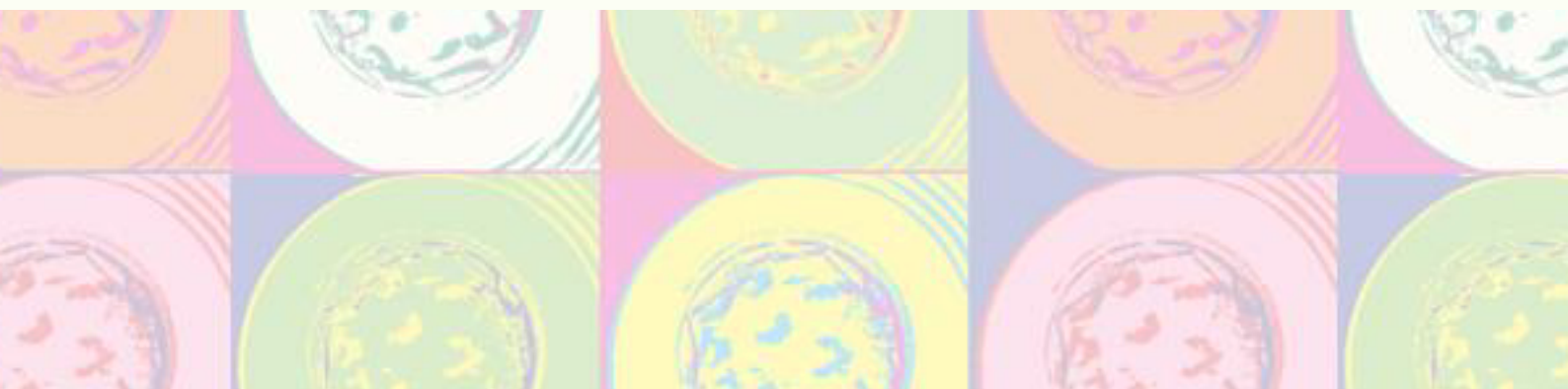
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**L'ÚS DEL *TIME-LAPSE* COM A EINA DE RECERCA
EN L'ESTUDI DEL DESENVOLUPAMENT
EMBRIONARI PREIMPLANTACIONAL**



Meritxell Martínez Garcia

**Memòria presentada per optar al Grau de Doctor en Biologia Cel·lular
per la Universitat Autònoma de Barcelona.**

Bellaterra 2020

Directors:

Dr. Josep Santaló Pedro i Dra. Rita Vassena



El **Dr. Josep Santaló Pedro**, catedràtic del departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

I la **Dra. Rita Vassena**, Directora Científica del grup Eugin,

Certifiquen:

Que **Meritxell Martínez Garcia** ha realitzat sota la seva direcció el treball de d'investigació que s'exposa en la memòria titulada "**L'ús del *time-lapse* com a eina de recerca en l'estudi del desenvolupament embrionari preimplantacional**" per optar al Grau de Doctora per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Que aquest treball s'ha dut a terme a la Clínica Eugin Barcelona.

I per tal que així consti, firmen el present certificat.

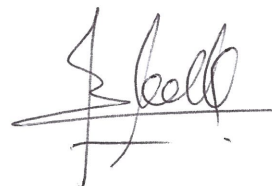
Barcelona, Setembre de 2020.



Dr. Josep Santaló Pedro



Dra. Rita Vassena



Meritxell Martínez Garcia

Als meus fills, l'Adrià i la Marina

A l'Albert

Als meus pares, l'Eladi i la Lola

“Són temps difícils pels somiadors”

Amélie Poulain

ÍNDEX

RESUM	13
SUMMARY	15
ABREVIATURES I ACRÒNIMS.....	17
INTRODUCCIÓ.....	21
1 DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI PREIMPLANTACIONAL AL LABORATORI DE FECUNDACIÓ <i>IN VITRO</i>	23
1.1 FECUNDACIÓ.....	24
1.2 DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DES DE ZIGOT FINS A MÒRULA.....	28
1.2.1 <i>Aspectes cel·lulars del desenvolupament embrionari des de zigot fins a mòrula.....</i>	<i>28</i>
1.2.2 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 0.....</i>	<i>29</i>
1.2.3 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 1.....</i>	<i>30</i>
1.2.4 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 2.....</i>	<i>31</i>
1.2.5 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 3.....</i>	<i>32</i>
1.3 DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DES DE MÒRULA FINS A BLASTOCIST	33
1.3.1 <i>Aspectes cel·lulars del desenvolupament embrionari des de mòrula fins a blastocist</i>	<i>33</i>
1.3.2 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 4.....</i>	<i>34</i>
1.3.3 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 5.....</i>	<i>35</i>
1.3.4 <i>Observacions del desenvolupament embrionari a dia 6.....</i>	<i>36</i>
2 MÈTODES DE SEGUIMENT I AVALUACIÓ DEL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI PREIMPLANTACIONAL AL LABORATORI DE FECUNDACIÓ <i>IN VITRO</i>	37

2.1	AVALUACIÓ MORFOLÒGICA DEL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI PREIMPLANTACIONAL.....	37
2.1.1	<i>Paràmetres d'avaluació de la morfologia embrionària.....</i>	<i>38</i>
2.1.1.1	Paràmetres d'avaluació morfològica a dia 0 i a dia 1.....	39
2.1.1.2	Paràmetres d'avaluació morfològica a dia 2 i a dia 3.....	40
2.1.1.3	Paràmetres d'avaluació morfològica a dia 4, a dia 5 i a dia 6.....	42
2.1.2	<i>Escales d'avaluació morfològica en estadi cel·lular i de blastocist.....</i>	<i>44</i>
2.1.2.1	Escala d'avaluació morfològica ASEBIR per a embrions en estadi cel·lular.....	44
2.1.2.2	Escala d'avaluació morfològica de Coroleu i col·laboradors per a embrions en estadi cel·lular.....	47
2.1.2.3	Escala d'avaluació morfològica de Gardner per a embrions en estadi de blastocist.....	49
2.1.3	<i>Aplicacions, avantatges i limitacions de l'avaluació morfològica del desenvolupament embrionari preimplantacional.....</i>	<i>51</i>
2.1.3.1	Aplicacions de l'avaluació morfològica en la pràctica clínica.....	51
2.1.3.2	Avantatges i limitacions.....	51
2.2	AVALUACIÓ MORFOCINÈTICA DEL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI PREIMPLANTACIONAL AMB SISTEMES <i>TIME-LAPSE</i>	53
2.2.1	<i>Dispositius Time-lapse destacats per a l'avaluació de la morfocinètica embrionària.....</i>	<i>53</i>
2.2.1.1	Eeva® (Merck).	53
2.2.1.2	Geri® (Merck).....	54
2.2.1.3	Primo Vision® (Vitrolife).....	54
2.2.1.4	Embryoscope® i Embryoscope plus® (Vitrolife).....	55

2.2.2	<i>Paràmetres d'avaluació de la morfocinètica embrionària</i>	55
2.2.2.1	Paràmetres morfocinètics d'avaluació a dia 0 i a dia 1	56
2.2.2.2	Paràmetres morfocinètics d'avaluació a dia 2 i a dia 3	58
2.2.2.3	Paràmetres morfocinètics qualitius: simetria de divisió i divisions anòmales	60
2.2.2.4	Paràmetres morfocinètics d'avaluació a dia 4, a dia 5, i a dia 6	61
2.2.3	<i>Tipus d'algoritmes i models d'avaluació de la morfocinètica embrionària</i>	62
2.2.3.1	Models predictius de formació de blastocist: model de Wong	64
2.2.3.2	Models predictius d'aneuploidies: model de Campbell	65
2.2.3.3	Models predictius d'implantació: algoritme de Meseguer i algoritme KidScore.....	66
2.2.4	<i>Discussió i revisió bibliogràfica d'algoritmes i paràmetres morfocinètics</i>	68
2.2.4.1	Aplicabilitat clínica dels algoritmes i models morfocinètics	68
2.2.4.2	Primers algoritmes i models predictius d'implantació i embaràs.....	70
2.2.4.3	Valoració de la utilitat real d'analitzar la morfocinètica embrionària per predir la probabilitat d'implantació	74
2.2.4.4	Transferència i reproductibilitat d'algoritmes morfocinètics i efecte de variables externes sobre el patró morfocinètic del desenvolupament embrionari	76
2.2.4.5	Discussió sobre la rellevància dels paràmetres morfocinètics	79
2.2.4.6	Conclusions	81
2.2.5	<i>Aplicacions, avantatges i limitacions de l'avaluació de la morfocinètica embrionària en clínica</i>	83
2.2.5.1	Aplicacions actuals de time-lapse en la pràctica clínica	83

2.2.5.2	Avantatges i limitacions del time-lapse en la pràctica clínica.....	84
2.2.6	<i>Aplicacions de l'avaluació de la morfocinètica embrionària en recerca clínica i bàsica.....</i>	<i>88</i>
	OBJECTIUS.....	91
	RESULTATS.....	95
1	ALTA FIABILITAT DE LES ANOTACIONS PRESES ENTRE DIFERENTS EMBRIÒLEGS	97
2	LA VITRIFICACIÓ D'OÒCITS NO AFECTA ALS TEMPS PRIMERENCOS DEL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI DESPRÉS D'ICSI EN PACIENTS DE MENYS DE 30 ANYS.....	121
3	EFFECTE DE L'ACTIVACIÓ OOCITÀRIA ASSISTIDA SOBRE EL PATRÓ MORFOCINÈTIC DELS EMBRIONS DERIVATS.....	139
	DISCUSSIÓ	161
1	UNA NOVA PERSPECTIVA	163
2	REPRODUCTIBILITAT I FIABILITAT D'UNA NOVA EINA D'AVALUACIÓ.....	165
3	TIME-LAPSE COM A EINA DE RECERCA.....	167
4	EL FUTUR DEL TIME-LAPSE: ENTRANT EN L'ERA DE LA INTEL·LIGÈNCIA ARTIFICIAL.....	171
	CONCLUSIONS	173
	BIBLIOGRAFIA.....	177
	AGRAÏMENTS.....	203

RESUM

L'estudi de la morfologia embrionària usant mètodes convencionals de microscòpia, ha estat històricament l'eina utilitzada pels embriòlegs per estudiar la viabilitat dels embrions. Ara, aquesta disciplina es suma als nous mètodes d'avaluació aportats pels sistemes *time-lapse* que s'han incorporat recentment als laboratoris de fecundació *in vitro* (FIV) de tot el món.

Cada cop està més estandarditzat l'ús del *time-lapse* com a mètode d'avaluació i selecció embrionària conjuntament amb l'avaluació morfològica convencional, però més enllà del seu ús clínic, aquesta nova tecnologia aporta una nova perspectiva dels embrions en cultiu que obre un ventall de possibilitats a l'hora d'estudiar el desenvolupament embrionari preimplantacional, el coneixement del qual és fonamental per assolir l'èxit en els cicles de FIV.

En aquest context, la present tesi doctoral ha volgut aprofundir en l'avaluació dels embrions des del punt de vista morfofocinètic amb l'objectiu d'ampliar els coneixements sobre el desenvolupament embrionari preimplantacional, sempre prenent com a referència l'avaluació morfològica.

Per a valorar la fiabilitat d'aquestes avaluacions basades només en la morfologia embrionària, existeixen estudis que evidencien la fiabilitat de les avaluacions morfològiques realitzades entre diferents embriòlegs. En la mateixa direcció i amb l'objectiu de demostrar la fiabilitat de les mesures preses amb els sistemes *time-lapse*, així com de donar solidesa als dos treballs següents, aquesta tesi doctoral inclou un primer estudi sobre la concordança entre les mesures preses amb els sistemes *time-lapse* per diferents observadors. En aquest treball es conclou que l'ús de la tecnologia *time-lapse* és fiable a l'hora de valorar el patró morfofocinètic dels embrions en desenvolupament, així com que aquesta fiabilitat és extensible i independent del grau de formació o experiència dels embriòlegs, exceptuant la valoració de tPB2 que és fiable només si la duu a terme un sol observador (concordança intra-observador).

Per altra banda, donada l'evidència científica que afirma que els primers temps de divisió cel·lular estan relacionats amb la viabilitat embrionària, en la present tesi doctoral s'inclou un segon estudi en el qual s'ha usat la tecnologia *time-lapse* per avaluar com afecta la vitrificació d'òocits al patró morfocinètic dels embrions resultants i per tant sobre llur qualitat i viabilitat. En ell es conclou que la vitrificació d'òocits no afecta al patró morfocinètic dels embrions en desenvolupament fins a dia 3.

Finalment la present tesi doctoral inclou un tercer treball on amb el mateix objectiu que l'anterior s'ha utilitzat la tecnologia *time-lapse* per avaluar com afecta l'activació oocitària assistida (AOA) sobre la morfocinètica dels embrions i per tant sobre la seva viabilitat. En ell es conclou que l'aplicació de AOA accelera el desbloqueig meiòtic i l'extrusió del segon corpuscle polar però que, exceptuant les mesures de tPB2 i t3, el patró morfocinètic dels embrions derivats de cicles d'ICSI amb AOA no es mostra significativament diferent al dels embrions procedents de cicles ICSI sense AOA, estant això en concordança amb els resultats reproductius, els quals només mostren diferències significatives en comparar la taxa de fecundació entre les dues cohorts estudiades.

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi mostren com l'ús de la tecnologia *time-lapse* al laboratori de FIV, no només és útil per a realitzar avaluacions embrionàries a nivell clínic, sinó que també és una tecnologia fiable i útil per aprofundir en l'estudi de diferents aspectes del desenvolupament embrionari preimplantacional.

SUMMARY

The study of embryonic morphology using conventional methods of microscopy has historically been the tool used by embryologists to study the viability of embryos. Now, this discipline is being added to the new assessment methods provided by *time-lapse* systems that have recently been incorporated into *in vitro* fertilization (IVF) laboratories around the world.

The use of *time-lapse* as a method of embryo evaluation and selection in conjunction with conventional morphological evaluation is increasingly standardized, but beyond its clinical use, this new technology provides a new perspective on the embryos in culture, which opens a range of possibilities while studying the preimplantation embryonic development, the knowledge of which is fundamental to achieving success in IVF cycles.

In this context, the present doctoral thesis has sought to deepen the evaluation of embryos from a morphokinetic point of view with the aim of expanding knowledge on preimplantation embryonic development, always taking as a reference the morphological evaluation.

To assess the reliability of these assessments, based only on embryonic morphology, existing studies demonstrate the reliability of morphological assessments performed among different embryologists. In the same direction and with the aim of demonstrating the reliability of the measures taken with *time-lapse* systems, as well as giving solidity to the next two works, this doctoral thesis includes a first study on the concordance between the measures taken with *time-lapse* systems by different observers. This thesis concludes that the use of *time-lapse* technology is reliable in assessing the morphokinetic pattern of embryos in development, as well as that this reliability is extensible and independent of the degree of training or experience of embryologists, except for the assessment of tPB2 which is reliable only if it is carried out by a single observer (intra-observer agreement).

On the other hand, given the scientific evidence that states that the first times of cell division are related to embryonic viability, this doctoral thesis includes a second study in which *time-lapse* technology has been used to evaluate how oocyte vitrification affects the morphokinetic pattern of the resulting embryos and therefore on their quality and viability. It concludes that oocyte vitrification does not affect the morphokinetic pattern of developing embryos until day 3.

Finally, the present doctoral thesis includes a third study where, with the same objective as the previous, *time-lapse* technology has been used to evaluate how assisted oocyte activation (AOA) affects on the morphokinetics of embryos and therefore on their viability. It concludes that the application of AOA accelerates meiotic unblocking and extrusion of the second polar corpuscle but that, except for tPB2 and t3 measurements, the morphokinetic pattern of embryos derived from ICSI cycles with AOA is not significantly shown different from the one of embryos from ICSI cycles without AOA, this being in agreement with the reproductive results, which only show significant differences when comparing the fertilization rate between the two cohorts studied.

Taken together, the results of this thesis show how the use of *time-lapse* technology in the IVF laboratory is not only useful for conducting embryonic evaluations on a clinical level, but is also a reliable and instrumental technology for deepening the study of different aspects of preimplantation embryonic development.

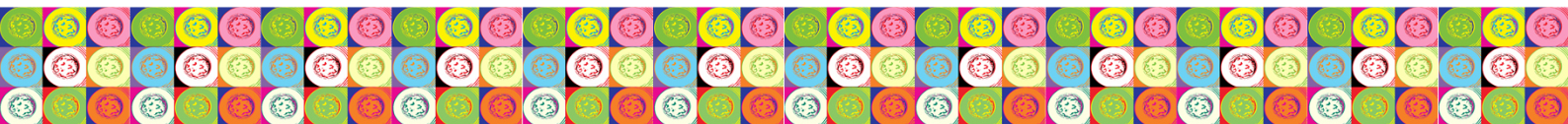
ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AOA	Activació oocitària assistida
ADN	Àcid desoxiribonucleic
APC	Complex promotor de l'anafase
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ASEBIR	Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción
ASRM	American Society for Reproductive Medicine
CaMKII	Calci calmodulina quinasa II
CC2	Duració del 2n cicle cel·lular (temps que passa entre t2 i t3)
CC3	Duració del 3r cicle cel·lular (temps que passa entre t3 i t5)
CCI	Coeficient de correlació intraclasse
CICR	Calcium induced calcium release
CP	Corpuscle polar
DA	Divisions abruptes
DAG	Diacilglicerol
DI	Divisions inverses
EGA	Embryonic genome activation
eSET	Elective single embryo transfer
ESHRE	European Society of Human Reproduction and Embryology
FIV	Fecundació <i>in vitro</i>

hpi	Hores post inseminació
IA	Intel·ligència artificial
ICM	Massa cel·lular interna
ICSI	Microinjecció espermàtica
IP2	Fosfatidilinositol 4,4-bifosfat
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfat
KID	known implantation data
MAPK	Proteïna quinasa activada per mitògens
MPF	Factor promotor de la maduració
MII	Metafase II
NF	No fecundat
PLC ζ	Sperm specific Phosfolipasa C Z. O Fosfolipasa C ζ
PN	Pronuclis
RHA	Reproducció humana assistida
RIP3	Receptors específics d'inositol 1,4,5-trifosfat
S2	Sincronia entre divisions t3 i t4 (temps que passa entre t3 i t4)
S3	Sincronia entre divisions del 3er cicle cel·lular (temps que passa entre t5 i t8)
SHO	Síndrome d'hiperestimulació ovàrica
SOC	Store operated Ca^{2+} channels
t2	Temps d'inici de la primera divisió cel·lular de 1 a 2 cèl·lules

t3	Temps d'inici de la segona divisió cel·lular de 2 a 3 cèl·lules
t4	Temps d'inici de la tercera divisió cel·lular de 3 a 4 cèl·lules
t5	Temps d'inici de la quarta divisió cel·lular de 4 a 5 cèl·lules
t6	Temps d'inici de la cinquena divisió cel·lular de 5 a 6 cèl·lules
t7	Temps d'inici de la sisena divisió cel·lular de 6 a 7 cèl·lules
t8	Temps d'inici de la setena divisió cel·lular de 7 a 8 cèl·lules
tB	Temps d'arribada a blastocist complet, just a abans d'afinar-se la zona pel·lúcida
tC	Inici de compactació
TGP	Test genètic preimplantacional
tPB2	Temps d'extrusió del segon corpuscle polar
tPN	Temps d'aparició dels pronuclis
tPNf	Temps de desaparició dels pronuclis
tSB	Temps d'inici de la cavitació
ZGA	Zygote genome activation
ZP	Zona pel·lúcida

INTRODUCCIÓ



1 Desenvolupament embrionari preimplantacional al laboratori de Fecundació *in Vitro*

El desenvolupament embrionari preimplantacional és el conjunt de processos biològics i bioquímics que tenen lloc a l'embrió des de la fecundació fins a la implantació en l'úter matern. Aquests processos donen lloc a esdeveniments i canvis en l'embrió que, en cas de desenvolupar-se *in vitro*, poden ser observats, estudiats i avaluats.

La *Fecundació In vitro (FIV)* d'embrions humans, permet des de fa més de 40 anys (Steptoe & Edwards, 1978) observar i estudiar aquest desenvolupament preimplantacional des de diferents disciplines com són: la genètica, la metabolòmica, la proteòmica i la morfologia embrionària (Botros et al., 2008; Uyar & Seli, 2014; Yurttas et al., 2010).

A nivell clínic, l'estudi de la morfologia embrionària usant mètodes convencionals de microscòpia, ha permès conèixer quins són els diferents ítems morfològics que ha d'assolir un embrió en cada dia del seu desenvolupament preimplantacional (fig. 1) per ser considerat viable, és a dir, capaç de donar una gestació a terme (Gardner & Lane, 1997; Sakkas et al., 1998; Sakkas & Gardner, 2005).

D'altra banda, la morfocinètica del desenvolupament embrionari, estudia els canvis morfològics que experimenta un embrió al llarg del temps (K. Kirkegaard et al., 2013; Polanski et al., 2014; Wong et al., 2013). Aquests canvis morfològics, ocorren a l'embrió viable seguint patrons temporals determinats, no a l'atzar (Kaser & Racowsky, 2014; Montag et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018). Actualment, l'estudi de la morfocinètica embrionària utilitzant sistemes *time-lapse* de cultiu embrionari, ha permès estudiar més acuradament quins són aquests patrons i establir models morfocinètics predictius de la viabilitat embrionària (Azzarello et al., 2012; Dal Canto et al., 2012; Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010).

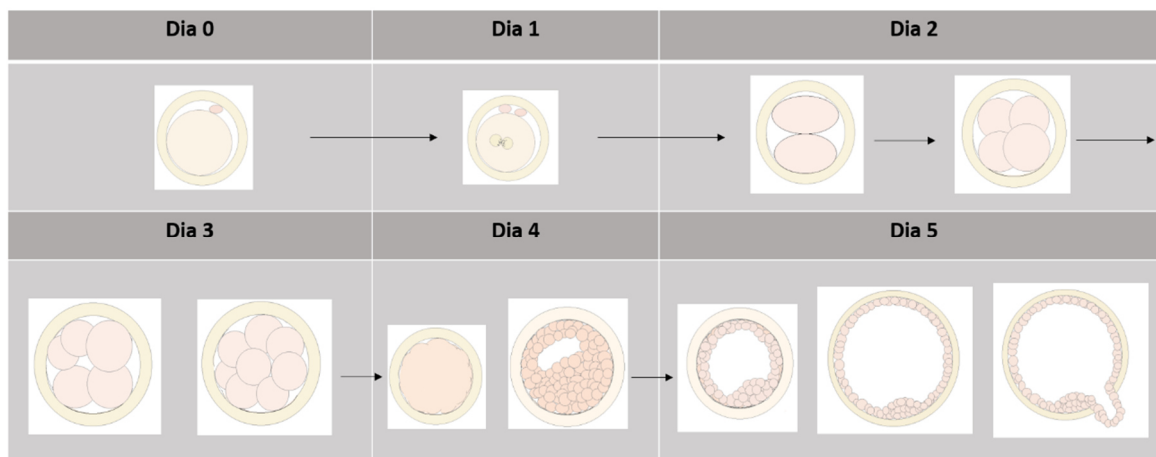


Figura 1: Esquema bàsic del desenvolupament embrionari preimplantacional humà per dies. Es mostra la morfologia embrionària segons el dia de desenvolupament de l'embrió des de dia 0 (inseminació) fins a dia 5 de vida.

Històricament, han quedat definits a nivell morfològic els estats de l'embrió viable en funció del seu dia de desenvolupament (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015). Els processos biològics i bioquímics que experimenta l'embrió durant els primers 6 dies de vida el porten a ésser des d'un zigot unicel·lular a un complex blastocist pluricel·lular preparat per realitzar l'eclosió de la zona pel·lúcida i, posteriorment, la implantació a l'úter matern.

A continuació es mostra una descripció a nivell cel·lular i a nivell morfològic del desenvolupament embrionari preimplantacional, des de la fecundació fins a dia 6 del desenvolupament, amb la descripció dels aspectes moleculars i cel·lulars més rellevants que li ocorren a l'embrió durant aquests primers dies de vida

1.1 Fecundació

El desenvolupament embrionari preimplantacional en humans, igual que en els altres mamífers, comença seguidament de la fecundació, la qual implica la fusió dels gàmetes haploides (l'oòcit i l'espermatozou) per donar lloc al zigot diploide. *In vivo*, la fecundació té lloc a la trompa de fal·lopi, on l'espermatozou penetra a través de les cèl·lules del cúmul

fins a arribar a la zona pel·lúcida (ZP), que és una membrana exterior protectora de l'oòcit formada per glicoproteïnes. En aquesta etapa, l'oòcit madur està aturat en metafase II i preparat per fecundar (Machaca, 2004; Wamaitha & Niakan, 2018).

Un cop l'espermatozou travessa la ZP de l'oòcit, es troba a l'espai perivitel·lí i es produeix l'adherència entre la membrana plasmàtica de la zona equatorial de l'espermatozou i la membrana plasmàtica oocitària, donant posteriorment lloc a la fusió entre ambdues (Olivera et al., 2006). La fusió de les dues membranes plasmàtiques, desencadena vies de senyalització que tenen com a resultat l'augment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular i l'activació del zigot. Aquest augment de Ca^{2+} intervé de manera fonamental en un seguit de processos relacionats amb l'activació de l'oòcit i del zigot.

En l'activació de l'oòcit i del zigot de mamífers, l'augment de Ca^{2+} es presenta com a una sèrie de pics de concentració periòdics anomenats "oscil·lacions de Ca^{2+} " (Stricker, 1999). Aquestes oscil·lacions comencen quan una fosfolipasa C específica de l'espermatozou, la PLC ζ , és alliberada al citosol de l'oòcit en fusionar-s'hi. La PLC ζ es concentra en la regió postacrosòmica del espermatozou, i provoca pics periòdics de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular en l'oòcit en la regió subcortical. L'acció enzimàtica de la PLC ζ catalitza la hidròlisi del factor PIP₂ (fosfatidilinositol 4,4-bisfosfat) en IP₃ (inositol 1,4,5-trifosfat) i DAG (diacilglicerol) (Rice et al., 2000; Malcuit et al., 2006) (Fig. 2). El factor IP₃, intervé en l'alliberament de Ca^{2+} intracel·lular que dona lloc a un augment de la permeabilitat dels canals de K^+ , que són els responsables de les hiperpolaritzacions. El mateix Ca^{2+} propaga aquesta senyal, alliberant més Ca^{2+} del calcisoma del reticle endoplasmàtic (RE) proper, i fent que augmenti encara més la concentració de Ca^{2+} a través d'un mecanisme de CICR (calcium induced calcium release) (Parrington et al., 1998; Rice et al., 2000; Swann & Parrington, 1999).

Quan la concentració de Ca^{2+} supera un llindar, provoca el tancament dels canals dependents d'IP₃ per la fosforilació dels seus receptors (IP₃R) a través de CaMKII, amb el conseqüent bombeig del Ca^{2+} cap al calcisoma (ATPasa del RE) i cap a l'exterior cel·lular. D'aquesta

manera, disminueix la concentració de Ca^{2+} donant lloc a les oscil·lacions. Per tal de mantenir les oscil·lacions, cal una entrada de Ca^{2+} extracel·lular a través de canals SOC (store operated Ca^{2+} channels) els quals detecten el buidat de Ca^{2+} dels reservoris del RE i s'obren per deixar entrar-ne més.

Durant les oscil·lacions, l'augment de la concentració de Ca^{2+} va des de nivells basals de 50-100 nM fins a pics de 600-1000 nM, i en mamífers aquestes oscil·lacions s'estenen com una ona durant varies hores en intervals regulars de 15-30 min, mentre que la PLC ζ es manté activa al citoplasma del zigot.

Un dels primers esdeveniments que provoca l'augment de la concentració de Ca^{2+} , és la reacció cortical, la qual consisteix en l'alliberament dels continguts enzimàtics dels grànuls corticals emmagatzemats a la perifèria citosòlica de l'oòcit, provocant l'enduriment de la ZP per evitar la polispermia (Okabe, 2013). Aquest augment de la concentració de Ca^{2+} , també promou el reclutament de l'ARNm matern. La síntesi de proteïnes durant l'activació oocitària s'origina pel reclutament d'aquests ARNm materns que es troben presents en el citoplasma de l'oòcit. Aquesta font de proteïnes d'origen matern, és vital per a la transició d'oòcit a zigot.

Per altra banda, les oscil·lacions de Ca^{2+} promouen la caiguda de l'activitat de la proteïna quinasa activada amb mitogen (MAPK) que és essencial per a la formació pronuclear (Gonzalez-Garcia, 2014). La MAPK activa, fosforila proteïnes cromosòmiques per a mantenir la cromatina en estat condensat durant la transició de meiosi I a meiosi II, prevenint la formació de l'embolcall nuclear fosforilant les làmines nuclears. Durant l'activació de l'oòcit, l'activitat de la MAPK disminueix al reduir-se l'activitat del MPF, promovent així la formació de l'embolcall nuclear (Moos et al., 1995). Amb la formació dels pronuclis (PN), acaben les oscil·lacions Ca^{2+} , donat que PLC ζ és segrestada a l'interior d'aquests, i els receptors d' IP_3 són desgradats mitjançant la fosforilació per les CaMKII (procés d'ubiquïtinització) (Lee et al., 2006).

La reactivació del cicle meiòtic, també està provocada per les oscil·lacions de Ca^{2+} al citoplasma del zigot. Això es deu a que aquestes oscil·lacions de Ca^{2+} promouen l'activació de CaMKII (calci calmodulina quinasa II), la qual fosforil·la i activa el complex promotor de l'anafase (APC) (Yamamoto et al., 2008). L'activació de l'APC activa la via de degradació de la ciclina B provocant així la disminució de l'activitat del MPF (factor promotor de la maduració), amb la consegüent sortida de la metafase II de l'oòcit i l'entrada a l'anafase II (Malcuit et al., 2006) (fig. 2).

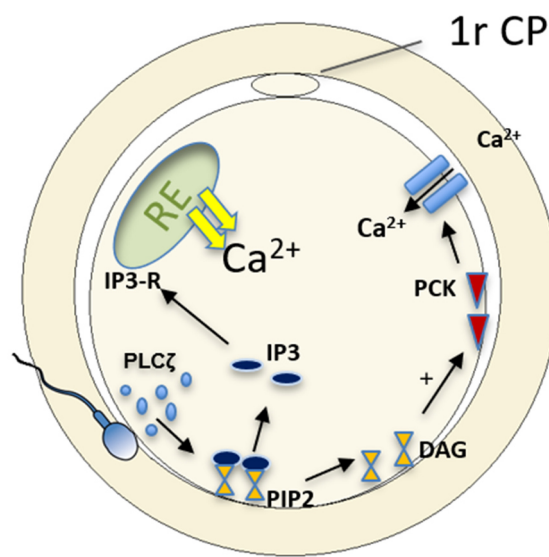


Figura 2. Esquema de factors que intervenen en la fecundació i l'activació oocitària *in vivo* basat en la publicació de Malcuit i col·laboradors al 2006 (Malcuit et al., 2006).

Així doncs, hores després de la fusió entre els gàmetes, i un cop han cessat les oscil·lacions de Ca^{2+} , es dona la reactivació del cicle meiòtic de l'oòcit. En aquest moment té lloc la segregació dels cromosomes, la producció i extrusió del segon corpuscle polar ($2n$ CP), i la formació de pronucli matern (Clift & Schuh, 2013). Per altra banda, en aquest moment el cap de l'espermatozoid comença a descondensar-se donant lloc al pronucli masculí (Scott, 2003). La carrega genètica del espermatozoid, que estava compactada gràcies a les protamines, es reorganitza substituint-se les protamines per histones aportades per l'oòcit, per poder així combinar-se amb la càrrega genètica d'aquest. Durant aquesta etapa el

genoma masculí és activament desmetilat, regulant-ne així la seva expressió gènica, la qual, és en aquest moment, substancialment més activa que en l'òocit. Un cop alineats els pronuclis masculí i femení hi ha un increment transitori de l'activitat MPF, les membranes nuclears es desintegren, es dona la condensació dels cromosomes que es situen a la placa metafàsica, i té lloc la primera divisió mitòtica del desenvolupament embrionari primerenc (Ducibella & Fissore, 2008; Malcuit et al., 2006b; Miao & Williams, 2012; Schultz & Kopf, 1995).

1.2 Desenvolupament embrionari des de zigot fins a mòrula

1.2.1 Aspectes cel·lulars del desenvolupament embrionari des de zigot fins a mòrula

La primera divisió del zigot en humans es produeix aproximadament entre les 20 i 25 hores després de la fecundació i, igual que a tots els mamífers, es dona de manera rotacional (Gulyas, 1975): la primera divisió es dona amb orientació meridional, mentre que en la segona divisió un dels blastòmers divideix meridionalment i l'altre equatorialment. Aquesta sincronia es manté fins que l'embrió té 8 blastòmers, i després es perd de manera natural sense afectar a la viabilitat embrionària.

Durant les primeres divisions mitòtiques del desenvolupament embrionari, el volum citoplasmàtic de les cèl·lules, anomenades en aquest estadi blastòmers, no augmenta, sinó que es segrega en cèl·lules cada cop més petites (Palermo et al., 1999). En aquestes primeres etapes del desenvolupament embrionari, els blastòmers són totipotents (Condic, 2014), i per tant són capaços de donar lloc a un altre embrió o a qualsevol teixit embrionari o extraembrionari. A mida que es succeeixen les divisions embrionàries, es presenta la diferenciació dels blastòmers per donar lloc a teixits específics.

A nivell gènic, l'activació del genoma d'embrions humans es produeix en dues fases. Una primera fase és l'anomenada fase menor o *zygote genome activation* (ZGA), que és la que

es dona just després de la fecundació, quan l'embrió està en estadi de zigot. La segona fase és l'anomenada fase major o *embryonic genome activation* (EGA), que es produeix a continuació de la fase menor.

La ZGA es caracteritza per una transcripció primerenca exclusivament del genoma patern (pronucli masculí) que té lloc gràcies a les seves característiques epigenètiques. Aquesta activitat transcripcional és decisiva per a que es produeixi correctament la transició d'oòcit a embrió, i en ella s'expressen gens que proporcionen un mecanisme per remodelar la cromatina en una estructura madura que suportarà posteriorment l'expressió dels gens necessaris per l'EGA (Abe et al., 2018; Chen & Zhang, 2019).

L'activació del genoma embrionari (EGA) es produeix posteriorment a la ZGA i juntament a una degradació activa dels ARNm materns emmagatzemats a l'oòcit, que ja han servit de font proteica durant les primeres hores de desenvolupament embrionari post fecundació (Alizadeh et al., 2005). Les primeres divisions mitòtiques depenen en major part de les proteïnes d'origen matern així com de la traducció d'aquests ARNm materns proporcionats per la maduració del citoplasma de l'oòcit (Krisher, 2004). L'EGA es produeix en petites onades des de l'estat de dues cèl·lules i més notablement a partir del tercer dia de desenvolupament embrionari (Braude et al., 1988; Vassena et al., 2011), quan l'embrió té entre 4 i 8 cèl·lules. Tot i així, aquesta gran onada transcripcional, no depèn tant del nombre de cèl·lules en si, sinó del moment del desenvolupament de l'embrió a nivell maduratiu (Dobson et al., 2004). Després de l'EGA l'embrió, que ja presenta entre 8 i 16 cèl·lules, forma una mòrula i es compacta, trencant la simetria de divisió radial.

1.2.2 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 0

Si observem el desenvolupament embrionari des del punt de vista clínic, els cicles de *Reproducció Humana Assistida (RHA)* s'inicien amb la preparació *in vitro* dels gàmetes (femenins i masculins). Un cop estan preparats els gàmetes es realitza la FIV (fig. 3), que pot ser o bé convencional (inseminació) o bé mitjançant tècniques de microinjecció

espermàtica (ICSI). En ambdós casos el resultat serà el mateix, tot i que els procediments a seguir al laboratori siguin diferents. Si s'assoleix la fecundació *in vitro* i l'embrió és evolutiu, es podran anar veient dia a dia i a través dels sistemes de microscòpia invertida del laboratori de FIV, els canvis a l'embrió que es descriuen a continuació, des de zigot fins a blastocist.

Un cop realitzada la inseminació, i després d'un període de temps aproximat d'entre 4 i 6 hores post inseminació (*hpi*), l'òcit madur que es trobava aturat en estadi de *metafase II* (*MII*), extrusiona el 2n CP a l'espai perivitel·lí com a resultat de la fecundació, finalitzant així la meiosi femenina (Fig. 4) (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; L. et al., 2014; Zsolt P. Nagy et al., 1998).

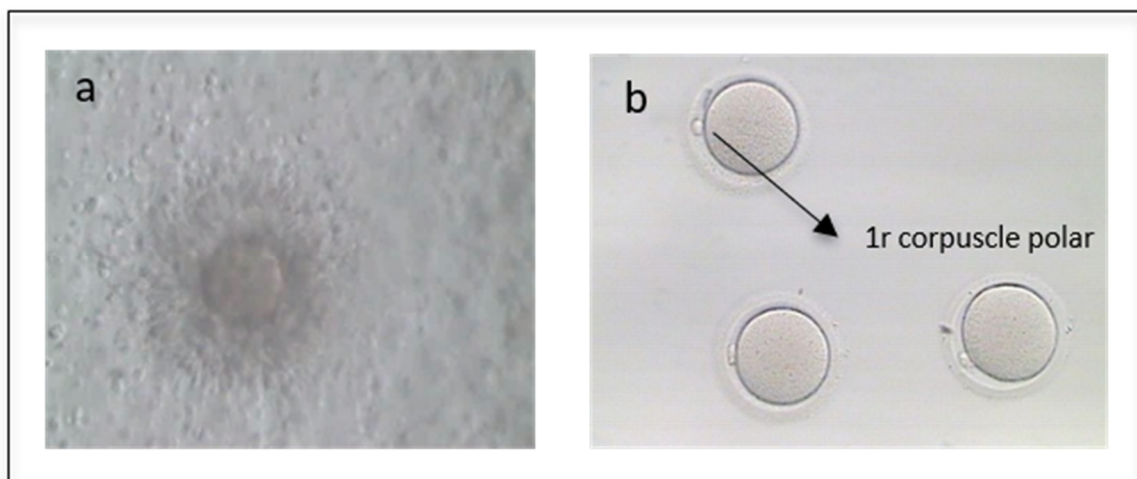


Figura 3: (a) òcit en estat de MII sense denudar que conserva les cèl·lules del cúmul, preparat per FIV convencional. (b) 3 òcits en estat de MII on s'observa el 1er corpuscle polar, denudats i preparats per inseminar amb ICSI.

1.2.3 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 1

A partir de les 8 hpi de desenvolupament embrionari es formen els *pronuclis* (*PN*) masculí i femení, fàcilment visualitzables (fig.4), amb els precursors nucleolars corresponents alineats entre les 16 i les 18 hpi (fig. 3) (Papale et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018).

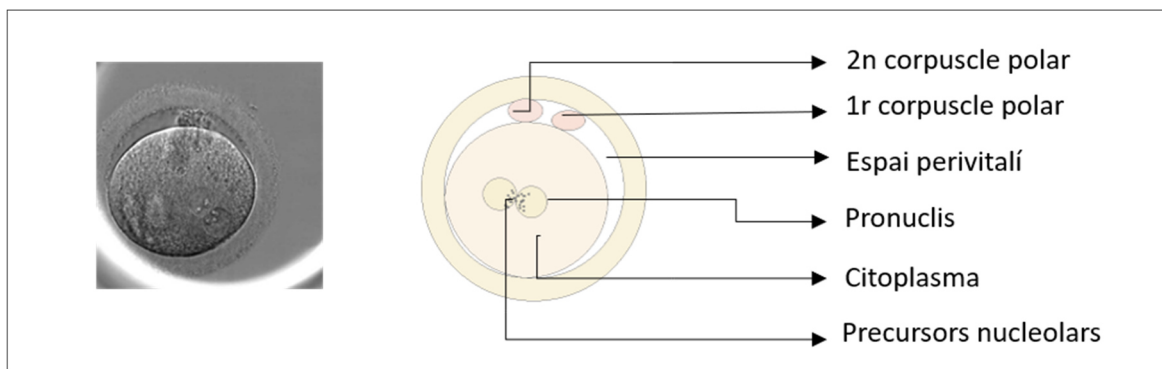


Figura 4. Oòcit fecundat amb visualització de 2 pronuclis (masculí i femení) i visualització de precursors nucleolars encarats.

Seguidament, i a partir de les 20 hpi, s'observen les anomenades ones citoplasmàtiques cada 30 a 50 minuts i els PN femení i masculí desapareixen. En aquest estat del desenvolupament l'embrió rep el nom de zigot.

1.2.4 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 2

Durant el segon dia de desenvolupament embrionari, a partir de les 24 hpi aproximadament, comença la divisió o segmentació embrionària. Com s'ha comentat anteriorment, en aquest procés el zigot es divideix mitòticament, primer en dues cèl·lules genèticament iguals i totipotents (Condic, 2014), els blastòmers. Després cadascuna d'aquestes dues cèl·lules es divideix en dues més, formant així un embrió de tres i quatre blastòmers (fig. 5), i així consecutivament fins assolir l'aspecte de mòrula a dia 3 de desenvolupament embrionari (Prados et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018).

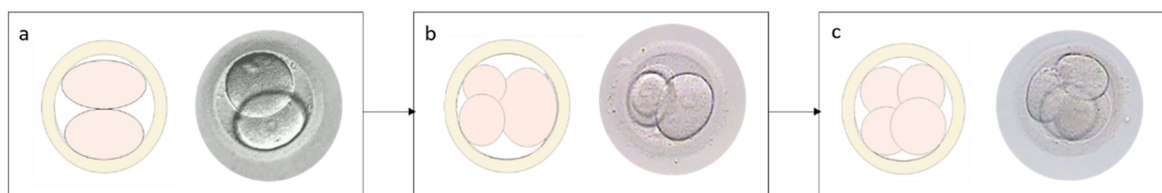


Figura 5: Desenvolupament embrionari esperat en un embrió viable a dia 2 de vida. D'esquerra a dreta, (a) embrió a dues cèl·lules iguals, (b) embrió amb 3 cèl·lules diferents i simetria de divisió correcta i (c) embrió a 4 cèl·lules iguals.

1.2.5 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 3

Al tercer dia de desenvolupament l'embrió, si segueix un patró de desenvolupament correcte, té cada cop més cèl·lules (blastòmers) i aquestes són a cada divisió més petites. En aquest moment és quan l'embrió assoleix l'aspecte de mòrula (entre 8 i 16 cèl·lules) i els blastòmers comencen a diferenciar-se perdent la seva totipotència (Arnold & Robertson, 2009; Rossant & Tam, 2009).

El primer esdeveniment rellevant que ocorre a dia 3 del desenvolupament embrionari, superat normalment el tercer cycle cel·lular, és la compactació. Aquesta s'inicia normalment entre les 60 i les 80 hpi (Prados et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015), i es caracteritza per un augment del contacte entre els blastòmers (cèl·lula-cèl·lula) a mida que es va produint la segmentació (fig. 6a, 6b), fins la formació d'una massa compacta on els límits cel·lulars es tornen pràcticament indistingibles (Pauken & Capco, 1999) (fig. 6c). El fenomen de compactació s'ha arribat a observar en embrions en estadis previs a 8 cèl·lules, però en aquests casos el desenvolupament presentava una tendència a aturar-se (Iwata et al., 2014).

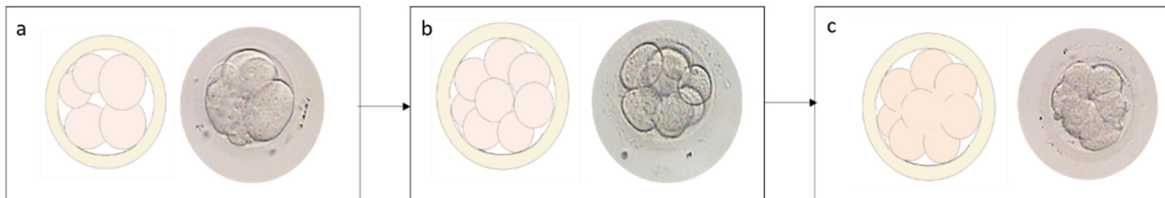


Figura 6. Desenvolupament embrionari esperat en un embrió viable a dia 3 de vida. D'esquerra a dreta, (a) embrió a 5 cèl·lules diferents amb simetria de divisió correcte, (b) embrió a 8 cèl·lules iguals i (c) embrió iniciant el procés de compactació.

1.3 Desenvolupament embrionari des de mòrula fins a blastocist

1.3.1 Aspectes cel·lulars del desenvolupament embrionari des de mòrula fins a blastocist

Entre el dia 4 i el dia 6 de vida, l'embrió finalitza el procés de compactació i comença el fenomen de cavitació que culmina amb la formació del blastocist (Hardarson et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018). Aquest procés cap a l'estadi de blastocist comença quan a l'etapa de mòrula i compactació les divisions cel·lulars es tornen asimètriques donant lloc a cèl·lules interiors i exteriors, que presenten diferents dominis apicals i basolaterals (Wamaitha et al., 2018). Aquesta polaritat apicobasal dels blastòmers, afecta a la seva contractilitat i a la seva tensió superficial de manera individual, fet que provoca la segregació d'aquests com a cèl·lules interiors o exteriors dins de l'embrió.

Així doncs, la diferenciació del trofotoderma i la massa cel·lular interna (ICM) característiques del embrió en estat de blastocist, s'inicia amb l'aparició de la polaritat cel·lular a l'exterior dels blastòmers durant la compactació (Watson et al., 2004). Aquesta polaritat ve donada per les unions adherents entre els blastòmers, que es formen gràcies a molècules com l'E-cadherina, que forma part d'una gran família proteïnes transmembranals Ca^{2+} dependents (Kemler, 1993) i està implicada en la polarització cel·lular a través de connexions mediades per la β -catenina amb el citoesquelet d'actina (Stephenson et al., 2010). Aquestes adhesions cel·lulars no són estàtiques si no que impliquen reordenaments cel·lulars dinàmics (Watson et al., 2004). Aquesta organització cel·lular dins l'embrió té relació amb la diferenciació en dos llinatges cel·lulars. Les cèl·lules que es situïn a l'interior de l'embrió donaran lloc a l'embrioblast, mentre que les cèl·lules que es situïn a l'exterior, prop la zona pel·lúcida, donaran lloc al trofoblast (Arnold & Robertson, 2009; Rossant & Tam, 2009).

Seguidament de l'estat de compactació, amb l'aparició de la polarització cel·lular, té lloc el fenomen de cavitació i la conseqüent formació del blastocel (fig. 7b). Aquest fenomen es

produeix a causa de la creació d'un potencial elèctric, que genera una distribució asimètrica de la Na^+/K^+ ATPasa a la regió basolateral dels blastòmers. Això, acompanyat d'un increment de l'activitat de la Na^+/K^+ ATPasa, provoca un bombeig de Na^+ a l'espai intersticial intraembrionari que genera una pressió osmòtica que provoca l'entrada d'aigua. Finalment, la càrrega positiva del Na^+ es veu neutralitzada per l'entrada de Cl^- i això genera la formació del blastocel (Andrew J. Watson, 1992).

L'augment del volum del blastocel culmina amb l'embrió en estadi de blastocist que ha augmentat notablement la seva mida respecte als primers dies de desenvolupament. En el blastocist es diferencien ja clarament les dues línies cel·lulars, la formada per les cèl·lules de trofotoderma i la formada per les cèl·lules de la ICM. Les cèl·lules del trofotoderma formen el llinatge del trofoblast de la placenta, i la ICM donarà lloc a les cèl·lules a l'endoderma primitiu, que originaran els teixits extraembrionaris, i a les cèl·lules del epiblast que donaran lloc a totes les cèl·lules del futur fetus (Watson et al., 2004).

A nivell gènic, la formació del blastocist està regulada per l'expressió de varies famílies de gens específiques que codifiquen justament aquesta polaritat i les unions entre els blastòmers (Watson et al., 2004). L'E-cadherina i altres proteïnes implicades en el desenvolupament embrionari en aquesta fase com la β -catenina o l'actina citoesquelètica, són proteïnes que s'expressen i emmagatzemen en l'oòcit durant l'oogènesi, i per tant estan presents a l'embrió preimplantacional des de la fecundació (Vestweber et al., 1987).

A nivell clínic, mitjançant microscòpia invertida, aquests processos es poden veure en les observacions de la morfologia embrionària, que es defineixen a continuació.

1.3.2 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 4

Durant el quart dia de desenvolupament embrionari es pot observar com finalitza el procés de compactació (fig. 7a) Les unions intercel·lulars entre blastòmers es reforcen per la perifèria de l'embrió (tocant la zona pel·lúcida) on es formarà el trofoectoderma, i més a

l'interior queden aïllades les cèl·lules que formaran la massa cel·lular interna (ICM) (Arnold & Robertson, 2009; Rossant & Tam, 2009).

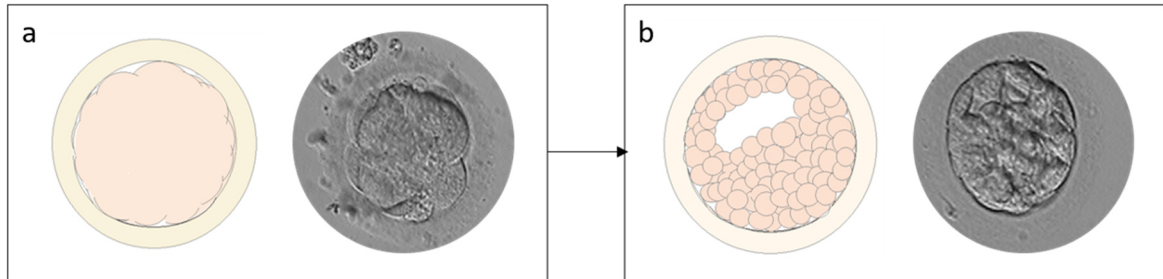


Figura 7. Desenvolupament embrionari esperat en un embrió viable a dia 4 de vida. D'esquerra a dreta, (a) embrió compactat uniformement i (b) embrió cavitant i iniciant la formació del blastocel.

1.3.3 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 5

A dia 5 de desenvolupament l'augment del blastocel, o cavitat blastocèlica (fig. 7b), fa augmentar la mida de l'embrió que s'expandeix al mateix temps que ho fa el blastocel. Les divisions mitòtiques continuen, però ara les cèl·lules ja són incomptables al microscopi invertit. En aquest moment del desenvolupament embrionari les cèl·lules ja es troben diferenciades en *massa cel·lular interna (ICM)* que dona lloc al embrioblast i les cèl·lules que formen el trofoblast tocant la zona pel·lúcida de l'embrió (Arnold & Robertson, 2009; Rossant & Tam, 2009). L'embrió en aquest estadi del desenvolupament és anomenat blastocist (Hardarson et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018).

El blastocist segueix expandint-se i les cèl·lules segueixen dividint-se (fig. 8a, 8b). Això provoca una pressió sobre la zona pel·lúcida que conjuntament a l'acció enzimàtica d'enzims del tipus tripsina fa que aquesta es foradi i comenci l'eclosió de l'embrió (Perona & Wassarman, 1986; Sawada et al., 1990).



Figura 8. Desenvolupament embrionari esperat en un embrió viable a dia 5 de vida. D'esquerra a dreta, blastocist complet, blastocist expandit, i blastocist fent l'eclosió de la zona pel·lúcida.

1.3.4 Observacions del desenvolupament embrionari a dia 6

Durant el dia 6 el blastocist que es desenvolupa amb normalitat, segueix eclosionant fins que eclosiona completament abandonant la zona pel·lúcida (*hatched*) i resta preparat per implantar-se en l'endometri matern, finalitzant així el desenvolupament embrionari preimplantacional (Diedrich et al., 2007; Fatemi & Popovic-Todorovic, 2013; Rashid et al., 2011).

2 Mètodes de seguiment i avaluació del desenvolupament embrionari preimplantacional al laboratori de Fecundació In Vitro

Com hem vist, el desenvolupament embrionari preimplantacional segueix un patró determinat en el temps (Kirkegaard et al., 2012; Polanski et al., 2014; Wong et al., 2010). Aquest patró de desenvolupament ha estat utilitzat com a indicatiu de la qualitat embrionària des dels inicis de les TRAs. Així, es considera com a embrió viable aquell que assoleix dia a dia, els ítems d'avaluació del desenvolupament embrionari establerts pel laboratori de FIV des de l'estat de zigot fins al de blastocist i que, per tant, té elevades probabilitats de donar una gestació a terme (Basak Balaban et al., 2004; Lan et al., 2003; Wittemer et al., 2000; Ziebe et al., 1997).

Com veiem doncs, les avaluacions periòdiques del desenvolupament embrionari preimplantacional serveixen en la pràctica clínica per diferenciar els embrions viables dels no viables, així com per seleccionar els embrions a transferir o criopreservar. Actualment s'utilitzen de manera ordinària al laboratori de FIV, dos mètodes per avaluar la qualitat embrionària: la basada en la morfologia (Balaban et al., 2011; Coroleu et al., 2006; Gardner & Schoolcraft, 1999; Racowsky et al., 2010; Ziebe et al., 1997) i la basada en la morfocinètica (Basile et al., 2015; Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010).

2.1 Avaluació morfològica del desenvolupament embrionari preimplantacional

L'avaluació morfològica de la qualitat embrionària, és l'eina tradicional dels laboratoris de FIV per avaluar, puntuar i classificar les cohorts embrionàries. Es va establir a l'inici de la FIV i és la base també de la valoració morfocinètica.

Aquesta avaluació consisteix en observar al microscopi invertit l'aspecte de l'embrió en desenvolupament i valorar si compleix els ítems establerts sobre el desenvolupament embrionari en cada etapa del cultiu *in vitro* (Racowsky et al., 2010; Ziebe et al., 1997).

Tenint en compte que l'aparició completa dels pronuclis té lloc aproximadament entre les 16 i les 18 hpi (Papale et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015) la inseminació s'acostuma a dur a terme a partir de les 12:00h del dia 0 per poder començar a realitzar les avaluacions morfològiques a primera hora del matí del dia 1 i continuar amb aquestes avaluacions cada 24h fins la transferència embrionària o eventual criopreservació.

Així doncs, segons la literatura, s'estableixen o determinen al laboratori de FIV les hores post inseminació (hpi) a les quals s'han de dur a terme les valoracions de la morfologia embrionària, i en les quals s'espera que un embrió viable hagi assolit els ítems de desenvolupament embrionari (Taula 1) (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015).

Dia	Estadi embrionari esperat	Hores d'observació (hpi)
Dia 1	Zigot	16-18 hpi
Dia 1-2	2 cèl·lules	25-27 hpi
Dia 2	4 cèl·lules	43-45 hpi
Dia 3	7-8 cèl·lules	67-69 hpi
Dia 4	Mòrula	90-94 hpi
Dia 5	Blastocist	114-118 hpi
Dia 6	Blastocist expandit	136-140 hpi

Taula 1. Cinètica esperada del desenvolupament embrionari preimplantacional i hores d'observació de la morfologia embrionària amb mètodes convencional de microscòpia (Hurtado de Mendoza et al., 2015).

2.1.1 Paràmetres d'avaluació de la morfologia embrionària

Per a realitzar l'avaluació de la morfologia embrionària usant el microscopi invertit, caldrà doncs, treure els embrions de l'incubador a les hores establertes i valorar els següents paràmetres.

2.1.1.1 Paràmetres d'avaluació morfològica a dia 0 i a dia 1

L'avaluació morfològica a dia 0 i a dia 1 consisteix en l'avaluació de l'estat de l'oòcit inseminat i el zigot respectivament. A dia 0, i en cas d'usar com a mètode d'inseminació la microinjecció espermàtica (ICSI), just després d'inseminar els oòcits i de posar-los a cultivar a l'incubador convencional, es realitza una breu observació del seu estat. En aquesta observació s'avaluen els següents paràmetres (Rienzi et al., 2012):

- Aspecte de l'ooplasma: turgent o degenerant
- Aspecte del citoplasma: turgent o degenerant
- Presència i nombre de vacúols grans ($\geq 14\mu\text{m}$)
- Visualització d'agregacions del reticle endoplasmàtic llis
- Visualització d'inclusions citoplasmàtiques
- Anomalies a la zona pel·lúcida
- Espai perivitel·lí augmentat

El diagnòstic de la fecundació i l'avaluació de l'estat del zigot es realitza entre les 16 i les 18 hpi, seguint les recomanacions publicades (Rienzi et al., 2012; Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015). En l'avaluació del zigot i, per tant, de la fecundació es tenen en compte els següents paràmetres (Papale et al., 2012):

- Nombre de pronuclis
- Nombre de corpuscles polars
- Mida i disposició dels pronuclis
- Mida i disposició dels precursors nucleolars
- Presència d'halo citoplasmàtic
- Presència d'ona citoplasmàtica

Un cop feta l'avaluació dels paràmetres, s'estableix com a zigot viable l'oòcit fecundat amb oolemma turgent (sense signes de degeneració) que presenta 2 pronuclis i 2 corpuscles

polars (1r i 2n) (Papale et al., 2012; Robertson & Lin, 2013; Tesarik & Greco, 1999) idealment de mida similar i junts (femení i masculí) (fig. 9).

En l'avaluació, tot i que no és un requisit fonamental per donar per bona la fecundació, es té en compte que idealment hi hagi presència de precursors nucleolars encarats, ona citoplasmàtica, halo citoplasmàtic, i absència de vacúols grans (Papale et al., 2012).

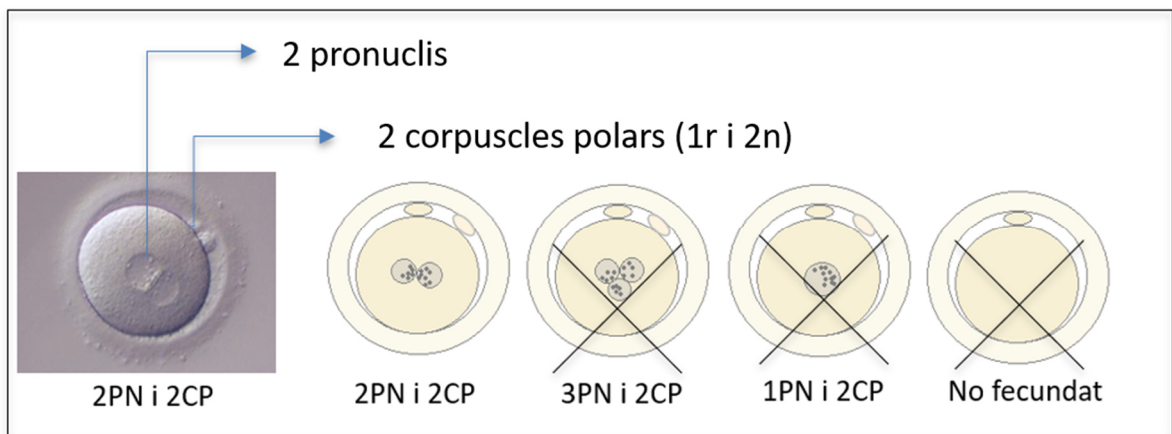


Figura 9. Esquemes de zigot amb fecundació correcta que presenta 2 pronuclis (2PN) i 2 corpuscles polars (2CP), i esquemes de zigots que mostren fecundacions anòmales (3PN i 1PN) o no fecundació (NF).

2.1.1.2 Paràmetres d'avaluació morfològica a dia 2 i a dia 3

L'avaluació morfològica a dia 2 i a dia 3 (fig. 10) consisteix en l'avaluació del estat de l'embrió en desenvolupament en estadi de cèl·lules (Prados et al., 2012). A dia 2, l'avaluació morfològica es realitza traient la placa de cultiu de l'incubador convencional entre les 24 i les 28 hpi per observar-la al microscopi invertit (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015). Per altra banda, per realitzar l'avaluació morfològica a dia 3, els embrions s'observen entre les 66 i les 69 hpi (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015).

En aquestes observacions s'avaluen els següents paràmetres (Prados et al., 2012):

- Nombre de blastòmers
- Disposició espacial dels blastòmers

- Mida i simetria dels blastòmers
- Taxa de fragmentació
- Disposició de la fragmentació
- Presència i nombre de nuclis per blastòmer
- Presència i nombre de vacúols grans ($\geq 14\mu\text{m}$)

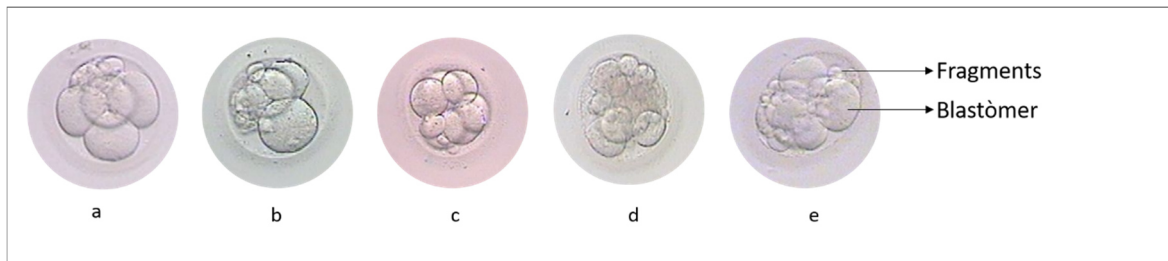


Figura 10. Embrions a dia 2 i dia 3 de desenvolupament. D'esquerra a dreta (a) embrió a 4 cèl·lules iguals on s'observa un 15% de fragmentació no dispersa, (b) embrió a 4 cèl·lules diferents on s'observa un 20% de fragmentació no dispersa, (c) embrió a 6 cèl·lules iguals, per tant amb simetria de divisió incorrecta i fragments grans, (d) embrió on s'observa lisis cel·lular en alguns blastòmers i (e) embrió on s'observa fragmentació dispersa.

Un cop feta l'avaluació dels paràmetres i com es comentarà en detall en els apartats següents, segons la literatura (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Coroleu et al., 2006) s'estableix com a embrió viable aquell que presenta les següents característiques generals:

A dia 2:

- Entre 2 i 6 blastòmers
- Taxa de fragmentació $\leq 35\%$
- Absència de vacúols grans o signes de degeneració

A dia 3:

- Entre 4 i 12 blastòmers
- Taxa de fragmentació $\leq 35\%$
- Absència de vacúols grans o signes de degeneració

2.1.1.3 Paràmetres d'avaluació morfològica a dia 4, a dia 5 i a dia 6

L'avaluació morfològica a dia 4 i a dia 5 del desenvolupament embrionari consisteix en l'avaluació del estat de l'embrió en estadi de compactació, cavitació (formació del blastocel o cavitat blastocèlica) i blastocist (Thorir Hardarson et al., 2012).

A dia 4, l'avaluació morfològica es realitza traient la placa de cultiu de l'incubador convencional idealment entre les 88 i 94 hpi i analitzant-lo al microscopi invertit (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015). Per altra banda, per realitzar l'avaluació morfològica a dia 5, els embrions s'observen entre les 114 i les 118 hpi (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015). Finalment, per realitzar l'avaluació morfològica a dia 6, els embrions s'observen entre les 136 i les 140 (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015).

A dia 4 del desenvolupament embrionari s'avaluen principalment els següents paràmetres (Hardarson et al., 2012):

- Nombre de blastòmers i llur disposició
- Compactació dels blastòmers i/o inici de la cavitació (formació de la cavitat blastocèlica)

A dia 5 i a dia 6 del desenvolupament embrionari s'avaluen principalment els següents paràmetres (Hardarson et al., 2012; Gardner and Schoolcraft, 1999):

- Formació del blastocist
- Grau d'expansió del blastocel
- Grau d'expansió del blastocist
- Mida, disposició i aspecte de la ICM
- Mida, disposició i aspecte del trofectorma
- Presència de procés d'eclosió total o parcial (*hatching* o *hatched*)

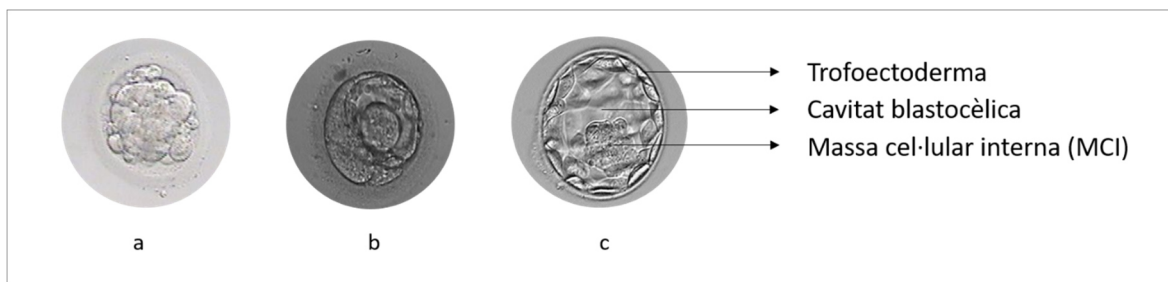


Figura 11. Embrions a dia 4 i a dia 5 de desenvolupament. D'esquerra a dreta (a) embrió en estadi de cavitació que mostra un elevat percentatge de fragmentació fora de l'estructura que forma la mòrula, (b) embrió en estadi de blastocist no uniforme, que ha deixat cèl·lules fora en formar l'estructura de blastocist i (c) embrió en estadi de blastocist uniforme, on es poden observar clarament el trofoectoderma, la cavitat blastocèlica i la massa cel·lular interna (ICM).

Un cop feta l'avaluació dels paràmetres i com es comentarà en detall en els apartats següents (fig. 11), segons la literatura (Gardner & Schoolcraft, 1999) s'estableix com a embrió viable aquell que presenta les següents característiques generals:

A dia 4:

- Signes de compactació o cavitació
- Taxa de fragmentació $\leq 35\%$
- Absència de vacúols grans o signes de degeneració

A dia 5:

- Embrió que ha evolucionat com a mínim fins a l'estadi de compactació, cavitació, o de blastocist inicial
- Blastocist amb ICM i trofoectoderma estructurats sense signes de degeneració

A dia 6:

- Embrió que ha evolucionat com a mínim fins a l'estadi de blastocist expandit
- Blastocist amb ICM i trofoectoderma estructurats sense signes de degeneració

2.1.2 *Escales d'avaluació morfològica en estadi cel·lular i de blastocist*

Des dels inicis de la FIV que s'han desenvolupat diferents escales d'avaluació i categorització dels embrions en funció de la seva morfologia (Balaban et al., 2011; Coroleu et al., 2006; Racowsky et al., 2010; Ziebe et al., 1997). La finalitat d'aquestes escales és ajudar a l'embrióleg a prendre decisions clíniques sobre la cohort embrionària que avalua. La majoria d'elles tenen en comú els criteris fonamentals descrits anteriorment per determinar la viabilitat embrionària. No obstant això, hi ha algunes diferències entre les escales que, eventualment, podrien donar lloc a certa controvèrsia.

A continuació es mostren les escales d'avaluació morfològica d'**ASEBIR** (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) i **Coroleu i col·laboradors** per avaluar embrions a dia 2 i a dia 3 del desenvolupament embrionari, així com l'escala de **Gardner i col·laboradors** per avaluar blastocists a dia 5 i dia 6 de desenvolupament embrionari. Aquestes escales han estat preses com a referents en la present tesi doctoral.

2.1.2.1 *Escala d'avaluació morfològica ASEBIR per a embrions en estadi cel·lular*

Els criteris de valoració morfològica d'oòcits i embrions d'ASEBIR, són fruit del treball realitzat pel grup d'interès en Embriologia d'ASEBIR. L'última revisió es va realitzar al 2018 (Cuevas Saiz et al., 2018), i en ella es mostren i descriuen en detall tots els ítems del desenvolupament embrionari preimplantacional que ha d'assolir un embrió viable.

Les hores d'observació post inseminació que recomana ASEBIR, donat que l'embrió hauria d'haver assolit els ítems de desenvolupament són les mostrades la figura 9.

A continuació es mostra resumidament la categorització que fa ASEBIR dels embrions a dia 2 i a dia 3 de desenvolupament (taula 2), presa com a referent en el present treball de tesi doctoral.

Els paràmetres que s'avaluen segon aquesta escala a dia 2 i a dia 3 són:

Dia d'avaluació	Paràmetre a avaluar
Dia 2 i dia 3	Nombre de cèl·lules i simetria de divisió
	Percentatge i tipus de fragmentació
	Mida dels blastòmers (simetria de divisió)
	Visualització de nuclis i grau de multinucleació
	Anomalies citoplasmàtiques (vacúols, pitting, anell citoplasmàtic)
	Zona pel·lúcida
	Grau de compactació

Taula 2. Paràmetres avaluats durant el desenvolupament embrionari òptim segons ASEBIR (Cuevas Saiz et al., 2018; Hurtado de Mendoza et al., 2015).

Els criteris d'ASEBIR, posen èmfasi tant en la importància que té l'assoliment del nombre de blastòmers, com a la mida i simetria dels mateixos.

La mida correcta segons el nombre de blastòmers, és a dir, la **simetria i sincronia de divisió** (Hardarson et al., 2001; Holte et al., 2007), indica que les cèl·lules s'estan dividint correctament en mida i de manera simètrica: *successivament, d'una cèl·lula gran n'esdevenen dues de més petites.*

Aquesta regla, que sembla una obvietat, és una de les bases fonamentals de l'estudi del desenvolupament embrionari des del punt de vista morfofocinètic.

En la següent il·lustració (fig. 12), es mostren els diferents graus de desigualtat definits per Hardarson i col·laboradors (Hardarson et al., 2001) i que ASEBIR assumeix en la seva classificació: a partir d'una desigualtat >20% els blastòmers són considerats diferents.

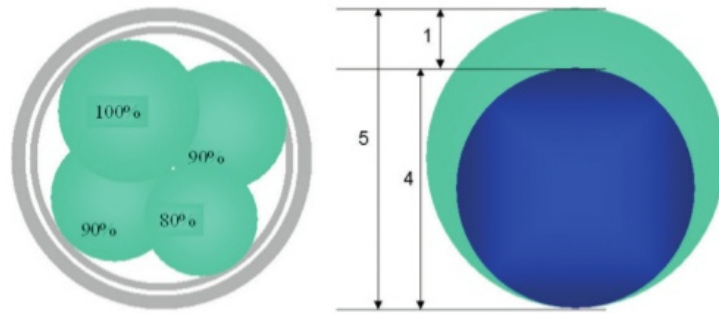


Figura 12. Es veuen 2 blastòmers superposats que mostren un grau de desigualtat. A partir d'una desigualtat >20% els blastòmers són considerats diferents segons Hardarson i col·laboradors (Hardarson et al., 2001).

En la següent figura (fig.13) es mostren els tipus d'asimetria i desigualtat segons el dia de desenvolupament que defineix ASEBIR, que exposen en quins casos la desigualtat entre blastòmers és normal i és causada per la desincronització entre les divisions cel·lulars.

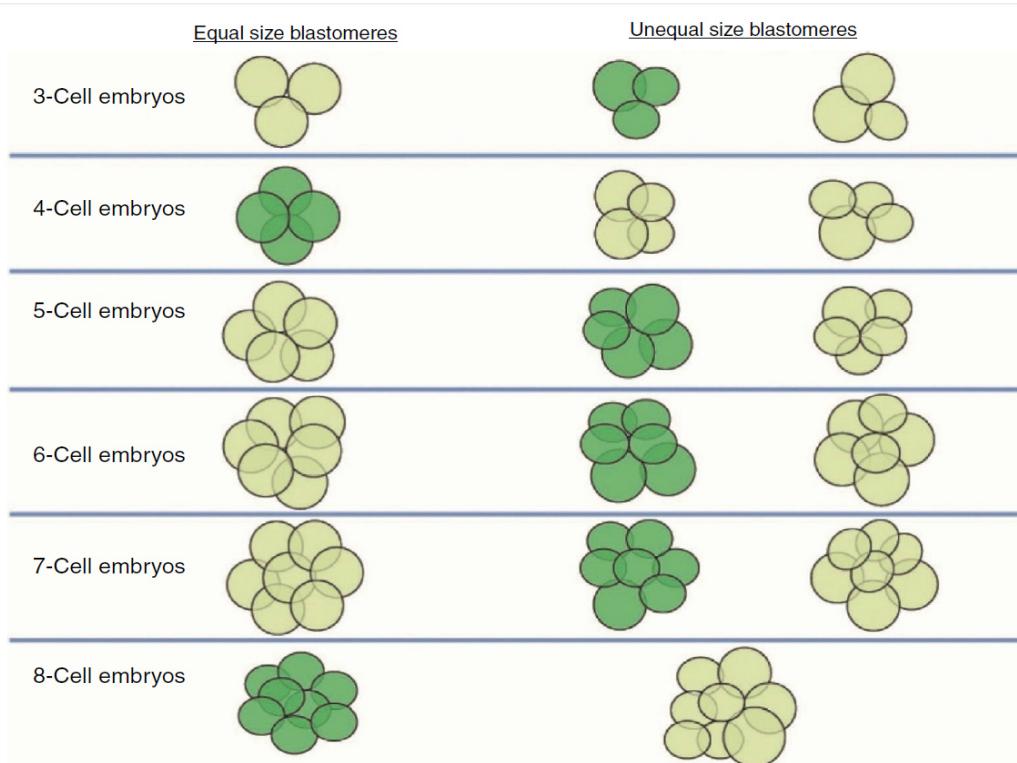


Figura 13. Es mostren en verd fosc el tipus de desigualtats considerades normals i per tant de bon pronòstic segons ASEBIR, i que són causa de la asincronia entre divisions cel·lulars (Prados et al., 2012).

Un cop preses totes les mesures per avaluar la qualitat dels embrions, ASEBIR presenta una escala (fig. 14) de graduació de la A (qualitat màxima) a la D (qualitat mínima) per categoritzar la qualitat embrionària.

D+2		D+3				
2 cèls	C	3-5 cèls	D	4 cèls (D+2)	=	A
		6 cèls	C	8 cèls (D+3)	=	
		7-9 cèl	C+	7 cèls (D+3)	≠ a 1G i 6P	C+
3 cèls (1G y 2P)	C	4-5 cèls	D	4 cèls (D+2)	≠	C
		6 cèls	C	5 cèls (D+2)	≠ a 3G y 2P	
		7-9 cèl	C+	8 cèls (D+3)	≠	
4 cèls	A	5 cèls	D	3 cèls (D+2)	≠ a 1G i 2P	D
		6 cèls	C	Sin vacuolas		A
		7 cèls	B	≤50 % cèls con vacuolas pequeñas		B
		8 cèls / compactando	A	≤50 % cèls con vacuolas grandes		C
		9 cèls / compactando	B	>50 % cèls con vacuolas pequeñas		D
		10 cèls o compacto	B	≤ 50% de células con μN o 2 de 2 cèl con μN a D+2		C
5 cèls (3G y 2P)	B	11-12 cèls	C+	> 50% de células con μN		D
		6 cèls	D	≤ 5%		A
		7-10 cèls	B	≤ 10-15%		B+
6 cèls	C	11-12 cèls	C	> 15-20%		B
		7 cèls	D	> 25-30%		C
7 cèls	C	8 cèls	D	≥ 35%		D
		9-12 cèls	C	Normal		A
> 7 cèls	D	≥ 1 cèl más que D+2	D	Anormal		B
		≤ 16 cèl o compactando	C			

Figura 14. Resum de la graduació i classificació embrionària segons ASEBIR adaptada pel laboratori CIRH-Eugin Barcelona, per a embrions en estat cel·lular a dia 2 i dia 3 del desenvolupament embrionari.

2.1.2.2 Escala d'avaluació morfològica de Coroleu i col·laboradors per a embrions en estadi cel·lular

L'avaluació morfològica de Coroleu i col·laboradors (Coroleu et al., 2006) per a embrions en estat cel·lular classifica els embrions detalladament fent referència a altres escales dissenyades i publicades prèviament (Coroleu et al., 2002; Plachot & Mandelbaum, 1990).

Els paràmetres que s'avaluen segon aquesta escala a dia 2 i a dia 3 són:

Dia d'avaluació	Paràmetre a avaluar
Dia 2 i dia 3	Nombre de cèl·lules
	Mida i simetria dels blastòmers
	Percentatge de fragmentació

Taula 3. Paràmetres avaluats durant el desenvolupament embrionari òptim segons Coroleu i col·laboradors (Coroleu et al., 2006).

Un cop preses totes les mesures per avaluar la qualitat dels embrions (taula 3), Coroleu i col·laboradors presenten la següent escala de graduació que consisteix en sumar punts segons la observació realitzada, aconseguint una puntuació de la qualitat embrionària que va del 0 (qualitat mínima) al 10 (qualitat màxima) (taula 4).

Paràmetre a avaluar	Observació	Dia d'observació	Puntuació
Nombre de cèl·lules	< 4 blastòmers	D+2	+ 0
	< 6 blastòmers	D+3	
	≥ 4 blastòmers	D+2	+ 2
	≥ 6 blastòmers	D+3	
Mida i simetria dels blastòmers	Asimètrics	D+2 i D+3	+ 0
	Simètrics	D+2 i D+3	+ 4
Percentatge de fragmentació	< 15%	D+2 i D+3	+ 4
	De ≥15% a <50%	D+2 i D+3	+ 2
	≥ 50%	D+2 i D+3	+ 0

Taula 4. Escala de graduació de la qualitat embrionària del 0 al 10 de Coroleu i col·laboradors (Coroleu et al., 2006).

2.1.2.3 Escala d'avaluació morfològica de Gardner per a embrions en estadi de blastocist

En l'avaluació del desenvolupament embrionari preimplantacional a dia 5 i a dia 6, com s'ha comentat anteriorment, es mesuren paràmetres morfològics diferents que en dies anteriors del desenvolupament, ja que l'embrió en cultiu idealment hauria d'haver arribat ja a l'estat de blastocist (Balaban et al., 2011; Cuevas Saiz et al., 2018).

L'escala d'avaluació de Gardner (Gardner & Schoolcraft, 1999) avalua als blastocists prenent en compte els següents paràmetres per realitzar la graduació, que s'escriu en 3 símbols:

Número (grau d'expansió del 0 al 6) (fig. 15), **lletra** (ICM de la A a la C) (fig. 16), **lletra** (trofectorma de la A a la C) (fig. 17).

- Grau d'expansió (número):

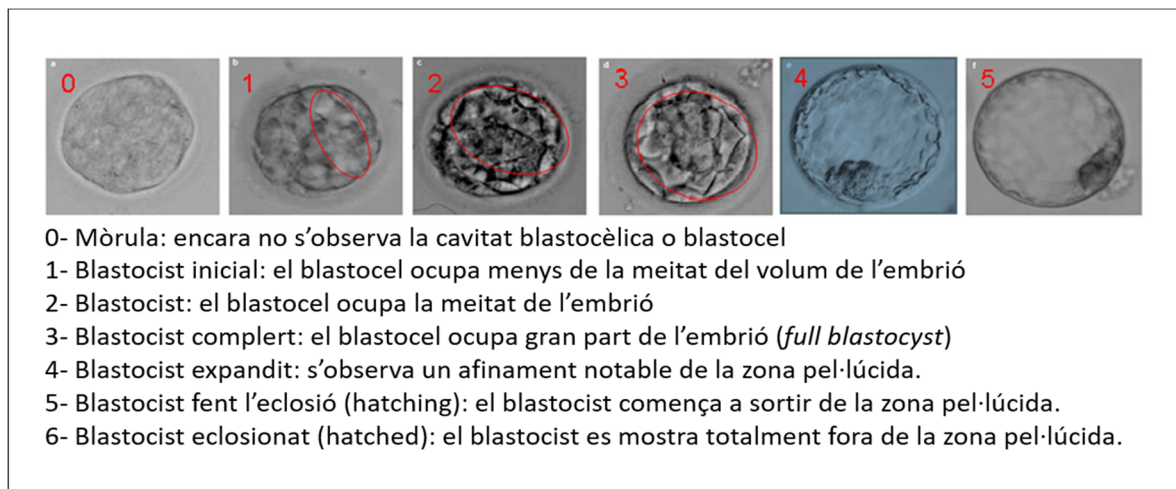


Figura 15. Figura de Gardner i Schoolcraft, 1999 (Textbook of Assisted Reproductive Technologies, 3a edició 2004) on es mostren els graus d'expansió dels embrions en estadi de blastocist i la seva categorització del 0 al 6.

- Avaluació de l'aspecte de la ICM (lletra):

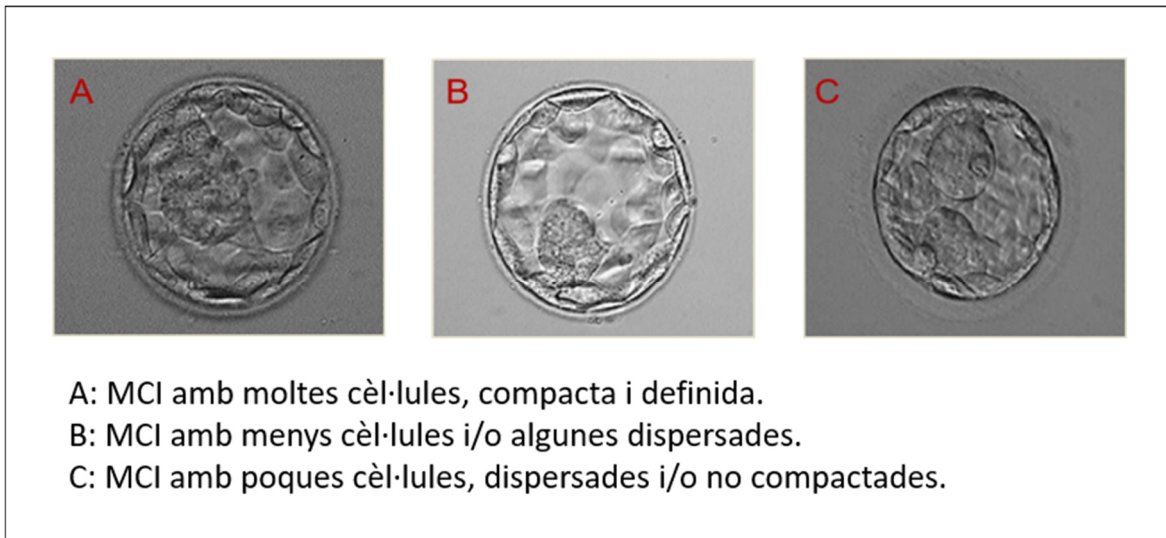


Figura 16: Blastocists amb ICM classificada segons Gardner. Es mostra la graduació de la A a la C de la qualitat de la ICM.

- Avaluació de l'aspecte del trofoectoderma (lletra):

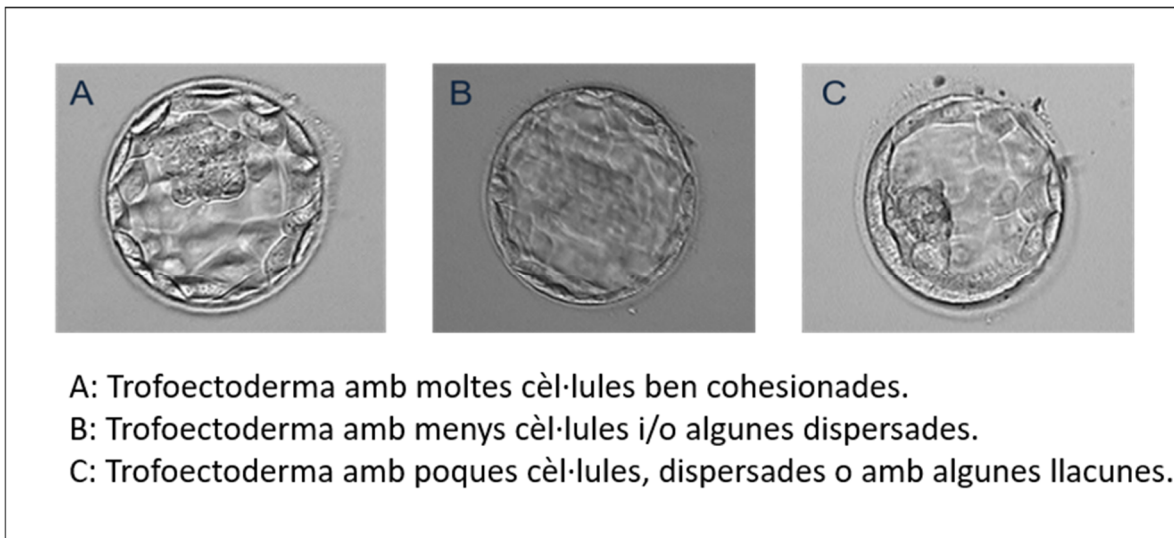


Figura 17: Blastocists amb trofoectoderma classificat segons Gardner. Es mostra la graduació de la A a la C de la qualitat del trofoectoderma.

2.1.3 Aplicacions, avantatges i limitacions de l'avaluació morfològica del desenvolupament embrionari preimplantacional

2.1.3.1 Aplicacions de l'avaluació morfològica en la pràctica clínica

Històricament l'avaluació de la morfologia embrionària ha estat l'eina principal dels embriòlegs clínics per a determinar la viabilitat dels embrions en cultiu, així com per categoritzar-ne la qualitat i decidir quin o quins embrions transferir o congelar primer dins la cohort embrionària (Başak Balaban et al., 2011; Coroleu et al., 2006; Racowsky et al., 2010; Ziebe et al., 1997).

L'avaluació clàssica de la morfologia embrionària ha servit també en clínica per donar crèdit a noves tècniques que s'han aplicat als laboratoris de FIV, ja que la qualitat embrionària, juntament amb els resultats reproductius, són els millors indicadors de qualitat d'un laboratori.

A nivell clínic, durant els darrers anys i per evitar les gestacions múltiples, s'ha estès la pràctica de la transferència d'un sol embrió preferiblement en estadi de blastocist, ja que aquests presenten més probabilitats d'implantació (Ebner et al., 2003; Gardner & Lane, 1998; Marek et al., 1999). És per això que la tasca de selecció de l'embrió a transferir dins la cohort embrionària actualment es torna més difícil que en el passat, on era habitual transferir d'entre 2 a 3 embrions i, per tant, la selecció no havia de ser tan acurada.

2.1.3.2 Avantatges i limitacions

Els avantatges de la selecció embrionària basada en la morfologia recauen especialment en la familiarització dels embriòlegs clínics amb aquest tipus d'avaluacions. Per altra banda no es pot oblidar la vessant econòmica, ja que l'avaluació morfològica no requereix de cars dispositius extres: només precisa d'un microscopi invertit que, de per si, ja forma part del equip bàsic d'un laboratori de FIV.

Tot i això, hi ha una sèrie de limitacions que cal destacar. Per una banda, un inconvenient de l'avaluació de la morfologia embrionària clàssica és que els embrions han de sortir de l'incubador de cultiu per uns moments per ser observats al microscopi invertit. Això pot afectar el seu desenvolupament òptim (Fujiwara et al., 2007; Lonergan et al., 2003).

Per altra banda, la valoració morfològica es realitza de manera estàtica ja que només s'avaluen moments puntuals i limitats del desenvolupament embrionari, per minimitzar al màxim aquest efecte nociu de treure els embrions de l'incubador de cultiu. Normalment els embrions es treuen un sol cop al dia per avaluar-los per la qual cosa l'embriòleg no sap com ha evolucionat l'embrió entre observació i observació. Això es tradueix en una pèrdua important d'informació sobre el desenvolupament i la viabilitat dels embrions en cultiu.

És per això, que si bé la selecció de l'embrió a transferir basada en la morfologia pot ésser efectiva, actualment comença a quedar obsoleta per si sola, amb l'aparició dels nous sistemes *time-lapse*, que permeten veure tot el desenvolupament embrionari complet.

Finalment, cal destacar que aquestes observacions estàtiques segueixen estant subjectes al bioritme de l'embrió en desenvolupament. Per tant, per a realitzar les observacions a les hores post-inseminació adequades (proposades per ASEBIR, per exemple), l'embriòleg ha d'adaptar totes les seves activitats per a estar disponible i preparat per a realitzar l'avaluació embrionària en el temps d'observació adequat.

Aquest és un aspecte clau a tenir en compte a l'hora d'entendre en què consisteix l'avaluació morfològica del desenvolupament embrionari preimplantacional i quines limitacions té. Per exemple: per aquest motiu, històricament, els embriòlegs han hagut d'adaptar els horaris de la inseminació en funció de l'hora prevista d'aparició del pronuclis masculí i femení, per poder realitzar la valoració morfològica d'aquests en el moment adequat de la jornada de treball del dia següent.

2.2 Avaluació morfocinètica del desenvolupament embrionari preimplantacional amb sistemes *time-lapse*

El primer treball reportat que utilitzava el *time-lapse* com a eina de recerca del desenvolupament preimplantacional d'embrions humans data del 1997 (Payne et al., 1997). Llavors els dispositius que es podien utilitzar no eren prou precisos ni adequats per usar-los en la pràctica clínica però, actualment, els avenços en bioinformàtica han permès desenvolupar sistemes més sofisticats que, a dia d'avui, s'usen en la rutina de la pràctica clínica.

Tot i que ja es disposi d'un ampli catàleg de sistemes *time-lapse*, l'estudi de la morfocinètica embrionària segueix essent una disciplina jove, i considerada pionera.

Tots els dispositius *time-lapse* per a laboratori de FIV tenen en comú el fet de què estan dissenyats per a estudiar la morfocinètica embrionària. Aquesta consisteix en mantenir en cultiu als embrions sota l'observació continua d'un microscopi amb càmera, que realitza fotografies en un pla cada determinats minuts i en diferents plans (*scans*) durant altres determinats minuts. El resultat és l'obtenció d'un vídeo del desenvolupament de l'embrió en cultiu, en diferents plans, gràcies al qual podem recuperar molta més informació que la que s'obtenia realitzant observacions morfològiques clàssiques. Aquest vídeo enregistrat permet veure i avaluar el desenvolupament embrionari de manera dinàmica i no pas estàtica.

2.2.1 Dispositius Time-lapse destacats per a l'avaluació de la morfocinètica embrionària

2.2.1.1 Eeva® (Merck).

Eeva® Test (early embryo viability assessment) és un dispositiu *time-lapse* que porta un petit microscopi de camp fosc el qual s'inclou dins de l'incubador convencional de cultiu.

Està compost per fins a 4 càmeres que capturen imatges dels embrions cada 5 minuts i que es poden controlar des d'un mateix software. Funciona de manera automàtica capturant imatges en un sol pla fins a dia 2 del desenvolupament embrionari. Mitjançant un algoritme cinètic inclòs en el seu software, prediu la capacitat dels embrions per evolucionar favorablement fins a dia 5 de desenvolupament i per implantar, segons els criteris de Wong i col·laboradors (Wong et al., 2010).

Com a inconvenients cal destacar que, tot i ser un sistema automàtic de control del desenvolupament embrionari, només avalua els embrions fins a dia 2 de desenvolupament i no es pot treure la placa de cultiu del incubador fins a les 42 hores de cultiu, per tal d'avaluar altres aspectes dels embrions.

Tot i així, ja s'ha preparat un nou algoritme predictiu Eeva[®] 3.0 (Algorithm Extend[®]) que preveu avaluar als embrions fins a dia 3 de desenvolupament, usant Geri[®], una altra plataforma de cultiu.

2.2.1.2 Geri[®] (Merck)

En aquest cas es tracta d'un incubador de sobretaula amb microscòpia incorporada. Incorpora en el seu software d'anàlisi diferents algoritmes d'anàlisi morfocinètic. El Sistema *time-lapse* està dins l'incubador de sèrie ja que aquest té incorporats 6 compartiments individuals amb 1 càmera cadascun. Aquestes càmeres poden enfocar fins a 11 plans diferents de fins a un total de 96 embrions en cultiu al mateix temps.

2.2.1.3 Primo Vision[®] (Vitrolife)

Igual que Eeva, aquest sistema *time-lapse* incorpora un microscopi (Unitats EVO+) que s'ha d'introduir dins l'incubador convencional de cultiu. En aquest cas es tracta d'un microscopi invertit petit amb càmera que a través del software captura fotografies cada 5 minuts en 1 sol pla, i cada 20 minuts en 11 plans diferents. Es poden cultivar un màxim de 16 embrions a l'hora en una placa de cultiu, i el resultat és un vídeo del desenvolupament embrionari

que es pot veure i analitzar. A diferència de Eeva, la mesura dels temps de divisió embrionaris no són automàtics, els ha de realitzar l'embriòleg. Es poden prendre més mesures (tantes com l'embriòleg consideri necessàries) i establir de manera personalitzada per a cada laboratori quins són els paràmetres morfocinètics més rellevants a mesurar. Per altra banda la placa es pot treure de l'incubador durant el cultiu si és necessari.

2.2.1.4 *Embryoscope® i Embryoscope plus® (Vitrolife)*

Embryoscope és un incubador tri-gas de sobre taula que, igual que Geri®, incorpora dins el sistema de *time-lapse*. En aquest cas però, l'incubador és únic per a totes les plaques en cultiu (no té compartiments individuals) i per tant les plaques comparteixen l'atmosfera i condicions de cultiu. Embryoscope pot cultivar fins 15 plaques amb fins a 16 embrions cadascuna. És a dir, pot cultivar al mateix temps un total de 240 embrions. Tot i aquesta gran capacitat, només disposa d'una única obertura i d'una única càmera per a tot l'incubador. La càmera és fixa i té òptica Hoffmann i les plaques de cultiu roten mitjançant una plataforma de manera que passen sota la càmera o per l'obertura de l'incubador quan és precís. En quant a l'enregistrament, la càmera realitza *scans* de manera programada per l'usuari dins de 7 plans focals. Per altra banda, l'anàlisi i control de l'incubador es realitza mitjançant el software EmbryoViewer. Aquest incorpora el seu propi algoritme d'anàlisi morfocinètic (KidScore) que prediu la capacitat d'implantació dels embrions a dia 3 i a dia 5 (Petersen et al., 2016).

2.2.2 *Paràmetres d'avaluació de la morfocinètica embrionària*

En les avaluacions de la qualitat embrionària basades en la morfocinètica s'avaluen els anomenats **paràmetres morfocinètics**, que poden ser quantitius (mesurables en temps) o qualitius. La nomenclatura d'aquests paràmetres va ser homogeneïtzada per primer cop a la publicació de Ciray i col·laboradors del 2014 (Ciray et al., 2014) i revisada per la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) al 2019 (Apter et al., 2020).

Malgrat els paràmetres d'avaluació morfocinètics són diferents als morfològics, quan es realitza una avaluació usant sistemes *time-lapse* també es mesuren paràmetres morfològics, no només morfocinètics. En conseqüència, el treball d'anàlisi per part dels embriòlegs és més complex i acurat quan es realitza una avaluació morfocinètica que quan es realitza una avaluació morfològica simple convencional.

S'anomenen **paràmetres morfocinètics quantitius** a aquelles variables del desenvolupament embrionari preimplantacional mesurades en temps, així com **paràmetres morfocinètics qualitius** als esdeveniments del desenvolupament embrionari que s'observen a través dels sistemes *time-lapse* no valorats en temps, com per exemple el nombre de pronuclis durant la fecundació (Ciray et al., 2014; Apter et al., 2020).

2.2.2.1 Paràmetres morfocinètics d'avaluació a dia 0 i a dia 1

A diferència de l'avaluació morfològica convencional, el cultiu en sistemes *time-lapse* fa que no sigui necessari treure els embrions de l'incubador per a avaluar-los. L'avaluació es realitza remotament i informàtica, visualitzant els vídeos del desenvolupament embrionari mitjançant els softwares corresponents.

En una correcta avaluació amb sistemes *time-lapse* a dia 0 i dia 1 s'ha de realitzar també una valoració morfològica dels oòcits inseminats i posats a cultivar, és a dir s'ha d'avaluar tant l'aspecte de l'oòcit inseminat com del zigot (Coticchio et al., 2018; Papale et al., 2012; Rienzi, Balaban, et al., 2012).

A dia 0 i, en el cas d'usar com a mètode d'inseminació la ICSI, just després d'inseminar els oòcits i abans de posar-los a cultivar al sistema *time-lapse*, es realitza una breu observació del seu estat morfològic, descrit en l'apartat anterior d'avaluació morfològica (Rienzi et al., 2012).

El diagnòstic de la fecundació i l'avaluació de l'estat del zigot es realitza entre les 16-18 hpi, igual que en el cas de l'avaluació morfològica. En aquest cas podrem observar i anotar

també el temps de l'extrusió del segon corpuscle polar (tPB2), al voltant de les 4-8 hpi (Ciray et al., 2014; Coticchio et al., 2018; Papale et al., 2012; Apter et al., 2020).

En l'avaluació de la fecundació i del zigot, es tenen en compte els següents paràmetres morfocinètics (Ciray et al., 2014; Papale et al., 2012):

- Nombre de pronuclis i temps d'aparició (PN i tPN respectivament)
- Temps de desaparició del pronuclis (tPNf)
- Nombre de corpuscles polars i temps d'aparició (tPB2)

Tot i fer el cultiu en un sistema *time-lapse*, en l'avaluació a dia 0 i a dia 1 també s'ha de realitzar l'observació i anotació si s'escau dels següents paràmetres morfològics (Aguilar et al., 2014; H. Nadir Ciray et al., 2014; G. Coticchio et al., 2018; Papale et al., 2012):

- Mida i disposició dels pronuclis
- Mida i disposició dels precursors nucleolars
- Presència d'halo citoplasmàtic
- Presència d'ona citoplasmàtica

Un cop feta l'avaluació dels paràmetres, s'estableix com a zigot viable l'oòcit fecundat amb oolemma turgent (sense signes de degeneració) que presenta 2 pronuclis en l'interval de temps d'entre 16-18 hpi, i 2 corpuscles polars (1r i 2n) (Tesarik & Greco, 1999).

En l'avaluació, tot i que no és un requisit fonamental per donar per bona la fecundació, idealment els pronuclis han de tenir una mida similar i han d'estar junts. També es té en compte que, idealment, hi hagi presència de precursors nucleolars encarats, ona citoplasmàtica, halo citoplasmàtic, i absència de vacúols grans (Coticchio et al., 2018; Papale et al., 2012).

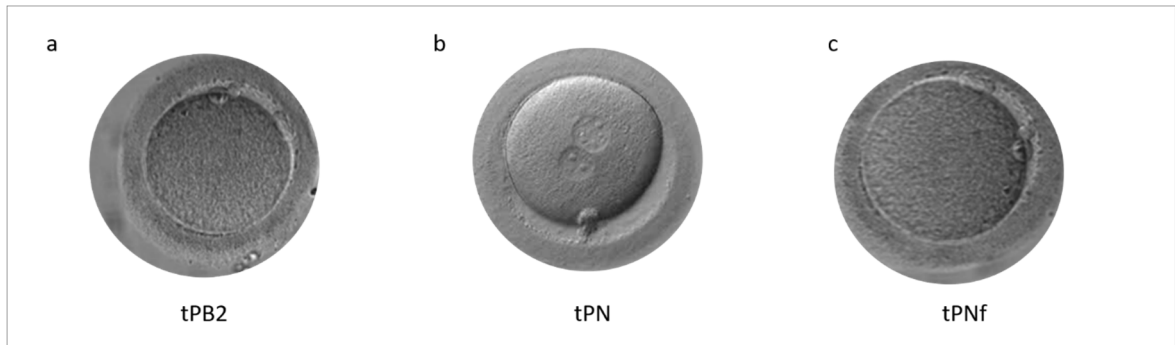


Figura 18. Paràmetres morfocinètics per avaluar la morfocinètica embrionària a dia 0 i dia 1. Imatges corresponents al moment de: (a) l'extrusió del segon corpuscle polar, on es pot observar en la imatge el 1r i el 2n corpuscle polar, (b) l'aparició dels 2 pronuclis i (c) la desaparició dels 2 pronuclis.

2.2.2.2 Paràmetres morfocinètics d'avaluació a dia 2 i a dia 3

L'avaluació morfocinètica a dia 2 i a dia 3 consisteix principalment en l'avaluació dels temps de les primeres divisions cel·lulars, des de l'estat de zigot fins a mòrula (fig. 19). En aquestes observacions s'avalua el següent (Ciray et al., 2014; Apter et al., 2020):

Paràmetres morfocinètics quantitius directes:

- Temps d'inici de la primera divisió cel·lular de 1 a 2 cèl·lules: **t2**
- Temps d'inici de la segona divisió cel·lular de 2 a 3 cèl·lules: **t3**
- Temps d'inici de la tercera divisió cel·lular de 3 a 4 cèl·lules: **t4**
- Temps d'inici de la quarta divisió cel·lular de 4 a 5 cèl·lules: **t5**
- Temps d'inici de la cinquena divisió cel·lular de 5 a 6 cèl·lules: **t6**
- Temps d'inici de la sisena divisió cel·lular de 6 a 7 cèl·lules: **t7**
- Temps d'inici de la setena divisió cel·lular de 7 a 8 cèl·lules: **t8**

Paràmetres morfocinètics quantitius indirectes:

- Duració del 2n cicle cel·lular (temps transcorregut entre t2 i t3): **CC2**
Fórmula: $t3 - t2 = CC2$
- Sincronia entre les divisions t3 i t4: **S2**
Fórmula: $t4 - t3 = S2$
- Duració del 3r cicle cel·lular (temps transcorregut entre t3 i t5): **CC3**

Fórmula: $t_5 - t_3 = CC3$

- Sincronia entre divisions del 3r cicle cel·lular (temps transcorregut entre t_5 i t_8): **S3**

Fórmula: $t_8 - t_5 = S3$

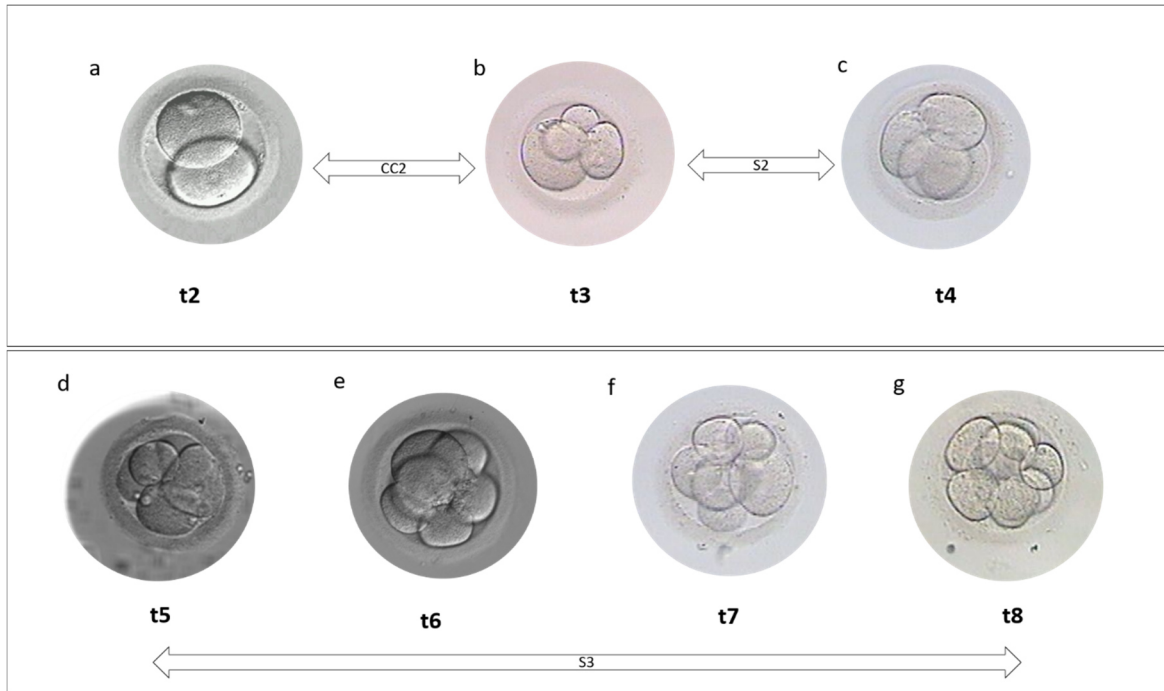


Figura 19. Paràmetres morfocinètics quantitius per avaluar la morfocinètica embrionària a dia 2 i dia 3. Imatges corresponents al moment de: (a) l'inici de la primera divisió embrionària o t_2 , (b) l'inici de la segona divisió embrionària o t_3 , (c) l'inici de la tercera divisió embrionària o t_4 , (d) l'inici de la quarta divisió embrionària o t_5 , (e) l'inici de la cinquena divisió embrionària o t_6 , (f) l'inici de la sisena divisió embrionària o t_7 i (g) l'inici de la setena divisió embrionària o t_8 . També es mostren esquemàticament els paràmetres morfocinètics indirectes, CC2, S2 i S3.

Un cop presos els valors dels paràmetres morfocinètics, per fer una correcta avaluació del desenvolupament embrionari també cal tenir en compte els següents valors morfològics en l'embrió (Prados et al., 2012):

- Disposició i taxa de fragmentació
- Presència i nombre de nuclis per blastòmer
- Presència i nombre de vacúols grans ($\geq 14\mu\text{m}$)

A més de fer l'avaluació dels paràmetres morfocinètics, es recomana fer l'observació morfològica a les hores establertes com a hores d'observació correcta (per exemple seguint els criteris d'ASEBIR), i avaluar morfològicament l'aspecte de l'embrió, ja que com es veurà més endavant, la majoria d'algoritmes morfocinètics tenen en compte la morfologia de l'embrió a més de la morfocinètica de desenvolupament (Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016).

Un cop feta aquesta visualització morfològica en les hores post inseminació pertinents a cada dia del desenvolupament, podem excloure quins embrions no són morfològicament viables seguint les escales d'avaluació morfològiques citades anteriorment (per exemple ASEBIR i Coroleu i col·laboradors) i, fins i tot, podem descartar-los abans de procedir a aplicar l'anàlisi morfocinètic i l'algoritme o model predictiu pertinent.

2.2.2.3 Paràmetres morfocinètics qualitius: simetria de divisió i divisions anòmales

En prendre aquestes mesures s'ha de tenir en compte que les divisions han de presentar una correcta simetria de divisió (fig. 20): consecutivament, una cèl·lula gran ha de dividir en dues de més petites (Giorgetti et al., 1995; T. Hardarson et al., 2001; Holte et al., 2007). Aquesta simetria es clau per avaluar la qualitat dels embrions.

Quan les cèl·lules es divideixen de manera anòmala, podem trobar divisions abruptes (DA) i divisions inverses (DI). Aquests són fenòmens que normalment no es poden veure amb les avaluacions morfològiques convencionals i que s'anomenen paràmetres morfocinètics qualitius (Liu et al., 2016). Usant sistemes *time-lapse* si que es poden observar i avaluar i, tot i que són difícils de veure, s'han de tenir en compte a l'hora de fer una correcta avaluació morfocinètica, ja que la seva presència esta associada a mala qualitat embrionària (Liu et al., 2016; Rubio et al., 2012). Les divisions anòmales corresponen a:

- Divisions abruptes (DA): una cèl·lula gran divideix en més de dues cèl·lules.
- Divisions inverses (DI): dues o més cèl·lules es fusionen i donen lloc a una de sola.

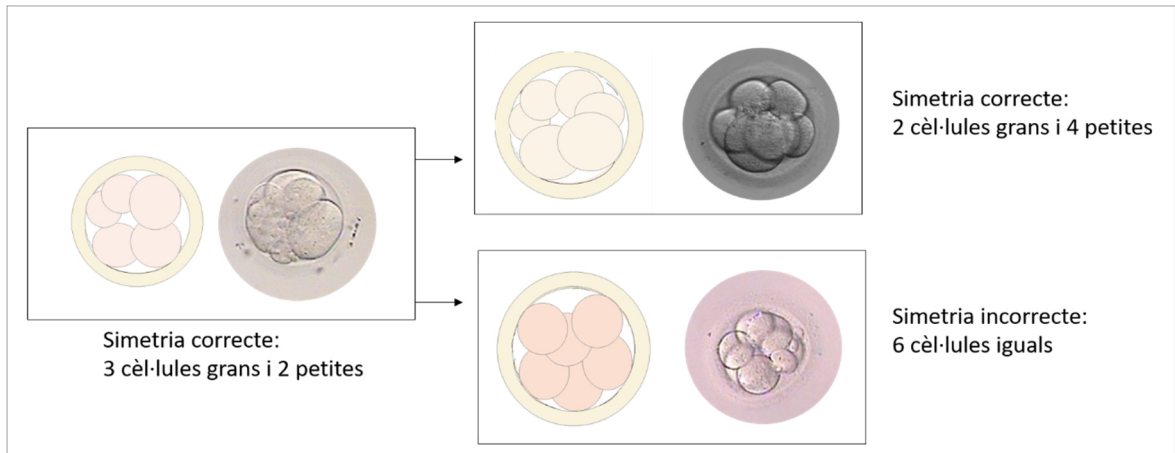


Figura 20. Simetria de divisió. Els sistemes *time-lapse* permeten veure més eficientment si un embrió ha fet la divisió cel·lular simètricament, és a dir, permet veure si de cada cèl·lula en surten només dues de més petites, i si es produeixen divisions abruptes o inverses.

2.2.2.4 Paràmetres morfocinètics d'avaluació a dia 4, a dia 5, i a dia 6

L'avaluació morfocinètica a dia 4, a dia 5 i a dia 6, consisteix en l'avaluació dels temps relacionats amb l'estat de compactació, cavitació i blastocist complert (fig. 21a, 21b i 21c, respectivament). En aquestes observacions s'avaluen els següents paràmetres a través del software corresponent (Gardner & Schoolcraft, 1999; Hardarson et al., 2012; K. Kirkegaard et al., 2013; Pribenszky et al., 2010):

- Inici de compactació: **tC**
- Inici de cavitació: **tSB**
- Arribada a blastocist complert, just abans que s'afini la zona pel·lúcida: **tB**

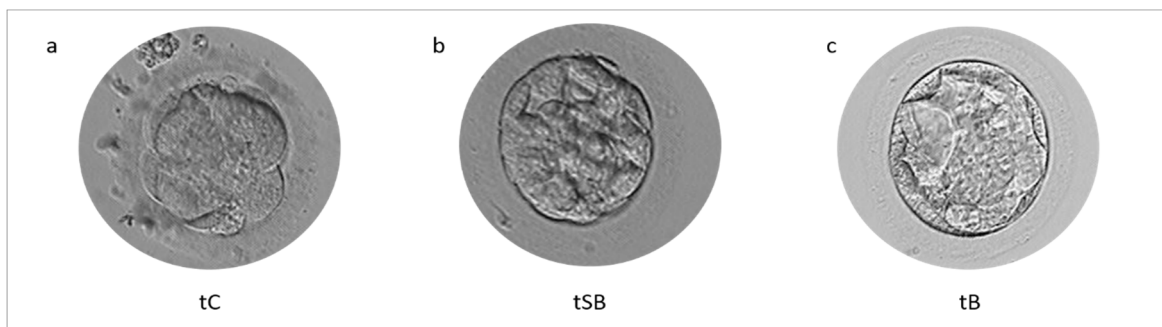


Figura 21. Paràmetres morfocinètics per avaluar la morfocinètica embrionària en dia 4, a dia 5 i a dia 6. Imatges corresponents al moment de: (a) l'inici de la compactació o tC, (b) l'inici de la cavitació o tSB i (c) l'arribada a blastocist complert (full blastocist) just abans d'expandir-se i d'afinar la zona pel·lúcida.

A més de fer l'avaluació dels paràmetres morfocinètics, per a avaluar els embrions en sistemes *time-lapse* a dia 5 i dia 6, s'han de mesurar també els paràmetres morfològics a les hores establertes com a hores d'observació correctes. En el cas de què es tracti de blastocists, s'han de mesurar el grau d'expansió i la qualitat de la ICM i el trofocitoderma seguint, per exemple, l'escala vista en apartats anteriors (Gardner & Schoolcraft, 1999).

També podem excloure els embrions que no són morfològicament viables seguint les escales d'avaluació citades anteriorment i descartar-los o no abans de procedir a fer l'anàlisi morfocinètic i aplicar l'algoritme o model predictiu pertinent.

2.2.3 Tipus d'algoritmes i models d'avaluació de la morfocinètica embrionària

L'avaluació del desenvolupament embrionari a nivell morfocinètic requereix el filtrat de les dades recollides per una escala o classificació que donarà una grau o puntuació a l'embrió avaluat igual que ho fan les escales de valoració morfològica (Campbell et al., 2013; Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010). En aquest cas, com que es disposa de més informació que en l'avaluació morfològica, l'avaluació de l'embrió és en general més complexa.

Les conclusions extretes per diferents autors en múltiples estudis i models predictius publicats (Azzarello et al., 2012; Campbell et al., 2013; Dal Canto et al., 2012; Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010) poden suggerir concordança en quant a

la rellevància que té cada paràmetre morfocinètic a l'hora de predir els resultats clínics. Tot i així, com es comenta a l'apartat següent, hi ha certa controvèrsia sobre la fiabilitat dels algorismes o models predictius descrits a la bibliografia, així com quins són els paràmetres morfocinètics més rellevants per a predir la viabilitat embrionària. Això es deu, sobretot, a les condicions basals heterogènies en què s'han dut a terme el disseny dels diferents models predictius (Ciray et al., 2014). No obstant, s'han publicat estudis on s'avalua la fiabilitat d'usar els mateixos algorismes o models entre diferents clíniques amb certa fiabilitat o seguretat (Basile et al., 2015; Petersen et al., 2016). Finalment, també s'han publicat comparatives entre paràmetres morfocinètics rellevants proposats per diferents autors (Kaser & Racowsky, 2014) (fig. 22).

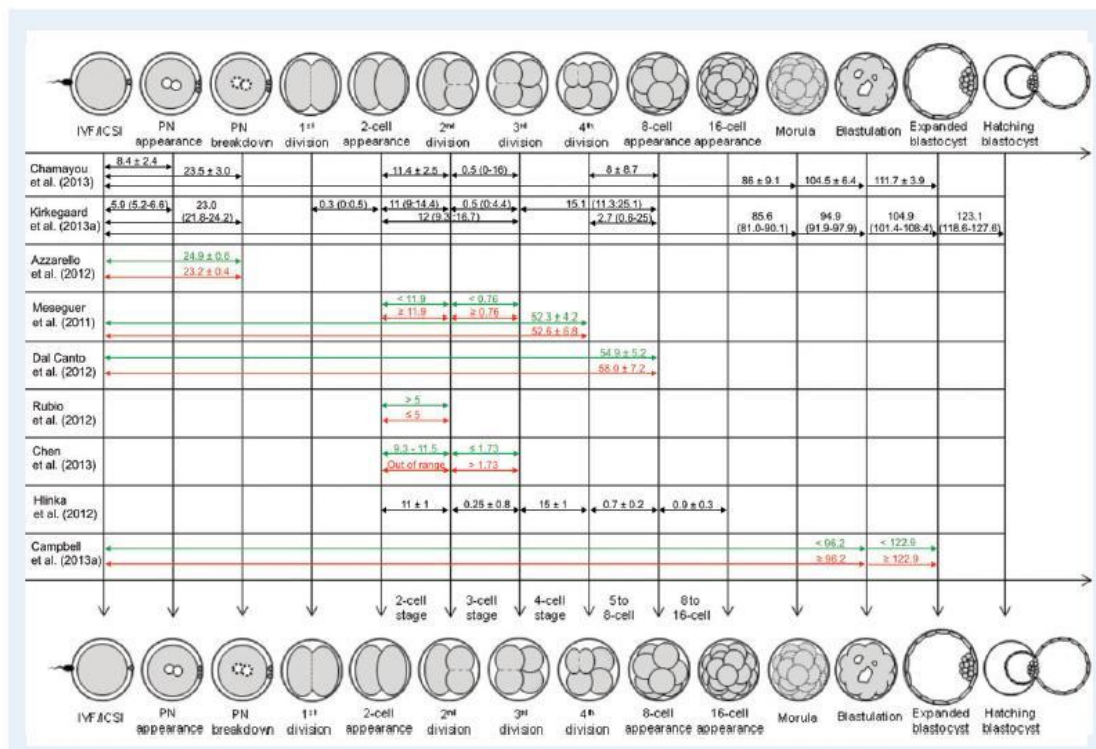


Figura 22. Esquema del desenvolupament embrionari preimplantacional amb la comparativa dels diferents valors dels paràmetres morfocinètics que destaquen diferents autors com a predictius de la viabilitat i qualitat embrionària (Kaser & Racowsky, 2014).

En base a aquests estudis, s'han dissenyat diferents models i algorismes basats en els resultats clínics o anàlisi genètiques dels embrions analitzats i amb resultat clínic conegut o *KID* (*known implantation data*).

A nivell clínic aquests models i algorismes resulten en models predictius que relacionen els valors dels paràmetres morfocinètics obtinguts de les avaluacions morfocinètiques, amb la capacitat d'implantació dels embrions, la probabilitat de què els embrions arribin a l'estadi de blastocist, o fins i tot la probabilitat de què aquests tinguin aneuploidies.

En l'apartat següent, discutirem sobre els algorismes i models publicats fins ara, però abans i a continuació, descriurem els tipus d'algorismes morfocinètics i models predictius descrits, posant com a exemple alguns dels més rellevants publicats fins ara a la bibliografia.

2.2.3.1 Models predictius de formació de blastocist: model de Wong

Hi ha múltiples estudis publicats que relacionen els temps de les primeres divisions cel·lulars amb la capacitat dels embrions a assolir l'estat de blastocist (Cruz et al., 2012; Dal Canto et al., 2012; Milewski et al., 2015).

El model de Wong va ésser publicat al 2010 (Wong et al., 2010). En la present tesi doctoral es posa com a exemple del tipus de model predictiu a blastocist ja que és interessant el fet de què es basa en l'estudi d'una cohort de 243 embrions amb KID des del punt de vista morfocinètic i també genètic.

Per una banda, Wong i col·laboradors van calcular els temps de les primeres divisions cel·lulars i van observar que hi havia 3 paràmetres morfocinètics rellevants per predir la probabilitat d'un embrió a arribar a blastocist: la duració de la primera citocinesi, la duració del segon cicle cel·lular (CC2), i la sincronia entre la tercera i la quarta divisió cel·lular (S2). Per altra banda, van observar durant l'anàlisi genètica de tots els embrions, que el perfil d'expressió gènica era anòmal en aquells embrions als quals s'aturava la divisió cel·lular o hi havia un patró de divisió aberrant (Wong et al., 2010).

Van concloure que els embrions que presentessin els següents valors per a aquests paràmetres arribarien en un 93% d'especificitat i un 94% de sensibilitat a l'estadi de blastocist:

- CC1 = ≤ 33 min
- CC2 = 14,3 hores \pm 7,8 hores
- S2 = $\leq 5,8$ hores

Aquest model predictiu va ser un dels primers en publicar-se i no tenia en compte les variables morfològiques de la qualitat embrionària. Més endavant van anar apareixent altres models predictius de blastocist on s'acorava més la predicció i s'hi tenia en compte la valoració de la morfologia embrionària a més de l'avaluació dels paràmetres morfocinètics (Cetinkaya et al., 2014; K. Kirkegaard et al., 2013; Motato et al., 2016).

2.2.3.2 *Models predictius d'aneuploidies: model de Campbell*

Els models predictius d'aneuploidies són models i algorismes morfocinètics que intenten avaluar la probabilitat de què un embrió sigui portador d'aneuploides en funció dels valors obtinguts en la seva anàlisi morfocinètica (taula 5).

Són d'interès científic rellevant donat que pretenen obtenir d'una manera no invasiva un diagnòstic genètic. Tot i així val a dir que, tot i que puguin ser orientatius per a l'embriòleg, no són capaços de substituir actualment el Test Genètic Preimplantacional (TGP), ja que no proporcionen una fiabilitat del 100%. És ben sabut però, que hi ha una relació entre els paràmetres morfocinètics i l'existència d'aneuploidies en l'embrió (Basile et al., 2014; Chavez et al., 2012; Z. Yang et al., 2014).

Posant com a exemple d'aquest tipus de models el model de Campbell i col·laboradors publicat al 2013 (Campbell et al., 2013), veiem que en el seu estudi es van analitzar els paràmetres morfocinètics de 98 blastocists de 25 cicles de FIV amb TGP que havien estat cultivats en Embryoscope. Es van mesurar els paràmetres morfocinètics des de la desaparició dels pronuclis (tPNf) fins a l'arribada a blastocist (tB).

Després d'analitzar les mesures preses, van proposar un model on classificar els embrions en 3 grups segons el seu risc de ser portadors d'aneuploïdies i prenent com a paràmetres morfofocinètics rellevants t_{SB} i t_B .

Grup de risc	Definició del grup	n	Incidència	Probabilitat
Baix	$t_B < 122.9$ hpi and $t_{SB} < 96.2$ hpi	36	0.36	0.37
Mig	$t_B < 122.9$ hpi and $t_{SB} \geq 96.2$ hpi	49	0.69	0.69
Alt	$t_B \geq 122.9$ hpi	12	1.00	0.97
Total	-	97	0.61	0.61

Taula 5. Model morfofocinètic basat en el càlcul de t_{SB} i t_B de Campbell i col·laboradors (Campbell et al., 2013) per a la classificació d'embrions segons la incidència i la probabilitat d'aneuploidia associades.

2.2.3.3 Models predictius d'implantació: algoritme de Meseguer i algoritme KidScore

Dins d'aquests 3 grups de models i algorismes morfofocinètics, el més clínicament destacable és el que estableix la relació entre la morfofocinètica embrionària i la capacitat d'implantació dels embrions. Això és així ja que aquest tipus d'algorismes s'utilitzen en clínica de manera rutinària.

L'any 2011 Meseguer i col·laboradors van publicar un algoritme predictiu d'implantació (Meseguer et al., 2011) que contemplava les mesures de les primeres divisions cel·lulars i s'utilitzava per reforçar la selecció del o dels embrions a transferir a dia 3 de desenvolupament embrionari.

Com s'ha comentat anteriorment, aquest algoritme demana en primer lloc a l'embrióleg que avaluï morfològicament l'embrió i faci així una primera tria d'embrions no viables.

Per dissenyar-lo, Meseguer i col·laboradors (Meseguer et al., 2011) van calcular els paràmetres morfocinètics de 247 embrions que havien donat lloc a gestació.

Van dissenyar un algoritme (fig. 23) que categoritzava els embrions des de la categoria A+ (qualitat màxima i màxima capacitat d'implantació) a la F (qualitat mínima i mínima capacitat d'implantació). En primer lloc, un cop avaluada la morfologia, proposava descartar a la categoria F els embrions morfològicament anòmals a criteri de l'embrióleg. Seguidament proposava col·locar a la categoria E als embrions amb asimetria severa en estadi de 2 cèl·lules i/o que presentessin divisió abrupta de 1 a 3 cèl·lules. Finalment establia com a paràmetres morfocinètics més rellevants t5, S2, i CC2 i proposava el següent algoritme de classificació segons les mesures preses (Meseguer et al., 2011).

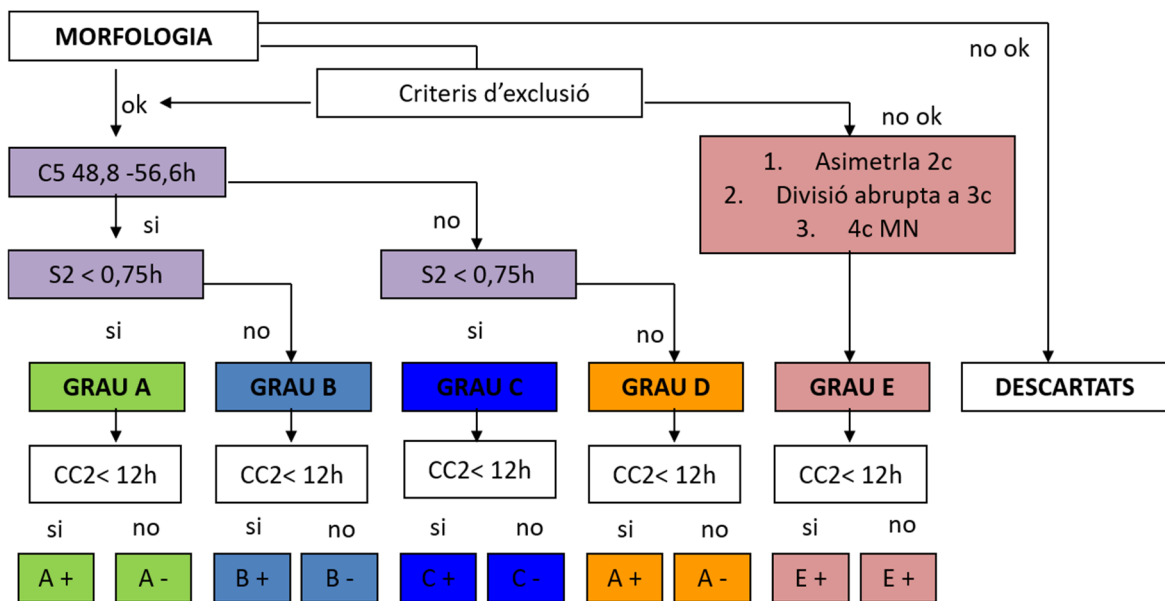


Figura 23. Algoritme de classificació jeràrquica d'embrions de Meseguer i col·laboradors (Meseguer et al., 2011).

Actualment ja existeixen algoritmes que prediuen la capacitat d'implantació també a dia 5. És el cas de KidScore D5. Dispositius com l'Embryoscope® plus porten incorporat al seu software l'algoritme KidScore (Petersen et al., 2016), que avalua la morfocinètica d'embrions a dia 3 i dia 5 (KidScore D3 i D5 respectivament). Els paràmetres morfocinètics que demana mesurar el KidScore són PN, tPNf, t2, t3, t4, t5, t8, tSB i tB.

A més a més KidScore també demana l'avaluació de la morfologia del blastocist (la ICM i el trofotoderma). Un cop l'embrió ha pres totes les mesures, el software calcula una puntuació per a cada embrió que és relativa a la seva capacitat d'implantació comparativament amb la resta d'embrions de la mateixa cohort embrionària.

2.2.4 *Discussió i revisió bibliogràfica d'algoritmes i paràmetres morfocinètics*

2.2.4.1 *Aplicabilitat clínica dels algoritmes i models morfocinètics*

Des de l'aparició dels primers sistemes *time-lapse* i especialment durant els darrers 10 anys, diferents autors de diversos laboratoris de FIV i grups de recerca han realitzat “una cursa” per tal d'estudiar i establir quins són els paràmetres morfocinètics més rellevants i crítics del desenvolupament embrionari preimplantacional, així com la publicació de diversos models i algoritmes de selecció embrionària basats en la morfocinètica.

Com hem comentat anteriorment, s'han representat i publicat algoritmes i models de 3 tipus bàsicament: els que prediuen la capacitat d'implantació o resultat reproductiu, els que prediuen la probabilitat dels embrions d'arribar a blastocist, i finalment els que prediuen la probabilitat dels embrions de tenir aneuploïdies. D'entrada doncs, tot i ser objectius diferents, l'objectiu essencial dels tres tipus de models és el mateix: seleccionar el millor embrió dins la cohort embrionària.

Fins fa poc, la restricció del nombre d'embrions a transferir quedava subjecta a la llei de cada país, essent algunes molt permissives i donant l'última paraula als facultatius clínics. D'altres països tenen lleis molt restrictives i deixen només transferir un sol embrió a les pacients (Pennings et al., 2009). Però des d'un temps ençà, ja no és tant la llei si no els propis clínics que, donades les evidències científiques del risc implícit de les gestacions gemel·lars o múltiples (Pinborg, 2005) intenten, sempre que sigui possible, transferir un sol embrió per minimitzar els riscos de gestació múltiple que impliquen un risc per al nadó i per a la mare, com poden ser la hipertensió, la diabetis gestacional, el part prematur, el baix pes al naixement, etc. Aquests riscos es minimitzen per tant, amb l'elecció més

acurtada d'un sol embrió dins la cohort embrionària. És així com aquesta selecció es converteix en una tasca cada cop més important dins del cicles de RHA.

Amb l'objectiu de realitzar doncs eSET als cicles de RHA, els cultius embrionaris actualment s'allarguen fins a dia 5 de desenvolupament sempre que sigui possible, per tal d'escollir un sol blastocist a transferir. El motiu d'aquest allargament del cultiu *in vitro* fins a dia 5, és que es produeixi una selecció natural dels mateixos, així com per obtenir més informació del seu desenvolupament i per tant de la seva viabilitat.

Amb aquest objectiu de seleccionar l'embrió amb més probabilitat d'implantar els algoritmes que han pres més rellevància al llarg d'aquesta última dècada, a nivell clínic, són els que prediuen la capacitat d'implantació o l'èxit reproductiu, més que no pas els de predicció a blastocist. Pel que fa a aquests algoritmes o models que prediuen la probabilitat d'arribar a blastocist, val a dir que l'únic eventual avantatge que podrien presentar és poder fer una transferència a dia 3 (per necessitats circumstancials del cicle de FIV) amb major certesa d'estar escollint l'embrió o embrions amb més possibilitats d'èxit reproductiu, sense córrer "el risc" de deixar-los en cultiu fins a dia 5.

En aquests casos, on les transferències es fan a dia 3, podrien ser efectius aquests models de predicció a blastocist que s'han publicat en estudis, mostrant paràmetres morfocinètics rellevants o models de predicció que, amb més o menys encert, es podrien usar en aquests casos concrets (Cruz et al., 2012; Dal Canto et al., 2012; K. Kirkegaard et al., 2013; Milewski et al., 2015). Però malgrat aquest possible avantatge de fer una transferència a dia 3 amb major probabilitat d'encert, la tendència als laboratoris, com comentàvem anteriorment, és clarament la de cultivar els embrions fins a dia 5, amb la qual cosa els algoritmes de pronòstic d'arribada a blastocist serien poc necessaris en aquest context clínic.

Per altra banda, pel que fa als algoritmes de predicció de presentar aneuploidies, malgrat se n'han publicat diversos al llarg de l'última dècada (Campbell et al., 2013; Chavez et al., 2012; Chawla et al., 2014; Del Carmen Nogales et al., 2017; M.G. et al., 2016), estan encara lluny de ser una eina substitutòria de TGP. Hi ha autors que han publicat treballs mo-

que no hi ha una concordança entre els paràmetres morfocinètics i la presència d'aneuploïdies (Kramer et al., 2014; Z. Yang et al., 2014), mentre n'hi ha d'altres que sí que les apunten. Per exemple, Chavez i col·laboradors (2012) afirmaven que només un 30% dels embrions cromosòmicament normals es troba en valors de divisió òptims abans de les 4 cèl·lules. Altres autors (Basile et al., 2014; Chawla et al., 2014) han trobat en els seus estudis variacions en el patró morfocinètic primerenc, des de t2 a t5, dels embrions aneuploides. I finalment, altres estudis com el de Campbell i col·laboradors (Campbell et al., 2013) no van trobar diferències en els temps primerencs però sí, com s'ha comentat anteriorment, en estadis relacionats amb la formació del blastocist (tSB i tB), i han publicat algorismes aparentment atractius però de dubtosa aplicabilitat clínica, donat que no ofereixen un diagnòstic genètic 100% fiable.

Aquestes troballes, semblen molt atractives des del punt de vista clínic, ja que establir un model predictiu d'aneuploïdies que realment sigui eficient seria un gran alleujament per les pacients candidates a fer cicles de TGP-A (avortaments de repetició, fallides d'implantació recurrent i edat materna avançada) ja que implicaria no haver de biopsiar els embrions per tal de fer-ne el diagnòstic. La realitat és que, ara per ara, els resultats publicats mostren una alta heterogeneïtat i encara no s'ha aconseguit dissenyar cap model predictiu d'aneuploïdies que realment sigui fiable (Reignier et al., 2018).

Dit això, podem afirmar que actualment l'aplicabilitat clínica més realista i rendible de l'avaluació morfocinètica és la que comprèn l'ús dels algorismes i models de predicció de capacitat d'implantació del embrions, així com de la determinació dels paràmetres morfocinètics més crítics per assolir aquesta implantació i l'èxit reproductiu.

2.2.4.2 Primers algorismes i models predictius d'implantació i embaràs

Per entendre bé la importància de cada un dels diferents paràmetres morfocinètics i com els han interpretat en models i algorismes els diferents autors, val la pena fer un repàs de la bibliografia més rellevant publicada durant l'última dècada. La determinació del valor o rellevància real dels paràmetres morfocinètics, a més, és clau per entendre de quina

manera poden tenir influència sobre el desenvolupament embrionari les diferents variables externes, que poden aplicar-se sobre els embrions o els gàmetes dels quals provenen (Basile et al., 2013; Freour et al., 2015). Aquest és el cas de la vitrificació d'oòcits o l'activació oocitària assistida, que són els motius d'estudi en la present tesi doctoral.

Posant-nos en antecedents, Payne i col·laboradors ja havien anunciat l'ús dels sistemes *time-lapse* com a una eina excel·lent per a estudiar el desenvolupament embrionari preimplantacional, amb una publicació on mostraven els resultats del cultiu d'embrions humans en sistemes *time-lapse* fins a les 48 hpi (Payne et al., 1997). Més endavant, Lemmen i col·laboradors (2008) van publicar un estudi on, a més, del cultiu i l'observació en sistemes *time-lapse*, parlaven de resultats reproductius. En concret, correlacionaven la desaparició precoç dels pronuclis i l'aparició de la primera divisió cel·lular en un temps òptim (entre 25h i 27 hpi) amb un nombre més elevat de blastòmers els dies posteriors de cultiu, que sumat a l'aparició de nuclis després de la primera divisió de manera sincrònica, resultava en majors taxes d'embaràs. A més, i en concordança amb els resultats obtinguts per Payne i col·laboradors (1997), els autors van concloure que el cultiu en sistemes *time-lapse* no deteriorava la qualitat embrionària ja que, igualment que Payne y col·laboradors, van realitzar el seu estudi usant una cohort control d'oòcits germans inseminats i cultivats en un incubador convencional.

Tot i que ja hi havia aquests estudis publicats sobre esdeveniments i paràmetres morfocinètics (Hardarson et al., 2002; Lemmen et al., 2008; Mio & Maeda, 2008; Payne et al., 1997), els algoritmes de Wong i col·laboradors (2010) i especialment Meseguer i col·laboradors (2011), van marcar possiblement el punt de partida més rellevant en la cerca dels paràmetres morfocinètics crítics i els algoritmes de selecció morfocinètica.

Com hem comentat anteriorment, Meseguer i col·laboradors van proposar un primer algoritme de selecció embrionària amb la finalitat d'escollir els embrions amb major capacitat d'implantació. Per a dissenyar-lo, van realitzar la mesura de molts paràmetres morfocinètics quantitativs i qualitativs. Pel que fa als quantitativs, van calcular els temps de les divisions cel·lulars fins a dia 3 de desenvolupament embrionari, així com les

sincronies entre divisions i duració de cicles cel·lulars. Totes les mesures van tenir com a objectiu doncs, en primer lloc, determinar quins són els paràmetres més rellevants del desenvolupament embrionari fins a dia 3 i, en segon lloc, dissenyar l'algoritme de selecció (Meseguer et al., 2011). A més, van posar nom als paràmetres morfocinètics mesurats i, val a dir, que la majoria s'usen en la nomenclatura homogeneïtzada actual (Ciray et al., 2014; Apter et al., 2020). De les seves anàlisi van concloure que t5 és el paràmetre morfocinètic quantitatiu que més compromet al desenvolupament embrionari, juntament amb cc2. Finalment, també van tenir en compte paràmetres qualitius de la qualitat embrionària, com són les divisions abruptes, l'asimetria aberrant en estadi de 2 cèl·lules (diferència de més del 25% entre elles) i la presència d'un o més blastòmers amb multinucleació. Aquests paràmetres els van relacionar directament amb mala qualitat embrionària i, per tant, baixa probabilitat d'implantació.

A partir d'aquest algoritme com a punt d'inici és interessant veure, a través de la bibliografia publicada, com han evolucionat al llarg del temps diferents paràmetres relacionats. Això implica tant l'estudi de la morfocinètica embrionària i la busca de quins són realment els paràmetres morfocinètics que comprometen el desenvolupament embrionari com l'Algoritme de Meseguer en si mateix (Meseguer et al., 2011), així com de les validacions internes i externes que se n'han fet al respecte i els algoritmes o models similars que s'han dissenyat.

El mateix grup de Meseguer i col·laboradors van publicar una validació del seu algoritme a mode d'estudi retrospectiu multicèntric (Meseguer et al., 2012). En aquest estudi, van comparar els resultats reproductius de cicles cultivats en Embryoscope® amb els de cicles cultivats en sistemes de cultiu convencionals durant el mateix període de temps. Els autors van concloure que hi havia una millora de fins a un 9% en la taxa d'embaràs, quan els embrions es cultivaven en sistemes *time-lapse*. No obstant l'aparent atractiu dels resultats, ells mateixos a la discussió van proposar que la possible causa de la millora dels resultats reproductius podrien ser l'estabilitat de les condicions de cultiu, deixant com a una simple

opció que la millora dels resultats clínics es degui a la selecció basada en els paràmetres morfocinètics.

Seguint aquesta línia de recerca, i amb l'objectiu de validar l'algoritme de Meseguer i col·laboradors (2011), Rubio i col·laboradors (2014) van publicar un estudi prospectiu on usaven l'algoritme de Meseguer per a realitzar les seleccions embrionàries (Rubio et al., 2014). En aquest estudi prospectiu aleatoritzat van comparar els resultats reproductius de dues cohorts de més 400 pacients cadascuna. Els embrions del grup d'estudi es van cultivar en Embryoscope® i seleccionar seguint l'algoritme de Meseguer i col·laboradors i els de l'altre cohort (control) es van cultivar en incubadors convencionals i es van seleccionar només usant criteris morfològics. Rubio i col·laboradors van concloure que el cultiu en Embryoscope® augmentava la taxa d'embaràs en un 9% i la pèrdua gestacional disminuïa també significativament. Però els embrions del grup control, tot i que se'ls va aplicar únicament criteris de selecció morfològica, es van incubar en incubadors convencionals i, per tant, tampoc es pot extreure d'aquest estudi que la millora en vers els resultats reproductius fos exclusivament deguda a la selecció morfocinètica i no a les condicions de cultiu en si.

A partir d'aquest punt, es plantejaven dues preguntes rellevants. En primer lloc si la millora en els resultats reproductius que Meseguer i col·laboradors havien obtingut amb l'aplicació del seu algoritme, era realment fruit de l'anàlisi i selecció basat en la morfocinètica o era, en part o totalment, causat per les condicions favorables de cultiu proporcionades pel sistema *time-lapse* usat (Embryoscope®). En segon lloc, si un sol algoritme, dissenyat en unes condicions determinades i circumstàncies determinades, pot ser efectiu en la validació morfocinètica en altres laboratoris de FIV i per tant extrapolable a altres centres de RHA.

2.2.4.3 *Valoració de la utilitat real d'analitzar la morfocinètica embrionària per predir la probabilitat d'implantació*

Per resoldre aquestes qüestions Goodman i col·laboradors, un grup de recerca aliè al grup de Meseguer, va realitzar un estudi prospectiu aleatoritzat que comparava els resultats reproductius entre dues cohorts embrionàries, procedents d'uns 100 cicles per a cada cohort (Goodman et al., 2016). En aquest estudi ambdues cohorts es van cultivar en les mateixes condicions dins el sistema Embryoscope®, i als embrions de la cohort control no se'ls va aplicar l'anàlisi morfocinètic. Sorprenentment, els resultats de l'estudi van mostrar que no hi havia diferències significatives entre els resultats reproductius entre les dues cohorts i per tant van concloure que l'anàlisi morfocinètic, per si sol, no incrementa l'èxit reproductiu. Finalment val a dir que sí que van trobar diferències entre els resultats d'ambdues cohorts quan la morfocinètica s'usava per complementar la selecció basada en la morfologia i, per això, els autors van també apuntar que, malgrat les evidències publicades fins la data, possiblement eren necessaris més estudis per determinar si l'anàlisi de la morfocinètica embrionària millora l'èxit en els cicles de FIV i, concretament, quins són els paràmetres morfocinètics que s'han de tenir en compte a l'hora de fer aquestes avaluacions.

A banda de les validacions i els algoritmes que s'han dissenyat en base a les anàlisi i mesures realitzades amb el sistema Embryoscope®, com és el cas de l'algoritme de Meseguer (Meseguer et al., 2011), paral·lelament també s'han publicat durant l'última dècada estudis destinats a comprovar o validar l'efectivitat de les mesures morfocinètiques realitzades pels algoritmes automàtics del sistema Eeva®, que van popularitzar Wong i col·laboradors l'any 2010 (Wong et al., 2010). Per exemple, un estudi rellevant sobre el test Eeva® és el que van publicar Kieslienger i col·laboradors l'any 2016 (Kieslienger et al., 2016). Aquest va ser un estudi de cohorts prospectiu multicèntric que va incloure 280 cicles de FIV als embrions dels quals se'ls va aplicar el test Eeva® i es va comparar l'efectivitat, a l'hora de seleccionar els embrions amb més capacitat d'implantació, amb una cohort control on només s'havien usat criteris morfològics per a avaluar i seleccionar els embrions a

transferir. Els autors, van concloure que les taxes de gestació eren similars en ambdós grups i que, per tant, l'aplicació del test Eeva® no millorava els resultats reproductius.

Aquests resultats semblaven no estar a favor de la millora de resultats reproductius usant el test Eeva® com altres autors havien suggerit en estudis previs (Adamson et al., 2016; Diamond et al., 2014) i, igual que ho van fer Goodman i col·laboradors en la seva publicació (Goodman et al., 2016), “posaven també sobre la taula” la controvèrsia de si l'ús de l'anàlisi dels paràmetres morfocinètics per avaluar la qualitat embrionària és realment efectiva com a eina per predir la probabilitat d'arribar a l'estadi de blastocist o la capacitat d'implantació dels embrions.

En la mateixa línia de recerca, per tal de determinar si l'anàlisi morfocinètic per si sol incrementa l'èxit reproductiu en els cicles de FIV, Kaser i col·laboradors van publicar un estudi prospectiu aleatoritzat on també comparaven els resultats reproductius de transferir a dia 5 embrions procedents de 478 cicles de FIV, dividits en dues cohorts. Els embrions d'una d'elles havien estat avaluats i seleccionats usant només criteris morfològics mentre que els de l'altra s'havien avaluat i seleccionat usant criteris morfològics a dia 5 conjuntament amb morfocinètics fins a dia 3, a través de l'algoritme integrat del sistema *time-lapse* Eeva® (Kaser et al., 2017). El punt fort de l'estudi, a l'igual que el de Goodman (Goodman et al., 2016), és que la cohort d'embrions seleccionats només amb criteris morfològics havia estat cultivada en les mateixes condicions que la cohort seleccionada amb criteris morfocinètics. Igual que Goodman (Goodman et al., 2016), Kaser i col·laboradors no van trobar diferències significatives en els resultats reproductius analitzats, i en aquest cas la taxa de gestació y gestació a terme.

Així doncs, la polèmica de si realment l'anàlisi de la morfocinètica per si sola funciona a l'hora de millorar els resultats reproductius, seguia posant-se de manifest i es contraposava a les primeres impressions favorables que mostraven les primeres publicacions sobre l'ús dels sistemes *time-lapse*. Els autors es qüestionaven, doncs, el perquè en uns casos l'anàlisi de la morfocinètica embrionària sí que augmentava la probabilitat d'èxit reproductiu (Meseguer et al., 2012; Rubio et al., 2014), però en d'altres semblava no fer-ho (Goodman

et al., 2016) i sorgien així els dubtes de si un mateix algoritme dissenyat en un laboratori en concret, pot ser utilitzat amb la mateixa efectivitat en una altre laboratori diferent.

2.2.4.4 Transferència i reproductibilitat d'algoritmes morfocinètics i efecte de variables externes sobre el patró morfocinètic del desenvolupament embrionari

Seguint en la cerca de la resposta a aquesta qüestió i donant per fet que, d'entrada, la resposta no seria tan senzilla com podia semblar en les primeres publicacions (Meseguer et al., 2011; Wong et al., 2010), els autors s'han centrat en buscar quins deuen ser aquells paràmetres morfocinètics, ja siguin quantitius o qualitius, que realment comprometen la viabilitat embrionària i, per tant, l'anàlisi dels quals pot donar suport en la tasca de selecció embrionària de forma real i efectiva.

En aquest procés s'ha anat entenent per part de la comunitat científica que en el patró de desenvolupament morfocinètic del embrions hi intervenen també factors externs i subjectius i que, per tant, els diferents algoritmes o models proposats per diferents autors potser no funcionen en qualsevol laboratori. Aquest fet implicaria que no poden aplicar-se directament a altres clíniques de FIV sense fer-ne una validació interna prèvia, doncs les condicions de cultiu i circumstancials poden afectar al patró de desenvolupament dels embrions. En concret, s'ha arribat a posar en dubte l'aplicabilitat externa directa de l'algoritme de Meseguer (Meseguer et al., 2011) a altres laboratoris (Best et al., 2013; Freour et al., 2015; Yalçinkaya et al., 2014).

Entenent ja aquesta alta complexitat en la busca del "model o algoritme morfocinètic universal i efectiu" i sense descartar la opció que sigui una utopia dissenyar-lo, els autors han publicat els seus propis models de selecció embrionària basats en la morfocinètica així com proposat els que consideren els paràmetres clau de la selecció embrionària tot intentant eliminar l'efecte dels factors externs que afecten al patró de desenvolupament embrionari. Vegem a continuació alguns que considerem rellevants.

El patró morfocinètic dels embrions es pot veure afectat per múltiples factors (Liu et al., 2019) com són: els protocols d'estimulació ovàrica emprats i els perfils hormonals de les pacients (Muñoz et al., 2012), la concentració d'oxigen durant el cultiu (Kirstine Kirkegaard et al., 2013) o el medi de cultiu usat (Ciray et al., 2012). A causa d'aquestes possibles variacions causades per factors externs, l'aplicació dels algoritmes com el de Meseguer (Meseguer et al., 2011) a laboratoris externs és qüestionable. Un altre dels motius pels quals el patró morfocinètic dels embrions en desenvolupament es podria veure afectat és la tècnica usada per a la inseminació: FIV convencional o ICSI. Això es deu a què inseminar els oòcits amb ICSI accelera de forma artificial l'entrada de l'espermatozou dins l'oòcit i, per això, podria afectar els temps d'esdeveniments posteriors. D'altra banda, hi ha estudis que han demostrat que la presència de paràmetres morfocinètics qualitius anòmals com, per exemple, la morfologia aberrant, les divisions abruptes (Rubio et al., 2012) o les divisions inverses (Liu et al., 2016) tenen una relació directa amb la mala qualitat embrionària i la baixa capacitat d'implantar.

Amb aquesta premissa, Liu i col·laboradors (2016) van publicar un algoritme que classificava els embrions en funció de paràmetres morfocinètics qualitius i quantitius, posant com a punt de referència t_{PNf} en comptes de t_0 (moment de la inseminació), per evitar el possible efecte de la tècnica usada per inseminar sobre el patró morfocinètic. Liu i col·laboradors proposaven, doncs, un model que gradua els embrions de la F a la A, col·locant directament els embrions amb morfologia aberrant a la pitjor gradació (F) i pujant-los de categoria si no presenten criteris de mal pronòstic com, per exemple, la presència de DA i DI.

En aquest exemple d'algoritme, Liu i col·laboradors posaven de manifest que, usant paràmetres morfocinètics des-seleccionadors qualitius com la presència de DI i DA en comptes de paràmetres morfocinètics quantitius (com per exemple els temps de divisió cel·lular), podien evitar els efectes que exerceixen els factors externs (intrínsecs de cada laboratori de FIV) sobre el patró morfocinètic de desenvolupament tot aconseguint un model amb un major potencial de transferibilitat. Tot i presentar-se com una idea

interessant, en el disseny d'aquest model en concret s'havien inclòs només 270 embrions amb resultat clínic conegut i, per tant, llur validesa encara era qüestionable.

Paral·lelament, al mateix any 2016, Petersen i col·laboradors (Petersen et al., 2016) van publicar un estudi que presentava un algoritme anomenat KIDScore[®] que semblava combatre les barreres de transferència i reproductibilitat entre laboratoris i pel disseny del qual es va incloure una mostra d'embrions molt més gran que la de Liu i col·laboradors (Liu et al., 2016). Aquest algoritme es basava en el càlcul dels paràmetres morfocinètics quantitativs i tenia com a l'objectiu formular un model de selecció embrionària aplicable a totes les clíniques de FIV, independentment de les condicions, tipus de cultiu i medis utilitzats.

Els autors van realitzar un estudi multicèntric on hi van participar 24 clíniques, on es va incloure l'anàlisi morfocinètic de 3275 embrions transferits amb resultats reproductius coneguts, cultivats en diferents medis de cultiu, condicions d'oxigen, i estratègies d'inseminació, fins a dia 3 (Petersen et al., 2016). En una segona fase, un cop feta l'anàlisi i dissenyat l'algoritme, van aplicar-lo al cultiu enregistrat de 11218 embrions procedents de 31 clíniques, per veure quina capacitat tenia l'algoritme a l'hora de predir la formació del blastocist. Aquest algoritme KIDScore[®] proposava calcular els paràmetres tPNf, t2, t3 i t5 per tal d'atorgar, segons els valors obtinguts, una puntuació numèrica relativa a la cohort embrionària que qualificava els embrions del 0 al 5, essent 5 la puntuació donada als embrions amb major probabilitat d'èxit reproductiu.

Per tant, en aquest cas, Petersen i col·laboradors (2016) van aconseguir formular un algoritme que, en principi, es podia generalitzar a tots els laboratoris de FIV, sense perill de què les condicions de cultiu que afecten probablement de manera inevitable al patró morfocinètic del desenvolupament embrionari, tinguessin efecte sobre la classificació dels embrions en qüestió dins d'una mateixa cohort.

L'algoritme KIDScore® ha evolucionat durant els darrers anys, i actualment està integrat al software de l'Embryoscope Plus®. També se n'ha fet la versió d'avaluació i selecció embrionària a dia 5, el KIDScore® Day 5.

KIDScore® Day 5, va ser posat a prova per Reignier i col·laboradors recentment, en un estudi retrospectiu que va incloure 210 cicles de FIV (Reignier et al., 2019), els embrions dels quals van ser avaluats amb aquest model predictiu. Els autors van concloure que l'ús d'aquest model s'associa significativament amb l'augment de les taxes d'implantació en transferències d'un únic blastocists (eSET). Tot i així, també conclouen que el rendiment predictiu del model és encara millorable i que, donat que la valoració per part dels embriòlegs encara és imprescindible a l'hora de fer la selecció embrionària, el model en si serveix com a una eina d'ajuda en aquesta tasca.

2.2.4.5 Discussió sobre la rellevància dels paràmetres morfocinètics

Si ens fixem en quins són els paràmetres que s'han descrit al llarg dels darrers anys com a rellevants i crítics veiem una alta heterogeneïtat en revisar la bibliografia. Centrant-nos en aquest punt veiem a continuació alguns exemples de paràmetres crítics segons diferents autors.

Per exemple l'any 2015, Basile i col·laboradors, del grup de Meseguer, van incloure una nova variable al seu algoritme, la t3. Concretament, aquests autors van seguir treballant en el primer algoritme de Meseguer (Meseguer et al., 2011) i, en aquest cas, van realitzar un estudi multicèntric en el què van avaluar morfocinèticament 754 embrions per finalment dissenyar un algoritme que incloïa com a nou paràmetre de referència de la qualitat embrionària t3, juntament amb els ja existents (t5 i cc2). S'afegia així una nova variable morfocinètica (t3) crítica a tenir a en compte segons el mateix grup de recerca.

No obstant, altres autors han descrit com a crítics paràmetres completament diferents. Azzarello i col·laboradors, publicaven l'any 2012 un treball molt interessant que vinculava directament el temps de desaparició del pronuclis (tPNf) entre 23,3 i 24,9 hpi amb

l'augment de la taxa de nascut viu sa (Azzarello et al., 2012). Per tant, es centraven en esdeveniments més primerencs del desenvolupament embrionari que els proposats per exemple per Meseguer al seu algoritme (Meseguer et al., 2011). Azzarello i col·laboradors també afirmaven al seu treball que la desaparició dels pronuclis abans de les 20h 45min implica directament la no implantació o l'avortament.

Per altra banda, Aguilar i col·laboradors (Aguilar et al., 2014) també van vincular la desaparició dels PN abans de les 22,2 hpi i una extrusió massa primerenca del 2n CP (entre 1-3,2 hpi) amb una baixa capacitat d'implantació. Amb aquests treballs, es sumaven doncs més paràmetres morfocinètics rellevants a tenir en compte a l'hora de fer avaluacions morfocinètiques.

Altres autors com Dal Canto i col·laboradors publicaven un estudi l'any 2012 (Dal Canto et al., 2012) on vinculaven també les divisions "ràpides" amb la capacitat de l'embrió per arribar a blastocist o implantar, però en aquest cas els autors proposaven t7 i t8 com a paràmetres crítics. Concretament van veure que els embrions que implantaven arribaven abans a l'estat de 8 cèl·lules que els que no implantaven. Per altra banda Herrero i col·laboradors definien en la seva publicació (Herrero & Meseguer, 2013) a t5 i t8 com als paràmetres més crítics i rellevants. I més endavant Motato i col·laboradors, publicaven un estudi on anunciaven els paràmetres tM (temps d'arribada a l'estadi de mòrula), S3 i tB com els més determinants per predir la capacitat d'un embrió per implantar (Motato et al., 2016).

En conclusió, existeix en la bibliografia una gran heterogeneïtat en la determinació de quins són els paràmetres morfocinètics més rellevants per determinar amb més efectivitat la viabilitat embrionària.

En aquesta línia d'estudi i en un treball molt més recent, trobem el publicat per Barberet i col·laboradors (Barberet et al., 2019), que van realitzar per vincular els paràmetres morfocinètics amb taxa de nascut viu sa. Aquests autors van analitzar 35 paràmetres morfocinètics i morfològics de 232 embrions transferits en transferències d'un sol embrió

(eSET) amb resultat de gestació conegut. Alguns d'aquests paràmetres estaven relacionats amb el desenvolupament embrionari primerenc, la morfologia oocitària i la fecundació, i ja havien estat descrits anteriorment per altres autors (Coticchio et al., 2018; Faramarzi et al., 2017). Barberet i col·laboradors van analitzar la relació entre aquests paràmetres i l'èxit reproductiu a nivell de nascut viu, i van concloure que només hi ha dos paràmetres que es relacionen directament amb la probabilitat de nascut viu sa.

En primer lloc, la col·locació dels PN. Els autors van concloure que quan els pronuclis es localitzen centrícament en lloc de perifèricament o a una zona intermitja del zigot, la probabilitat de nascut viu sa augmenta. En la mateixa línia, Coticchio i col·laboradors (Coticchio et al., 2018) ja havien apuntat cap a una influència negativa de la col·locació perifèrica del PN masculí, hipotetitzant que el temps que aquest perdia col·locant-se centrícament podia influir en l'alentiment dels esdeveniments del desenvolupament embrionari posteriors. En segon lloc Barberet i col·laboradors van mostrar que la presència de multinucleació a l'etapa de dues cèl·lules disminueix la probabilitat de naixement viu gairebé a la meitat, coincidint amb altres autors que també apuntaven a un efecte nociu rellevant de la presència de multinucleació en els blastòmers (Desch et al., 2017; Ergin et al., 2014; Meseguer et al., 2011).

Val a dir que l'estudi de Barberet (Barberet et al., 2019) no va tenir en compte l'efecte de les divisions anòmales (directes i abruptes), principalment perquè els embrions analitzats a l'estudi eren embrions que s'havien transferit, i per tant no tenien aquestes anomalies, que Liu va presentar en el seu algoritme com a crítiques per des-seleccionar embrions a transferir (Liu et al., 2016).

2.2.4.6 Conclusions

Tota aquesta heterogeneïtat en les mesures dels paràmetres *time-lapse* conjuntament amb la controvèrsia de l'efectivitat i la reproductibilitat dels models i algoritmes *time-lapse*, queda plasmada en unes recents publicacions a mode de revisió, d'Armstrong i col·laboradors (Armstrong et al., 2018) i Liu i col·laboradors (Liu et al., 2019).

Per una banda Armstrong i col·laboradors van publicar a la llibreria Cochrane una revisió sistemàtica de la literatura sobre l'efectivitat de la millora de l'èxit reproductiu amb l'aplicació d'avaluacions amb sistemes *time-lapse*. A la revisió hi van incloure 8 estudis controlats i aleatoritzats (Goodman et al., 2016; Kahraman et al., 2012; Kaser et al., 2017; Rubio et al., 2014; Wu et al., 2016; L. Yang et al., 2018; Kovacs et al., 2013), tot ells corresponents a un total de 2303 cicles de FIV o ICSI. En els resultats de la seva revisió van concloure que no hi havia prou evidència científica en quant a la millora de l'èxit reproductiu a nivell d'embaràs i naixement viu ni quan s'usaven sistemes *time-lapse* només com a mètode d'incubació però amb selecció basada en imatges convencionals (morfologia), ni quan es comparava la selecció basada en la morfocinètica amb la basada amb la morfologia embrionària usant com a incubador un sistema *time-lapse*, ni quan es comparava l'ús del cultiu en sistema *time-lapse* amb selecció morfocinètica amb l'ús de cultiu i selecció convencional (incubador convencional i selecció per morfologia embrionària). Així, aquests autors van concloure que no hi ha suficient evidència científica al respecte, que el risc de biaix és elevat en els estudis revisats i que, per tant, es necessiten més estudis per tal d'esbrinar el grau d'efectivitat de les avaluacions i seleccions embrionàries basades en la morfocinètica realitzades amb sistemes *time-lapse* per millorar l'èxit reproductiu.

Per altra banda, Liu i col·laboradors han publicat recentment una altra revisió (Liu et al., 2019) sobre la reproductibilitat dels models i algorismes *time-lapse* entre laboratoris. Els autors conclouen, en concordança al seu algoritme publicat al 2016 (Liu et al., 2016), que els algorismes que es dissenyin basant-se en la des-selecció embrionària dins la cohort avaluada, calculant mesures de paràmetres morfocinètics qualitius (com les DA i les DI), tenen més probabilitat de poder reproduir-se amb èxit en altres laboratoris.

Fixant-nos doncs en aquest resum de com han anat evolucionant els estudis i les publicacions dels models i algorismes morfocinètics, podem extreure quatre conclusions fonamentals. En primer lloc que el model morfocinètic que s'aplica a cada laboratori està subjecte a llurs condicions intrínseques i que, per tant, tot i que s'han proposat "models

universals” (Petersen et al., 2016), idealment cada laboratori hauria d’usar i validar el seu propi model o algoritme d’avaluació i selecció. En segon lloc que, observant la literatura, queda clar que de moment no hi ha uns paràmetres clarament preferents a l’hora d’establir quins són més crítics i que comprometen més el desenvolupament embrionari. En tercer lloc, que la funcionalitat o utilitat de la selecció embrionària basada en la morfocinètica, segueix sent qüestionable i probablement el grau de funcionalitat està subjecte al tipus de cohort embrionària que s’està analitzant (nombre d’embrions a avaluar, qualitat morfològica, etc.). I en últim lloc que, per ara, el que sí es pot afirmar és que l’anàlisi de la morfocinètica embrionària i el cultiu en sistemes *time-lapse* és capaç de millorar d’una manera o altra l’èxit reproductiu, ja sigui només per l’estabilitat del cultiu en els incubadors *time-lapse*, o bé perquè l’anàlisi del desenvolupament embrionari a través d’aquests sistemes permet complementar l’avaluació de la morfologia embrionària.

2.2.5 Aplicacions, avantatges i limitacions de l’avaluació de la morfocinètica embrionària en clínica

2.2.5.1 Aplicacions actuals de time-lapse en la pràctica clínica

Gràcies al cultiu dels embrions en els sistemes *time-lapse* sofisticats actuals, l’avenç en el coneixement del desenvolupament embrionari preimplantacional ha fet un gran salt. Aquests sistemes han permès estudiar als embrions des de punts de vista que abans eren impossibles d’assolir.

Tot i que la recerca en vers els algoritmes i models morfocinètics predictius encara és jove, l’avenç en el coneixement de la morfocinètica embrionària ha permès entendre amb més profunditat la capacitat d’implantació i la viabilitat dels embrions. Això, aplicat a la clínica, ha permès assolir millors resultats reproductius en molts casos, optimitzar els cultius embrionaris i millorar la selecció, per part dels embriòlegs, dels embrions a transferir (Campbell et al., 2013; Cruz et al., 2012; Dal Canto et al., 2012; K. Kirkegaard et al., 2013; Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010).

Les principals aplicacions dels sistemes *time-lapse* són:

- Cultiu continu i estable dels embrions al laboratori de FIV
- Enregistrament del desenvolupament embrionari
- Anàlisis i selecció d'embrions segons la morfocinètica embrionària en el laboratori de FIV
- Adequació del moment favorable per a fer biòpsia de trofocodermia en cicles de TGP
- Reforçament de les decisions clíniques preses segons criteris morfològics
- Visió més ampla de punts de vista del desenvolupament embrionari clínicament crítics, com per exemple la valoració de la fecundació
- Comprovació de la simetria de divisió cel·lular
- Visualització i avaluació de paràmetres morfocinètics qualitius com divisions abruptes o divisions directes (DA i DI)
- Visualització d'esdeveniments dinàmics del desenvolupament embrionari
- Obtenció de bases de dades molt detallades sobre el desenvolupament dels embrions al laboratori de FIV per establir controls de qualitat
- Possibilitat de mesurar la qualitat morfocinètica dels embrions o gàmetes inseminats sotmesos, per indicació clínica, a alguna tècnica al laboratori de FIV

2.2.5.2 Avantatges i limitacions del *time-lapse* en la pràctica clínica

Si es comparen el cultiu embrionari al laboratori de FIV utilitzant sistemes convencionals (incubador convencional i avaluacions al microscopi invertit) amb el cultiu embrionari utilitzant sistemes *time-lapse*, es troben avantatges relacionats especialment amb la millora del cultiu, la selecció embrionària i la qualitat de les observacions per part dels embriòlegs, ja que són moltes les noves observacions que permet fer la tecnologia *time-lapse*.

Per exemple, el cultiu en sistemes *time-lapse* permet entre d'altres:

- Fer un control del comptatge cel·lular i la simetria de divisió més acurat.

- Distingir millor entre fragment i cèl·lula
- Veure el comportament dels fragments: com es reabsorbeixen o mouen dins l'embrió
- Observar la fusió de pronuclis
- Veure l'inici de fenòmens del desenvolupament com la compactació i la cavitació

La gestió per part de l'embriòleg de tota aquesta nova informació és molt més complexa que en les valoracions morfològiques tradicionals, ja que requereix de més temps per recaptar-la i de més coneixements per avaluar-la.

Últimament, les noves tecnologies acosten a l'embriòleg cada cop més a l'automatització de les avaluacions dels paràmetres bàsics morfològics i morfocinètics dels embrions que es cultiven en sistemes *time-lapse*. Malgrat tot, els softwares actuals, tot i que ajuden en cert grau a l'embriòleg, encara no són capaços de comptabilitzar i avaluar correctament determinats paràmetres com per exemple la taxa de fragmentació embrionària o les divisions anòmales.

Així doncs, aquests sistemes encara poden cometre errors en la interpretació automàtica dels esdeveniments del desenvolupament embrionari, especialment en embrions fragmentats o que no es desenvolupen seguint una simetria correcte. Per tant la verificació, correcció i gestió d'informació per part de l'embriòleg és més complexa tant en cost de temps com en coneixements.

Dit d'altra manera, l'anàlisi morfocinètica requereix de l'avaluació visual per part de l'embriòleg de tot el vídeo de desenvolupament de l'embrió. Això és així perquè, quan es realitza l'anàlisi morfològica convencional, només es realitza una observació al dia aproximadament. Amb l'anàlisi morfocinètica en canvi, és realitza tant l'avaluació morfològica de l'aparença de l'embrió a determinades hores de l'avaluació, com l'anàlisi dels paràmetres morfocinètics.

No obstant això, és obvi que el cultiu en sistemes *time-lapse* ofereix múltiples avantatges (taula 6), com s'ha comentat anteriorment relacionats especialment amb l'augment d'informació i la millora del cultiu.

Avantatges del cultiu amb sistemes *time-lapse* i d'avaluació morfocinètica:

- Avaluacions dinàmiques que permeten obtenir molta més informació
- Avaluacions més específiques i acurades
- Millora de resultats reproductius
- Cultiu continu, ja que no s'han de treure els embrions de l'incubador per avaluar-los
- Possibilitat de sumar l'avaluació morfocinètica amb l'avaluació morfològica
- Possibilitat de prendre decisions clíniques sustentades en models predictius o algoritmes preestablerts
- Flexibilitat horària per a l'embriòleg, sense risc de perdre la informació del cultiu, ja que aquest queda enregistrat

No obstant això, com s'ha comentat anteriorment, les avaluacions amb sistemes *time-lapse* també presenten certs inconvenients:

- Cost de temps: avaluacions més llargues i complexes
- Cost en coneixements: formació especialitzada en cultius *time-lapse* (personal més qualificat o format, ja que ha d'estar familiaritzat amb diferents sistemes d'avaluació embrionària)
- Cost econòmic elevat donat a la necessitat de tenir al laboratori equips *time-lapse*

	Valoració morfològica	Valoració morfocinètica
Cost econòmic	Baix	Alt
Cost en temps d'avaluació	Baix	Alt
Cost en formació de l'embriòleg	Estàndard	Estàndard
Estabilitat de condicions de cultiu	Baix-Desfavorable- Discontinu	Alt-Favorable-Continu
Eficiència d'avaluació	Limitada-Estàtica	Alta-Continua
Flexibilitat horària per embriòleg	Baixa	Alta
Possibilitat de combinar ambdues	No	Si

Taula 6. Comparativa d'avantatges i limitacions entre el cultiu convencional amb avaluacions morfològiques clàssiques i l'ús de la tecnologia *time-lapse* al laboratori de FIV.

2.2.6 Aplicacions de l'avaluació de la morfocinètica embrionària en recerca clínica i bàsica

Fins a dia d'avui s'han pogut realitzar i publicar estudis concrets que avaluen fenòmens determinats que abans només podien observar-se en moments puntuals, de manera estàtica. Per exemple, gràcies als sistemes *time-lapse* s'han pogut descriure nous paràmetres relacionats amb la fecundació (G. Coticchio et al., 2018). D'altra banda s'ha estudiat també la morfocinètica dels pronuclis durant la fecundació, trobant una relació entre el temps de desaparició (tPNf) i la taxa de nascut viu (Azzarello et al., 2012). I finalment, també s'han publicat estudis que relacionen el col·lapse dels blastocists amb la capacitat d'implantació (Marcos et al., 2015), entre d'altres.

Per altra banda, també hi ha múltiples estudis que han usat els sistemes *time-lapse* per valorar la morfocinètica dels embrions en funció de determinades variables o factors d'exposició sobre els mateixos embrions o els gàmetes d'origen. Per exemple, Walls i col·laboradors i Roesner i col·laboradors van avaluar com afectava la maduració *in vitro* d'oòcits sobre la morfocinètica dels embrions derivats, i van concloure que aquesta no es veia afectada per aquesta variable d'exposició sobre els oòcits (Roesner et al., 2017; Walls et al., 2015).

D'altra banda, estudis recents han avaluat l'efecte de l'edat paterna i l'ús d'esperma congelat sobre la morfocinètica dels embrions derivats sense trobar-ne relació (Lammers et al., 2015; Rosário et al., 2016).

També s'han publicat treballs que indiquen que els embrions derivats de cicles on s'han usat espermatozous amb mobilitat no progressiva i/o la cromatina afecta, o bé s'han usat mostres seminals amb taxes de fragmentació del DNA elevades, mostren una velocitat enlluentida del desenvolupament embrionari (Esbert et al., 2018; Mangoli et al., 2018).

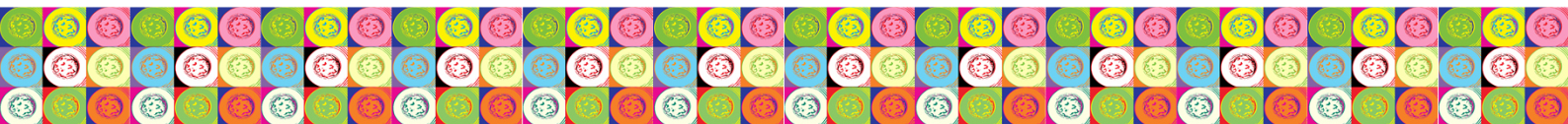
Finalment com a exemples, altres estudis han avaluat la viabilitat embrionària usant la morfocinètica en funció de determinades condicions de cultiu com ara la utilització de

medis continus en comparació amb els discontinus (Ciray et al., 2012) o la concentració d'oxigen (Kirstine Kirkegaard et al., 2013). Aquests estudis conclouen que la morfocinètica de desenvolupament embrionari varia entre l'ús de medis únics o seqüencials (Haydar Nadir Ciray et al., 2012) i que els embrions cultivats en condicions atmosfèriques (20% d'O₂) mostren un desenvolupament embrionari, abans de la compactació, més lent que els que es cultiven a 5% d'O₂.

En conclusió, l'anàlisi de la morfocinètica embrionària com a criteri de qualitat embrionària s'usa actualment per avaluar els possibles efectes de determinats paràmetres o factors d'exposició sobre la qualitat dels embrions.

En la present tesi doctoral, s'ha usat el time-lapse per avaluar com afecta la vitrificació d'oòcits i la activació oocitària assistida (AOA) sobre la morfocinètica dels embrions resultants i per tant sobre la seva qualitat i viabilitat.

OBJECTIUS

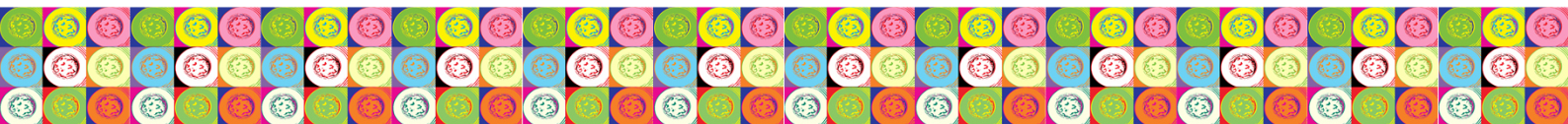


El principal objectiu d'aquesta tesi doctoral és usar la tecnologia *time-lapse* per determinar el patró morfocinètic dels embrions derivats d'oòcits sotmesos a determinats factors d'exposició al laboratori de FIV.

Per tal d'aconseguir l'objectiu principal s'han plantejat els següents objectius parcials:

1. Avaluar la fiabilitat de les mesures preses amb sistemes *time-lapse* entre diferents observadors (avaluar la concordança inter-observador).
2. Avaluar la fiabilitat de les mesures preses amb sistemes *time-lapse* per un mateix observador en diferents moments (avaluar la concordança intra-observador).
3. Avaluar si el grau d'experiència de l'observador influeix sobre la fiabilitat de les mesures preses amb sistemes *time-lapse*.
4. Avaluar la fiabilitat de les mesures preses amb sistemes *time-lapse* en funció del paràmetre morfocinètic mesurat.
5. Determinar l'efecte de la vitrificació dels oòcits inseminats sobre el patró morfocinètic dels embrions derivats i en funció del paràmetre morfocinètic mesurat.
6. Determinar l'efecte de l'aplicació de la tècnica d'activació oocitària assistida (AOA) als oòcits inseminats, sobre el patró morfocinètic dels embrions derivats i en funció del paràmetre morfocinètic mesurat.

RESULTATS



1 Alta fiabilitat de les anotacions preses entre diferents embriòlegs

Com ja s'ha comentat anteriorment, un dels criteris bàsics per avaluar la qualitat del funcionament d'un laboratori de FIV és la valoració de la qualitat dels embrions que s'hi cultiven, juntament amb els resultats reproductius. Per tant, assegurar que les mesures de viabilitat embrionària per part dels embriòlegs s'estan donant de manera fiable és d'importància cabdal (Apter et al., 2020; Racowsky et al., 2010).

Així, la subjectivitat intrínseca del procés d'avaluació introduïda pel propi embriòleg que analitza la qualitat embrionària podria afectar al resultat de l'avaluació (Kottner et al., 2011; Kottner & Streiner, 2011) i, per tant, els resultats reproductius del propi laboratori. És per això que és important valorar fins a quin punt les avaluacions morfològiques i morfocinètiques del desenvolupament embrionari que es fan dins el laboratori de FIV no són **observador-dependent**. Si ho fossin, significaria que els criteris i valors de viabilitat no són fiables ni reproduïbles.

Amb l'objectiu de valorar la fiabilitat de les avaluacions basades en la morfologia, trobem ja estudis publicats que avalen la fiabilitat de les mesures preses entre diferents embriòlegs (Arce et al., 2006; Baxter Bendus et al., 2006; Paternot et al., 2011).

En aquest sentit, la present tesi doctoral inclou un estudi sobre la fiabilitat de les mesures preses amb els sistemes *time-lapse*.

En aquest estudi, per quantificar la fiabilitat de les mesures realitzades amb *time-lapse*, s'ha utilitzat el mètode del càlcul de la proporció de variabilitat entre analistes, o coeficient de correlació intraclasse (CCI), que és l'índex estadístic que s'ha d'usar per a mesurar la fiabilitat d'aquest tipus de mesures associades a variables quantitatives contínues (Bland & Altman, 1990; P E Shrout & Fleiss, 1979).

Els valors dels resultats del càlcul de CCI oscil·len entre 0 (absència de concordança) i 1 (concordança absoluta), presentant-se així com a les proporcions de variabilitat entre avaluadors (taula 7).

Valor CCI	Lectura o significat
<0,4	Concordança baixa
0,40-0,75	Concordança regular o bona
>0,75	Concordança excel·lent

Taula 7. Interpretació dels valors de CCI, Bland et al., 1990.

Com a fruit d'aquest estudi es va publicar l'article científic que es mostra a continuació, a la revista *Human Reproduction Open* l'any 2018, titulat *High reliability of morphokinetic annotations among embryologists* (Martínez et al., 2018) (Hum Reprod Open. 2018 May 29;2018(3):hoy009. doi: 10.1093/hropen/hoy009. eCollection 2018.Hum Reprod Open. 2018. PMID: 30895250).

High reliability of morphokinetic annotations among embryologists

Hum Reprod Open. 2018 May 29;2018(3):hoy009. doi: 10.1093/hropen/hoy009.

M. Martínez¹, J. Santaló², A. Rodríguez¹, R. Vassena¹

¹Eugin, Calle Balmes 236, Barcelona 08006, Spain

²Departamento de Biología Celular, Fisiología en Inmunología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

SUMMARY

STUDY QUESTION

Are morphokinetic measurements of time lapse-videos of human embryos comparable among operators?

SUMMARY ANSWER

There is little variation among morphokinetic measurements taken by different operators when analyzing the same time lapse-videos of human embryos.

WHAT IS KNOWN ALREADY

Morphokinetic analysis of preimplantation embryo development is a complementary method of embryo assessment increasingly used in IVF laboratories. Time-lapse videos of embryo development are normally viewed by trained embryologists and annotated with the times when specific developmental events occur. Such annotations form the basis of embryo selection algorithms, used to rank the embryos for transfer (ET). It is unknown whether the reliability of morphokinetic annotations is related to the morphological characteristics of the analyzed embryo or to the ability of the embryologists performing the annotation. One study so far reported the reliability of morphokinetic annotations among 3 embryologists using the time-lapse system (TLS), but larger studies with different setups are needed to address this issue further.

STUDY DESIGN, SIZE, DURATION

Prospective study was carried out between October 2015 and June 2016. Six embryologists with various degrees of experience in static, morphology-based evaluation, individually annotated the same 93 videos of preimplantation development, corresponding to 18 IVF/ICSI cycles, recorded with a TLS.

PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTING, METHODS

Times of second polar body extrusion, appearance and disappearance of pronuclei, and embryo cleavages (times from 2-cell to 5-cell stage: t2, t3, t4, t5) were annotated. Each embryologist was blinded to the annotations of the others. Intra- and inter-observer agreement was evaluated by computing intra-class correlation coefficients (ICCs).

MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE

In the inter-observer analysis, most ICCs obtained were higher than 0.80, indicating a high level of agreement: t2: 0.93; t3: 0.80; t4: 0.89; t5: 0.89; disappearance of two pronuclei: 0.98. However, the ICCs obtained for second polar body extrusion and the appearance of two pronuclei annotations was lower: 0.51 and 0.63, respectively, indicating an average level of agreement. The ICCs obtained from the intra-observer analysis were also higher than 0.80 (t2: 0.96; t3: 0.89; t4: 0.88; t5: 0.86; disappearance of two pronuclei: 0.96). The ICCs obtained from second polar body extrusion and the appearance of two pronuclei annotations was 0.77 and 0.66 respectively. These results indicate that developmental timings, annotated in time-lapse videos, are highly reliable both within and among observers.

LIMITATIONS, REASONS FOR CAUTION

The events at the developmental stages from 6-cells to blastocyst were not evaluated; since some morphokinetic algorithms use times past the 6-cell stage in their calculations, further studies should be carried out to understand the variations among observers in these cases.

WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS

Time-lapse measurement should be as objective as possible, especially for the first embryo cleavages, because they are often measured to define algorithms to assess the embryonic

implantation potential. Our results show that measurements using this particular TLS are consistent and reliable both within and among operators.

Study funding/competing interest(s): None.

Trial registration number: Not applicable.

INTRODUCTION

Time lapse systems (TLS) have been introduced in many IVF laboratories around the world in the last few years, in order to analyze the embryo morphokinetic development with the objective to increase the pregnancy rates in IVF cycles (Meseguer et al., 2011; Motato et al., 2016; Storr et al., 2015) by selecting the embryos with the highest implantation potential for transfer. In addition to providing further information about embryonic development, TLS allows for culturing the embryos undisturbed in the incubator. Nevertheless, recently TLS diagnostic usefulness has been questioned by several authors (Armstrong et al., 2015; Kirstine Kirkegaard et al., 2015; Polanski et al., 2014; Racowsky et al., 2015). Although the time-lapse analysis seems to be a simple task, it remains so far a subjective assessment, which could lead to variability in the morphokinetic evaluation of embryos. To standardize this field, proposals of standard nomenclature used in the TLS (Ciray et al., 2014) as well as intra- and inter- observer variability checks of the morphokinetic parameters of embryonic development annotations using Embryoscope® {Sundvall, 2013 #10} have been put forward. These are important because both intra- and inter-observers heterogeneity could bias the annotations, potentially impacting the morphokinetic analysis results. Most TLS annotations are still embryologist-dependent and manually recorded, and therefore can be biased by subjectivity of the embryologist. The aim of this study is to evaluate the intra- and inter- observer reliability of the morphokinetic annotations of embryonic development and assess whether embryology experience and/or embryo morphology play a role in its definition.

MATERIALS AND METHODS

Study design and ethical approval

This is a prospective study performed between October 2015 and June 2016, where 6 embryologists evaluated the videos of 93 developing human embryos from 18 IVF cycles. The cycles included were randomly selected among all cycles performed within the study period. Written informed consent was obtained from each embryologist participating in the study. Ethical approval of the Ethics Committee for Clinical Research of Clínica EUGIN was obtained before the implementation of the study.

Characteristics of embryologists

Six clinical embryologists participated in the study; four senior embryologists (A-D) each with 6-11 years of experience in conventional embryo morphology-based evaluation, and the two junior embryologists of the laboratory team (E-F) each with 1-2 years of experience. The senior embryologists (A-D) had performed more than 2000 embryo transfer (ET) selections and morphological evaluations throughout their career, while juniors (E-F) had performed around 400 ET selections each. Except for embryologist A, none had ever performed an embryo evaluation with TLS before their participation in the study. The demographic characteristics of embryologists are described in Table I.

Characteristics of the analyzed embryos

The 93 embryos included in the study were derived from oocyte donation cycles fertilized by ICSI with either partner or donor sperm. Oocyte donors were 23 to 29 years old and all semen samples used were normozoospermic (World Health Organization, 2010). Embryo morphological score and cycle reproductive outcomes were not taken into account for inclusion, so the embryo analysis was carried out on embryos with differing morphology and implantation potential. Morphological embryo quality of the embryos ranged from 1 to 10 (Coroleu et al., 2006).

Table I. Demographic characteristics of the participant embryologists.

	Age (years)	Working experience (Years)
Senior Embryologists		
A	34	10
B	32	6
C	38	13
D	32	10
Junior Embryologists		
E	26	2
F	25	2

Primo Vision® System procedures

Primo Vision® (Vitrolife, Göteborg, Sweden) captured a bright field image of the embryos every 5 minutes, and an additional scan (11 focal planes over a 100-µm scan range) every 20 minutes. The two Primo Vision® microscopes used in the study were placed in incubator at 37°C, 6% CO₂, and 95% relative humidity. Embryo development videos were recorded by Primo Vision Capture®, and the time-lapse operators annotated the videos using Primo Vision Analyzer® (Vitrolife, Göteborg, Sweden).

An initial theoretical class was provided to all participating embryologists with the aim of standardizing the knowledge of TLS among the operators. This class was provided by the main investigator (embryologist A) and lasted 90 minutes. Topics discussed were the operation of the Primo Vision® System, how to perform embryo culture using TLS, and how to record and annotate developmental events.

Morphokinetic data collection

The morphokinetic timing nomenclature was revised before the start of data collection, based on the guidelines of Ciray et al. (2014). Time from ICSI (t₀) to each developmental event was calculated as the time when the first oocyte of the cohort was injected (the injection of the entire cohort was completed in less than 10 minutes in all cases), and each developmental event was determined for each time-lapse recording. The analyzed events were extrusion of the second polar body (tPB2), pronuclei appearance (tPN), pronuclear breakdown (tPNf), and division to 2-cell through 5-cell stages (t₂-t₅). These events are described in Table II.

Statistical analysis

Inter-observer reliability of TLS measurements was performed using the assessments of each embryologist A-F. The intra-observer reliability was performed using two assessments

of the embryologist A: the initial one and an additional measurement repeated six months later.

Inter-observer and intra-observer intra-class correlation coefficient (ICC) for single measures using an absolute agreement were calculated for each proposed morphokinetic parameter. The ICC values were interpreted according (P E Shrout & Fleiss, 1979) as: >0.8 as a high-perfect agreement; 0.7-0.8 as a good agreement; 0.5-0.6 as a regular-moderate agreement; 0.2-0.4 poor-fair agreement.

In addition, the inter-observer analysis was stratified in two groups according to the working experience of the embryologist (senior or junior) and in three groups of embryo morphological quality according to Coroleu et al. (Coroleu et al., 2006). High quality was defined as embryos with score from 8 to 10, medium quality as embryos with score 7, and low quality as embryos with quality equal or lower than 6.

Table II. Description and definition of the morphokinetic parameter analyzed in human embryos.

Morphokinetic parameter	Description	Definition
tPB2	Extrusion of the second polar body	*Time when the second polar body is completely detached from the oolemma
tPN	Appearance of pronuclei	*Time when fertilization status is confirmed
tPBf	Pronuclear breakdown	*Time of pronuclei disappearance
t2	First cleavage division	Cleavage from zygote to 2–cell stage embryo
t3	Second cleavage division	Cleavage from 2–cell to 3-cell stage embryo
t4	Third cleavage division	Cleavage from 3–cell to 4-cell stage embryo
t5	Fourth cleavage division	Cleavage from 4–cell to 5-cell stage embryo

Definitions based on the guidelines proposed by Ciray et al., 2014.

RESULTS

Inter-observer analysis

In the inter-observer analysis, most ICCs obtained were higher than 0.80, indicating a high level of agreement among embryologists, with the highest value being 0.98 for pronuclei breakdown (tBPN). However, the ICCs obtained for the second polar body extrusion (t2PB) and the appearance of two pronuclei (tPN) were lower, at 0.51 and 0.63, respectively, indicating a moderate agreement. The 3-cell stage was recorded by all embryologists in just 14 embryos. We think that this could be due to the short duration of the 3-cell stage, and to the fact that embryologists were unwilling to annotate an event if they felt unsure about its exact timing. The complete results for the inter-observer analysis are described in Table III.

The stratified analyses showed that the ICCs obtained do not change with either the experience in morphology-based embryo scoring of the embryologist (Table IV), or with the morphological score of the annotated embryos (Table V).

Intra-observer analysis

Most ICCs obtained from the intra-observer analysis were higher than 0.80. The lowest value was obtained from t2PB and tPN, at 0.77 and 0.66, respectively, indicating a good agreement. The results for the intra-observer analysis are presented on Table VI.

Table III. Inter-observer intra-class correlation coefficient for single measures using an absolute agreement definition for the analyzed morphokinetic parameter in human embryos.

Morphokinetic parameter	ICC (95% CI)	analyzed embryos (n)	Level of concordance
Extrusion of the second polar body (tPB2)	0.516 (0.381-0.661)	54	Regular-Moderate
Appearance of pronuclei (tPN)	0.631 (0.541-0.720)	75	Moderate-Good
Pronuclear breakdown (tBPN)	0.980 (0.972-0.986)	73	High-Perfect
First cleavage division (t2)	0.933 (0.908-0.953)	74	High-Perfect
Second cleavage division (t3)	0.804 (0.650-0.920)	14	High-Perfect
Third cleavage division (t4)	0.892 (0.850-0.926)	63	High-Perfect
Fourth cleavage division (t5)	0.891 (0.849-0.926)	52	High-Perfect

ICC and level of concordance according the intra-class correlation coefficient (P E Shrout & Fleiss, 1979). The inter-observer intra-class correlation coefficient (ICC) values were interpreted according Shrout and Fleiss (1979) as: > 0.8 as a high-perfect agreement; 0.7- 0.8 as a good agreement; 0.5-0.6 as a regular-moderate agreement; 0.2-0.4 poor-fair agreement.

Table IV. Inter-observer ICC for single measures using an absolute agreement definition (ICCa) for analyzed morphokinetic parameters stratified according to embryologist experience in embryo morphological analysis.

Morphokinetic parameter	Senior embryologist analyzer		Junior embryologist analyzer	
	ICC (95% CI)	analyzed embryos (n)	ICC (95% CI)	analyzed embryos (n)
Extrusion of the second polar body (tPB2)	0.40 (0.43-0.57)	41	0.27 (0.06-0.46)	81
Appearance of pronuclei (tPN)	0.46 (0.81-0.62)	85	0.61 (0.45-0.79)	83
Pronuclear breakdown (tBPN)	0.90 (0.92-0.96)	83	0.98 (0.97-0.99)	83
First cleavage division (t2)	0.93 (0.91-0.96)	80	0.89 (0.83-.093)	81
Second cleavage division (t3)	0.76 (0.56-.094)	14	0.91 (0.87-0.94)	74
Third cleavage division (t4)	0.88 (0.83-0.92)	71	0.95 (0.88-0.95)	75
Fourth cleavage division (t5)	0.87 (0.82-0.92)	58	0.72 (0.57-0.82)	64

The ICC values were interpreted according to Shrout and Fleiss (1979) as: > 0.8 as a high-perfect agreement; 0.7- 0.8 as a good agreement; 0.5-0.6 as a regular-moderate agreement; 0.2-0.4 poor-fair agreement.

Table V. Inter-observer ICCs for single measures using an absolute agreement definition (ICCa) for analyzed morphokinetic parameters stratified according to embryo morphological scores.

Morphokinetic parameter	High score embryos		Medium score embryos		Low score embryos	
	ICC (95% CI)	n	ICC (95% CI)	n	ICC (95% CI)	n
Extrusion of the second polar body	0.67 (0.48-0.85)	14	0.017	12	0.74 (0.99-0.99)	12
Appearance of pronuclei	0.43 (0.24-0.648)	23	0.51 (0.33-0.69)	30	0.7 (0.53-.97)	18
Pronuclear breakdown	0.96 (0.93-0.98)	23	0.98 (0.95-0.99)	31	0.96 (0.61-0.92)	15
First cleavage division	0.99 (0.99-1.0)	24	0.85 (0.77-0.91)	30	0.99 (0.54-0.96)	17
Second cleavage division	0.7 (0.17-1.0)	2	0.78 (0.515-0.95)	6	0.8 (0.54-0.90)	5
Third cleavage division	0.87 (0.78-0.93)	20	0.99 (0.99-0.99)	29	0.78 (0.53-0.85)	12
Fourth cleavage division	0.91 (0.85-0.96)	19	0.91 (0.86-0.95)	27	0.8 (0.92-0.98)	6

The embryo morphology scores were calculated according to Coroleu et al. (2006). Embryo scores were stratified as: high score (8 to 10), medium score (7) and low score (lower than 7). ICCa values were interpreted according ShROUT and Fleiss (1979) as: > 0.8 as a high to perfect agreement; 0.7- 0.8 as a good agreement; 0.5-0.6 as a regular to moderate agreement; 0.2-0.4 poor to fair agreement.

Table VI. Intra-observer ICC for single measures using an absolute agreement definition (ICCa) for the morphokinetic parameters analyzed.

Morphokinetic parameter	Inter ICC (95% CI)	n	Level of concordance
Extrusion 2nd polar body	0.774 (0.625-0.860)	84	Moderate-Good
Appearance of pronuclei	0.667 (0.552-0.772)	89	Moderate-Good
Pronuclear breakdown	0.965 (0.948-0.977)	89	High-Perfect
First cleavage division	0.962 (0.931-0.977)	88	High-Perfect
Second cleavage division	0.894 (0.840-0.930)	83	High-Perfect
Third cleavage division	0.884 (0.825-0.924)	80	High-Perfect
Fourth cleavage division	0.860 (0.771-0.915)	65	High-Perfect

The ICCa values were interpreted according to Shrout and Fleiss (1979) as: > 0.8: high-perfect agreement; 0.7- 0.8: good agreement; 0.5-0.6: regular-moderate agreement; 0.2-0.4: poor-fair agreement.

DISCUSSION

Embryo quality is a determining factor in IVF success and is usually evaluated through observation of embryo morphology at fixed times (Coroleu et al., 2006). TLS allows the continuous monitoring of development and a determination of the exact times of embryological events (Conaghan et al., 2013; Meseguer et al., 2011, 2012; Paternot et al., 2011; Petersen et al., 2016).

However, the embryologist subjectivity is known to inform the morphology-based assessments when performed at fixed times, thereby affecting the selection for ET (Arce et al., 2006; Baxter Bendus et al., 2006; Paternot et al., 2011). In the same way, subjectivity could affect TLS evaluations, as morphokinetic analysis is largely based on operator annotations with the exception of those TLS that provide automated analysis (Wong et al., 2010).

Since most embryo selection algorithms are based on the timings of the early cell cycles (Conaghan et al., 2013; Meseguer et al., 2011, 2012; Paternot et al., 2011; Petersen et al., 2016) we took into account the annotations from zygote through the 5-cell stage.

Our results show a good agreement in the first cleavage annotations within embryologists, reaching an ICC of 0.80, similar to what reported by Shrout and Fleiss (1979), indicating that these annotations are reliable across different TLS. Moreover, our findings are overall in agreement with a previous study, reporting a good inter-observer concordance for TLS annotations (Sundvall et al., 2013). In the same way, we stratified our analysis by the level of experience of the embryologists to test if the seniority (and hence experience) of the embryologist affects their morphokinetic evaluations. We show that the morphokinetic parameters associated with the timing of the embryo cleavages to the 5-cell stage, timings often used in TLS algorithms (Meseguer et al., 2011), do not seem to be affected by the training of the embryologist. Furthermore, we assessed embryos of varying morphological scores, and we show that the inter-observer concordance does not change with the embryo

score. Finally, we included a higher number of observers in comparison to the available literature, which results in a more robust analysis of inter-observer correlations.

Independently from the possible and still debated use of these annotations to “select in” embryos for transfer, TLS have an immediate use in “selecting out” embryos with developmental alterations that might escape static observation. Events such as the tPB2, tPN, and tPNB are particularly critical in order to identify, for instance, abnormal fertilization, and are therefore of independent relevance to the embryologist. We report a high inter- and intra-observer ICCs (>0.90) for tPNB variability indicating high reliability. In the tPN estimates variability analysis, the ICCs obtained decreased to 0.63 and 0.66 for de inter and intra-observer reliability analysis, respectively, indicating a moderate-good degree of agreement within and between observers. This decrease may be due to the difficulty in interpreting the presence of the two pronuclei with the software used, combined with the inability to move the embryo around in order to obtain the clearest possible plane of vision.

For the variability analysis of tPN and tPNB, our results are in agreement with a previous report which show a good level of concordance both within and among observers (Sundvall et al., 2013). Nevertheless, no study so far evaluated the variability of tPB2, and the presence of two polar bodies is another parameter to consider in the evaluation of the correct fertilization. In the intra-observer analysis, the ICC obtained from this event was 0.77, indicating a good degree of reliability. But in the inter-observer analysis the ICC resulted in 0.51, indicating a regular-moderate degree of concordance, which further decreased to 0.27 when the embryologists were juniors. These results indicate that the annotation of this event is affected by both the embryologist subjectivity and level of training. In general, the visualization of tPB2 extrusion in TLS is difficult compared to other events such as the first cleavage, possibly related to the second polar body size, the slightly inferior quality of the image, which is not as crisp as in some inverted microscopes, and the difficulty in placing the focus on the appropriate plane to observe the polar body.

We think that these results are relevant because, although not described in morphokinetic algorithms, tPB2 has been associated with embryonic aneuploidy (Chawla et al., 2014), and live birth outcomes (Azzarello et al., 2012).

Finally, although the ICCs obtained (except for tPB2) show a good reliability in the annotation of proposed events, our result with tPB2 indicate that we should be cautious in applying time-lapse imaging to analyse certain developmental events. We should be aware that some variability among embryologists exists and take this into account if we were to include such morphokinetic parameters in clinical decisions or selection algorithms.

We recognize some limitation in this study: the inclusion of two junior embryologists might have provided too small a sample, and we only evaluated preimplantation embryo development up to the third cell cycle. Time to compaction or time to blastocyst formation have not been calculated, hence further studies will be needed to investigate the possible variability of these time-lapse annotations, as well as other morphokinetic parameters.

**2 La vitrificació d'oòcits no afecta als temps
primerencs del desenvolupament embrionari
després d'ICSI en pacients de menys de 30 anys**

La vitrificació d'oòcits s'utilitza en la RHA per a la preservació de la fertilitat (Alvarez et al., 2014; Donnez & Dolmans, 2013), per acumular oòcits en pacients amb baixa resposta a l'estimulació ovàrica (Tsafrir et al., 2015), i per evitar la síndrome d'hiperestimulació ovàrica (SHO).

Aquest mètode consisteix en aplicar mètodes de criopreservació ultra ràpida sobre els oòcits, aplicant protocols d'immersió en medis rics en crioprotectors. A diferència dels antics mètodes de criopreservació lents, en aquests procediments l'aigua intracel·lular no té temps de sortir de l'espai intracel·lular i queda atrapada dins les cèl·lules formant un sòlid no cristal·lí (vidre) on queden integrades les estructures cel·lulars sense destruir-se (Kuwayama, 2007; Vajta & Kuwayama, 2006).

Les taxes de supervivència i de fecundació en oòcits vitrificats són altes, sobretot comparant-les amb els antics mètodes de criopreservació, i les taxes d'embaràs clínic i de nen nascut viu són similars quan es transfereixen embrions procedents d'oòcits vitrificats o procedents d'oòcits frescos (Cobo et al., 2014; Solé et al., 2013). Però no obstant els bons resultats, hi ha estudis que qüestionen la qualitat dels oòcits desvitrificats així com la dels embrions derivats (Coticchio et al., 2009).

Per aquesta raó, en la present tesi doctoral es presenta un estudi que avalua la morfocinètica dels embrions que deriven d'oòcits vitrificats utilitzant l'anàlisi de la morfocinètica embrionària. Com a fruit d'aquest estudi es va publicar un article científic a la revista *Molecular development and reproduction* l'any 2016, titulat "Oocyte vitrification does not affect early developmental timings after intracytoplasmic sperm injection for women younger than 30 years old" (Martínez et al., 2016) (Mol Reprod Dev 2016 Jul;83(7):624-9. doi: 10.1002/mrd.22667. Epub 2016 Jun 20.) que es mostra a continuació.

Oocyte vitrification does not affect early developmental timings after ICSI in women younger than 30 years old

Mol Reprod Dev 2016 Jul;83(7):624-9. doi: 10.1002/mrd.22667.

Meritxell Martínez M.Sca, Albert Obradors Ph.Da, Valerie Vernaeve M.Da, Josep Santaló Ph.Db, Rita Vassena D.V.M, Ph.D.a

a Clínica Eugin, Calle Balmes 236, Barcelona 08006, Spain

²Departamento de Biología Celular, Fisiología en Inmunología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

SUMMARY

Oocyte vitrification causes a temporary disassembly of the metaphase plate and spindle, which needs time to recover after warming. As a consequence, early post-fertilization events - such as timing of second polar body extrusion - might be altered, with unknown effects on preimplantation development, timing to pronuclear breakdown, and timing of cleavages. The aim of this study was to evaluate if differences exist among these events when comparing embryos obtained from fresh-donated versus vitrified/warmed oocytes from young women. We performed a prospective study with 201 embryos from 100 fresh and 101 vitrified/warmed oocytes that were subsequently fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Kaplan-Meier curves of each time were generated, in which we observed that median developmental times did not differ between embryos from fresh versus vitrified/warmed oocytes among all the metrics assessed. Thus, for young women without fertility problems, no differences exist between the timing of early developmental milestones in embryos derived from fresh or vitrified oocytes, and vitrification does not affect the preimplantation development of the resulting embryos.

INTRODUCTION

Oocyte vitrification is frequently used in assisted reproductive technologies (ART) to extend and preserve a woman's fertility (Alvarez et al., 2014; Donnez & Dolmans, 2013; Rienzi, Cobo, et al., 2012); to accumulate oocytes in low responders, as part of a strategy to avoid ovarian hyper-stimulation syndrome (Cobo, 2012); and to store donated oocytes (Quaas et al., 2013). The vitrification process yields high survival and fertilization rates when followed by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (Cobo, Domingo, et al., 2008; Kuwayama et al., 2005), while clinical pregnancy and live birth rates are similar following the transfer of embryos from vitrified/ warmed or fresh oocytes (Chang et al., 2013; Chian et al., 2014; Solé et al., 2013).

Metaphase-II spindles in human oocytes are believed to depolymerize during the vitrification process, but re-polymerize after warming, returning to their pre-frozen configuration after a maximum of 3 hr post-thaw incubation in standard conditions (Cobo et al. 2008b; Chen and Yang, 2009), irrespective of the cryopreservation technique used (Cobo, Kuwayama, et al., 2008). Vitrification may, however, increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase-II spindle (Coticchio et al., 2009) – although no increase in chromosomal abnormalities, birth defects, or developmental deficits are reported for offspring from vitrified/warmed oocytes compared to ART pregnancies with fresh oocytes, and the general population (Forman et al., 2012; “Mature Oocyte Cryopreservation: A Guideline,” 2013, Practice Committees of American Society for Reproductive and Society for Assisted Reproductive 2013; Noyes et al., 2009). Despite the comparable reproductive outcomes reported for cycles in which vitrified/warmed versus fresh oocytes were used, negative long-term effects of gene expression alterations in early development cannot be ruled out.

Vitrification is linked to altered expression of transcripts in the ubiquitin pathway. The abundance of members of the ubiquitin-specific peptidase family and sub-units of the 26S proteasome as well as proteins necessary for early embryonic development are modified in the vitrified/warmed oocytes (Monzo et al., 2012). The cryopreservation of oocytes is

also associated with decreased quantities of stored maternal mRNA in the oocyte, albeit the absolute mRNA abundance seems sufficient for biological activity in the resulting fertilized egg (Chamayou et al., 2011). On the other hand, biased depletion from the pool of maternal mRNA might impact a later stage of embryogenesis since this cache of transcripts drives development until embryonic genome activation. Oocyte aging, for instance, is related to a lower global mRNA content as well as diminished early embryo development and blastocyst formation (Janny & Menezo, 1996).

The objective of the present study is to compare, by means of time-lapse analysis, the early developmental events of embryos derived from vitrified/warmed versus fresh oocytes. All oocytes were obtained from young, healthy women to minimize the confounding effects of sub-or infertility.

RESULTS

The average age of oocyte donors included in the study was 25.7 years old. The semen used for ICSI in the cycles was predominantly from the donor's partner (86.8%). The transfer of two ICSI-derived embryos was performed on day 3 of in vitro development. Detailed baseline characteristics are presented in Table 1. No statistically significant differences were observed among the different parameters analyzed.

Kaplan Meyer curves of each time-lapse marker, representing the median time to achieve each milestone, are presented in Figure 1. Median developmental times from ICSI (the point at which 50% of the embryos have achieved each developmental stage) did not differ between embryos derived from vitrified/warmed versus fresh oocytes, based on the Log-rank test (Table 2). Furthermore, no significant differences between frozen/warmed and fresh oocytes were observed when we compare the rate of inverse cleavage (10,9% (11/101) vs. 17.0% (17/100) for vitrified/warmed versus fresh, respectively; $P=0.21$) or rate of abrupt cell division (13.8% (14/101) vs. 15% (15/100) for vitrified/warmed versus fresh, respectively; $P=0.82$). Reproductive outcomes also did not differ between groups (Table3).

Table 1. Baseline characteristics of the study sample, overall and by study group.

	Overall (n=201)	Frozen (n=101)	Fresh (n=100)
Oocyte donor age, Mean (SD)	25.7 (2.6)	26.5 (2.9)	24.9 (2.0)
Donor sperm, n (%)	5 (13.2)	3 (15.0)	2 (11.1)
Embryo transfer day, Mean (SD)	3.0 (0.8)	2.8 (0.7)	3.2 (0.9)
Transferred embryos, Mean (SD)	2.0 (0.4)	1.9 (0.3)	2.1 (0.4)

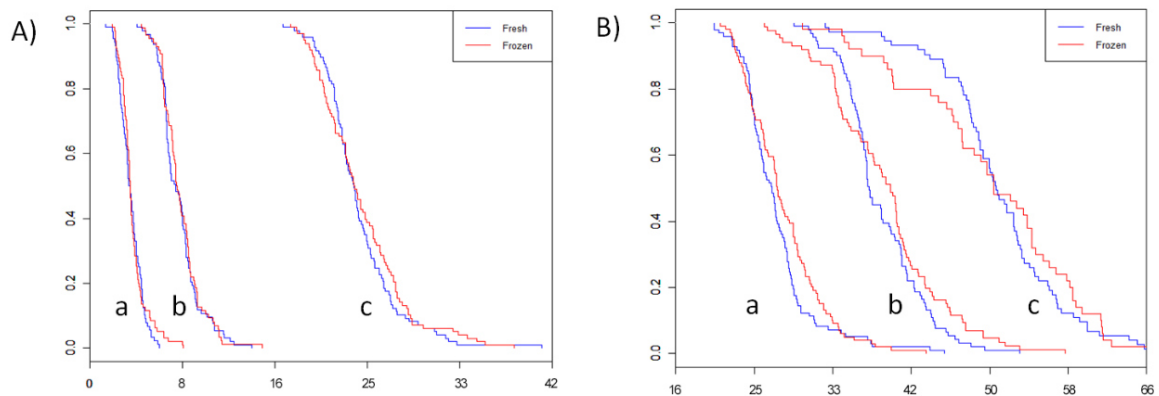


Figure 1. Timing to achieve each developmental milestone across study groups. The x-axis reports the time of each developmental event, in minutes, while the y-axis shows the proportion of embryos reaching the event at any given time. Curves are shown for timing of **(A)** second polar body extrusion (a), two pronucleus formation (b), and pronuclear breakdown (c) or **(B)** 2-cell (a), 3-cell (b), and 5-cell (c) stages. Only the 3-cell stage is shown as a proxy for division to the 3- or 4-cell stages due to the synchrony (overlap) between the two cell divisions.

Table 2. Median survival time in hours and minutes (with 95% CI), for each event and development stage, by study group.

Milestone	n	Vitrified/warmed (a)	Fresh (a)	<i>P</i> (b)
tPB2	183	3:36 (3:28-3:43)	3:30 (3:11-3:48)	0.50
tPN	179	7:48 (7:24-8:12)	7:43 (6:55-8:34)	0.67
tPNf	195	23:46 (22:50-24:42)	23:48 (22:36-24:30)	0.47
t2	196	27:28 (26:43-28:12)	22:43 (25:48-27:58)	0.17
t3	177	39:27 (37:59-40:55)	37:12 (36:3-38:21)	0.19
t4	160	40:47 (39:45-41:49)	39:10 (38:16-40:4)	0.32
t5	123	50:27 (46:39-54:15)	50:41 (49:9-52:13)	0.74
t6	74	51:23 (40:55-61:51)	51:41 (49:36-53:46)	0.62
t7	50	53:22 (38:29-68:15)	51:22 (47:8-55:35)	0.19
t8	38	50:27 (48:11-52:43)	53:9 (49:19-56:59)	0.41

a Presented as time, in hours and minutes (95% confidence interval).

b From Log Rank (Mantel-Cox test).

Table 3. Reproductive outcomes of the oocyte recipients, overall and by study group

	Overall (n=39)	Vitrified/warmed (a) (n=20)	Fresh (a) (n= 19)	<i>P</i> (b)
Biochemical pregnancy	21 (53.8)	9 (45.0)	12 (63.15)	0.18
Clinical pregnancy	13 (33.3)	6 (30.0)	7 (36.8)	0.56
Ongoing pregnancy	13 (33.3)	6 (30.0)	7 (36.8)	0.56
Live pregnancy	10 (25.6)	6 (30.0)	4 (14.9)	0.83

(a) Presented as n (%)

(b) From Pearson χ^2 test

DISCUSSION

Oocyte vitrification is increasingly being used in ART, nevertheless, little is known about the effect of vitrification on the oocyte molecular integrity as well as on the long-term outcomes in offspring. Vitrification is better at preserving DNA integrity and reduces damages to meiotic spindle when compared with slow freezing (Song et al., 2013), which may explain the reported higher embryo quality respecting slow vitrified/warmed oocytes (Martínez-Burgos et al., 2011; Song et al., 2013). On the other hand, vitrification may alter the location of microtubules and mitochondrial organization in Metaphase-II oocytes, which could negatively affect fertilization rates (Shi et al., 2007). Oocyte vitrification seems to alter the stability of pronuclei, as well as functionality of nucleoli (Chamayou et al., 2015).

Critical events must occur in an ordered and well-timed fashion after fertilization for proper development to occur. In humans, chromatin remodelling is well under way within the first few hours after fertilization, and embryonic gene transcription starts as early as the 2-cell stage (Vassena et al., 2011), and peaks at the 8-cell stage (Braude et al., 1988; Vassena et al., 2011). Here, we asked if the timing of post-fertilization early-cleavages milestones are affected by the vitrification, but found no significant differences between embryos derived from vitrified/warmed versus fresh oocytes.

Embryo development is reliant on accumulated maternal molecules until the 8-cell stage (Vassena et al., 2011), so any effects related to vitrification likely impact the timings of early development events. No differences in the timing of second polar body extrusion, formation of two pronuclei, or pronuclear breakdown (Ciray et al., 2014) were observed between the two study groups, indicating that vitrification does not affect either these early developmental events. We therefore conclude that the cytoskeleton and internal molecular integrity of the oocyte are normal following our thaw-out procedure. We also did not observe significant differences in timing for the first cleavages (2-cell through 5-cell stages); conversely, a lower cleavages rate was recently noted on the second day of embryo culture when comparing sibling oocytes inseminated fresh or after vitrification and warming (Siano et al., 2013). This disparity with our results might be due to the fact we did

not include sibling oocytes in each group, or that the previous study did not employ time-lapse tracking to specifically identify when cleavage occurred. Considering the timing of early divisions – particularly the second, third and fifth cleavages - is the best indicator of embryo viability and ability to reach blastocyst stage (Basile et al., 2015; Meseguer et al., 2011, 2012), we do not believe that vitrification negatively impacts preimplantation development. Indeed, oocyte vitrification did not affect morphokinetic development of embryos (Montjean et al., 2015).

Oocytes used in our study were not randomized to fresh or vitrified groups within the same donation cycles, which might have introduced a bias. While the random assignment would be more appropriate for such a study. The decision to freeze oocytes from certain donor is entirely dependent on the concurrent availability of appropriate recipient. Thus, in the clinic, whatever confounding effect was introduced by the selective assignment of oocytes to one or another group is probably moot.

Caution should be employed when generalizing our findings since the average age of donors in our study was 25.7 years. A recent study in sibling oocytes from 34-years-old women reported differences in the timing of early development events between embryos from vitrified/warmed versus fresh oocytes (Chamayou et al., 2015). Data analysing the impact of maternal age on oocyte survival after vitrification and warming, fertilization rates and embryonic development further suggest that maternal age negatively affects oocyte vitrification results in mice (Yan et al., 2010), we can conclude that vitrification does not drastically affect subsequent early embryonic development of oocytes from healthy, Young donors. Additional studies should be performed to determine the molecular integrity of vitrified oocytes as well as the long-term effects of vitrification on embryos.

MATERIALS AND METHODS

Ethical approval

Ethical approval for the implementation of this study was obtained from the Ethical Committee for Clinical Investigation of Clinica EUGIN (CEIC).

Study population

This was a prospective observational cohort study involving oocyte donors 23-29 years old, and semen samples from normozoospermic partners (World Health Organization, 2010). Two-hundred and one embryo from 37 oocyte donation ICSI cycles were included: 101 proceeding from vitrified/warmed oocytes and 100 from fresh oocytes. Oocytes were used either vitrified/warmed or fresh during each donation ICSI cycle.

Ovarian stimulation and oocyte collection

Controlled ovarian stimulation was performed following a Gonadotrophin-releasing hormone antagonist protocol (Cetrotide® 0.25 mg) (Merck Serono Europe Limited, London, U.K.) with either recombinant follicle-stimulating hormone (GONAL-f®) (Merck Serono Europe Limited, London, U.K.) or highly purified human menopausal gonadotropin (Menopur®) (Ferring S.A.U., Madrid, Spain). Multi-follicular development was evaluated by transvaginal ultrasonography on the eighth day of stimulation and whenever necessary thereafter. Final oocyte maturation was triggered using 0.3 mg Gonadotrophin-releasing hormone agonist (Decapeptyl®) (Ipsen Pharma S.A., l'Hospitalet de Llobregat, Spain). Cumulus oocyte complexes (COCs) were collected by transvaginal ovum pick up 36hr after trigger. COCs were then released from the follicle aspirate. Thirty minutes after ovum pick up, all retrieved oocytes were denuded of cumulus cells by exposure to a 10% solution of hyaluronidase (Hyase-10x®) (Vitrolife, Göteborg, Sweden) in G-MOPS medium, followed by gentle pipetting. The recipient endometrium was prepared with 2 mg of transdermal estradiol valerate, administered vaginally (Vivelledot®) (Novartis, France) plus two 75 µg

patches over the course of 3 days. On the day of ovum pick up, 800 mg/day of micronized vaginal progesterone (Utrogestan®) (Seid, Barcelona, Spain) was added.

Semen preparation and analysis

All sperm samples were frozen after evaluation and thawed immediately before ICSI. Semen freezing was performed in either 0.33:1 (v/v) sperm to Cryoprotect (Nidacon, Molndal, Sweden), or in 1:1 (v/v) CryoSperm (ORIGIO, Malov, Denmark). Semen preparation was performed by removing the cryoprotectant with PureSperm Wash (Nidacon, Molndal, Sweden) followed by centrifugation for 5 minutes at 250g. Swim-up selection was performed, and 5 µL of the swim-up product were retrieved for ICSI.

Vitrification and warming

Vitrification of metaphase-II oocytes was performed 2 hr after ovum pick up, which was and 1.5 hr after the removal of the cumulus cells. The Cryotop method of vitrification (Kuwayama, 2007) was used, and cryopreservation in liquid nitrogen utilized a Cryotop vitrification open system (KITAZATO Biopharma Co., Ltd, Fuji, Japan).

Time lapse operation and morphokinetic data collection

Inseminated oocytes were cultured under Primo Vision® microscopes, in incubators at 37°C, 6% CO₂, and 95% relative humidity. These microscopes recorded the development of the embryos by capturing a brightfield image of the embryo every 5 minutes, and an additional scan (11 focal planes /100 µm Scan Range) every 20 minutes.

Times from ICSI (calculated as the time when the first oocyte of the cohort undergoes ICSI; the entire ICSI cohort was always completed in less than 10 minutes) to each milestone- extrusion of the second polar body, appearance of pronuclei, pronuclei breakdown, and division to 2-cell through 8-cell stages- were determined from each time-lapse recording (table 2). The morphokinetic timing nomenclature was revised after the start of data

collection based on the guideline of Ciray et al., 2014. We also recorded whether inverse cleavage or abrupt cell divisions occurred.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by generating Kaplan-Meier curves of each time-lapse marker, where the median survival time could be interpreted as the time point at which 50% of the embryos achieved a developmental stage. We used a log-rank Mantel-Cox test to assess the equality of survival distributions within the two study groups (vitrified/warmed vs. fresh). The rates of inverse cleavage and abrupt division were compared between groups. Likewise, reproductive outcomes (biochemical pregnancy, clinical pregnancy, ongoing pregnancy and live birth) were χ^2 analysis.

The statistical procedures for survival analysis (Kaplan-Maier and Cox regression for uni- and multivariate analysis, respectively) dealt with the “missing values” by considering them right censored data. These values contribute to the survival function without introducing bias as long as the assumption that independence between the incomplete observations and the survival times expected if the follow-up would have been complete (censoring independence is met. In our case, almost all incomplete values corresponded to non-progressing embryos. According to the study design- in which embryos were consecutively selected independently of their risk of non-progression - this censoring independence could be assumed, making any bias related to these incomplete values unlikely.

The SPSS 21.0 statistical package was used for the analysis and R package survival 2.37-7 for graph construction. P-value <0.05 was set as statistically significant.

3 Efecte de l'activació oocitària assistida sobre el patró morfocinètic dels embrions derivats

L'activació oocitària és un procés biològic que inclou esdeveniments que s'inicien a través de vies de senyalització que són majoritàriament calci (Ca^{2+}) dependents (Gadella & Evans, 2011). Aquests esdeveniments són per exemple la reacció cortical, la reactivació de la meiosi o la síntesi de DNA.

In vivo, és l'espermatozou el que inicia aquesta cascada de senyalitzacions en entrar a l'oòcit, a través d'enzims com la PLC ζ (Rogers et al., 2004; Saunders et al., 2002). Concretament, un dels productes de l'activitat hidrolítica de la PLC ζ , l'IP3, interactua amb els seus receptors específics situats al reticle endoplasmàtic i aquest reacciona alliberant una primera onada de calci al citosol que a l'hora indueix més alliberament de Ca^{2+} des del reticle en una reacció en cadena. Això, sumat a l'entrada de Ca^{2+} des de l'exterior a través de canals específics de membrana, produirà les ones de Ca^{2+} necessàries per senyalitzar la fecundació (Malcuit et al., 2006b) (fig. 2).

Per tant, resumidament, per donar-se la correcta progressió cap al zigot, principalment són necessaris espermatozous que presentin una PLC ζ activa, oòcits citosòlicament madurs i una bona font de Ca^{2+} intra i extracel·lular. En els casos on un d'aquests elements falla, és on podem trobar errors en la fecundació i l'activació del zigot (fig. 24).

A la pràctica clínica, els errors complets de fecundació ocorren entre un 1 i un 5% dels cicles d'ICSI (Esfandiari et al., 2005). Aquests errors es refereixen als casos on no hi ha hagut activació oocitària (Fig. 24), i per tant no s'observa l'extrusió del segon corpuscle polar ni cap pronucli (Asch et al., 1995). És en aquests casos on es correcte indicar clínicament la AOA així com en casos on s'han diagnosticat mutacions en la PLC ζ (Torra-Massana et al., 2019).

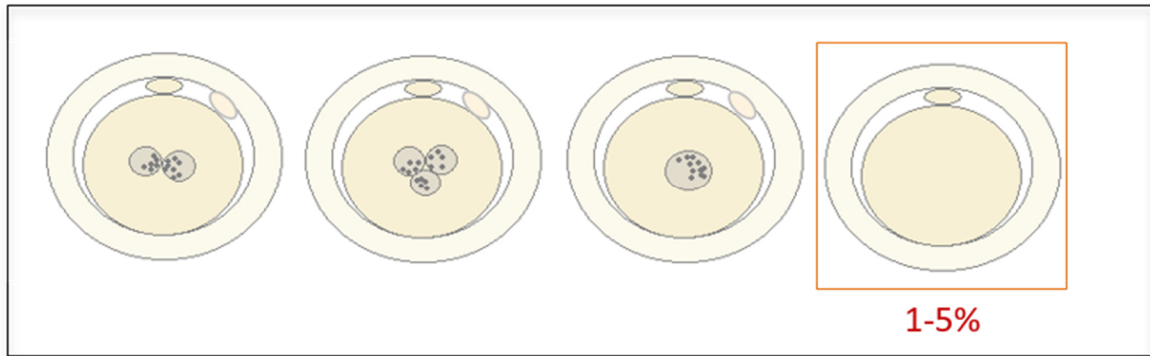


Figura 24. Esquema del que es considera error total de fecundació que ocorre en entre 1-5% dels cicles d'ICSI. En aquests casos no hi ha activació oocitària, és a dir, no es produeix l'extrusió del segon corpuscle polar i no apareix cap pronúcli.

Existeixen 3 mètodes diferents d'aplicar l'AOA segons el mètode utilitzat. Els protocols basats en mètodes mecànics (Tesarik et al., 2002), en elèctrics (Yanagida et al., 1999) i en químics (Borges et al., 2009; Björn Heindryckx et al., 2008). Aquests últims consisteixen en incubar els oòcits inseminats en medis rics en ionòfors de Ca^{2+} , amb l'objectiu de mobilitzar el Ca^{2+} extra i intracel·lular per intentar restaurar així la fecundació (Borges et al., 2009; Björn Heindryckx et al., 2008).

Existeix evidència científica que avala l'efectivitat clínica de l'AOA per restaurar les fallades de fecundació i donar nascuts vius sans (D'Haeseleer et al., 2014; Deemeh et al., 2015; Björn Heindryckx et al., 2008; Vanden Meerschaut et al., 2014) però, tot i això, encara hi ha certa controvèrsia sobre quin protocol seguir i quin ionòfor utilitzar: l'a23187 o la ionomicina. Durban i col·laboradors (Durban et al., 2018, Congreso Nacional de Asebir Madrid 2018) van presentar al Congrés Nacional d'ASEBIR al 2018, un estudi realitzat amb partenots que indicava que l'ús de la ionomicina es mostra més eficient que l' A23187 a l'hora d'activar els oòcits (fig. 25).

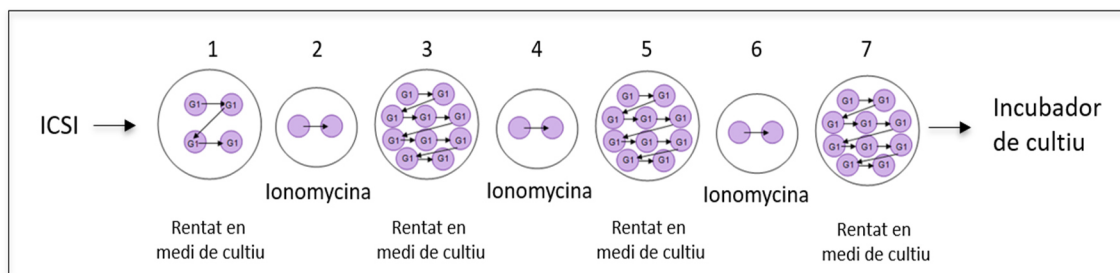


Figura 25: Esquema del protocol d'AOA utilitzat per Durban i col·laboradors. La durada del protocol és d'aproximadament dues hores i mitja i consta de la realització de tres incubacions en un medi ric en Ionomicina de 30 minuts cadascuna, amb rentats en medi de cultiu entre cada incubació.

Tot i que hi ha publicacions que comparen la eficiència entre els dos ionòfors en embrions de ratolí (Nikiforaki et al., 2016), la manca d'estudis en humans i algunes publicacions que suggereixen efectes nocius de la AOA a llarg termini a nivell epigenètic i d'expressió gènica (Ducibella et al., 2002; Yamaguchi et al., 2017) fa que l'AOA encara es consideri una tècnica experimental.

En conclusió, l'AOA actualment encara és una tècnica relativament poc usada al laboratori de FIV, envoltada de controvèrsia i que requereix d'avaluació. En la present tesi doctoral, es presenta un **estudi que avalua com afecta l'aplicació d'AOA sobre la morfocinètica dels embrions resultants en cicles d'ICSI amb AOA**. Com a fruit d'aquest estudi s'ha redactat un article científic que porta per títol "Assisted oocyte activation effects on the morphokinetic pattern of derived embryos", que està pendent d'acceptació a la revista *Journal assisted reproduction and genetics*. Aquest article es presenta a continuació.

Assisted oocyte activation effects on the morphokinetic pattern of derived embryos

M. Martínez¹, M. Durban¹, J. Santaló², A. Rodríguez¹, R. Vassena¹

¹ Eugin, Calle Balmes 236, Barcelona 08006, Spain

²Departamento de Biología Celular, Fisiología en Inmunología, Facultad de Biociencias, Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra 08193, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain.

1 Clínica EUGIN, Barcelona 08029, Spain

2 Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad Autónoma de Barcelona, Spain

ABSTRACT

Assisted oocyte activation (AOA) can restore fertilization rates after IVF/ICSI cycles with fertilization failure. AOA is an experimental technique, and its downstream effects remain poorly characterized. Clarifying the relationship between AOA and embryo morphokinetics could offer complementary insights into the quality and viability of the embryos obtained with this technique. The aim of this study is to compare the pre-implantation morphokinetic development of embryos derived from ICSI vs. ICSI-AOA cycles. A retrospective cohort study was carried out with 141 embryos from fresh oocyte donation cycles performed between 2013 and 2017; 41 embryos were derived from 7 ICSI-AOA cycles and 100 embryos from 18 ICSI cycles. Development of all embryos was followed using a Time-lapse System to determine morphokinetic parameters for comparison between study groups. In our results we show that embryos from both groups develop similarly for most milestones, with the exception of the time of second polar body extrusion (tPB2) and the time to second cell division (t3). We conclude that ionomycin mediated AOA does not seem to affect the morphokinetic pattern of preimplantation embryo development, despite alterations found in tPB2 and t3, which we hypothesize could directly reflect the use of a Ca²⁺ ionophore as a transient and quick non-physiologic increase of free intracytoplasmic Ca²⁺.

INTRODUCTION

ICSI is indicated in cases of male factor infertility (Palermo et al., 1992). However, fertilization failure after ICSI occurs in 1-5% of cycles (Combelles et al., 2010; Esfandiari et al., 2005). Assisted oocyte activation (AOA) involves timed incubation of fertilized oocytes with Ca²⁺ ionophores such as ionomycin (Heindryckx et al., 2005), which activates the biochemical pathway of intracellular Ca²⁺ mobilization, and stimulates the opening of Ca²⁺ deposits in the endoplasmic reticulum of the oocyte (Borges et al., 2009). In the clinic, AOA is indicated in oocyte activation deficiencies (OADs) (Bonte et al., 2019) and in proven alterations in the activity of sperm-borne oocyte activation factors, such as PLCZ1 loss-of-function mutations (Torra-Massana et al., 2019). Although the long-term follow-up of AOA children have been reported as normal (D'Haeseleer et al., 2014; Deemeh et al., 2015; Murugesu et al., 2017; Tejera et al., 2008; Vanden Meerschaut et al., 2014), this technique is still highly experimental. In fact, the application of AOA is still controversial, as the artificial activating agents do not mimic exactly the calcium signalling and downstream physiological processes observed in mammalian zygotes (Vanden Meerschaut et al., 2014). In particular, how calcium ionophores affect the morphokinetic pattern of the resulting embryos remains unknown.

Morphokinetic parameters, measured using time-lapse systems (TLS), can help in monitoring whether an embryo is developing at the expected pace (A. A. Chen et al., 2013; Herrero & Meseguer, 2013; Meseguer et al., 2011). In fact, the times in which the first cell divisions and the first events of embryonic development occur are related to the embryo quality and the embryo chromosomal status (Desai et al., 2018), and how likely is an embryo to result in a live birth (Azzarello et al., 2012).

The aim of this study is to compare the pre-implantation morphokinetic development of embryos derived from ICSI vs. ICSI-AOA cycles.

MATERIALS AND METHODS

Study design and ethical approval

This is a retrospective cohort study including 141 embryos from 25 ICSI cycles performed with donor oocytes and partner sperm, between 2013 and 2017 at a private fertility center; 41 embryos were obtained from 7 ICSI-AOA cycles within that period in which fertilization failure in previous ICSI cycles was the indication to apply AOA; while 100 embryos were from 18 ICSI cultured in the same conditions. Baseline characteristics are presented in Table I. Ethical approval by the Research Ethics Committee of the center was obtained before the implementation of the study.

Table I. Baseline characteristics of the study cohort, overall and by study group

	Overall (n=141)	With AOA (n=41)	Without AOA (n=100)
Oocyte donor age, Mean (SD)	24.78 (2.36)	24.68 (2.97)	24.83 (2.07)
Partner's sample sperm age, n (%)	42.85 (8.8)	40.41(4.18)	43.86 (9.94)
Embryo transfer day, Mean (SD)	3.4 (0.9)	3.41 (1.02)	3.45 (0.85)
Number of embryos transferred, Mean (SD)	2.04 (0.31)	2 (0)	2.06 (0.37)

SD = Standard Deviation

Ovarian stimulation and donor oocyte collection

In all cycles, controlled ovarian hyperstimulation (COH) was carried out with either highly purified hMG (Menopur®, Ferring, Spain), or Follitropin alpha (Gonal®, Merck-Serono, Spain). GnRH antagonist (Cetrotide, Merck-Serono Europe Limited, London, UK) was added from days 6 or 7 of stimulation. Multi-follicular development was evaluated by transvaginal ultrasonography during COH. Final oocyte maturation was triggered with 0.3 mg of GnRH agonist (Decapeptyl Ipsen Pharma S.A., L'Hospitalet de Llobregat, Spain) when 3 follicles ≥18 mm diameter were detected. Cumulus oocyte complexes (COCs) collection was

performed transvaginally, strictly 36 hrs after trigger. Thirty minutes after oocyte pick up (OPU), oocytes were denuded of cumulus cells by exposing the COCs to a solution of 80 IU/mL of hyaluronidase (HYASE-10Xw, Vitrolife) in G-MOPS medium, with gentle pipetting.

Semen analysis and preparation

All sperm samples were requested 2 hours after OPU, analyzed by SCA (Sperm Class Analyzer; Microptic, Spain), and graded according to the World Health Organization guidelines (WHO, 2010). Sperm selection was performed by centrifugation at 250g for 5 min in 5 ml of sperm medium (PureSperm® Wash, Nidacon, Sweden), followed by swim up at 27°C, 6% CO₂ and 95% relative humidity in IVF medium (Vitrolife, Göteborg, Sweden).

ICSI and ICSI-AOA procedures

ICSI was performed as previously described (Pujol et al., 2018). AOA was performed immediately after ICSI on the inseminated oocytes of ICSI-AOA cohort, according to Heindryckx (Heindryckx et al., 2008), with modifications: oocytes were allowed to recover for 30 minutes in G1™ PLUS (Vitrolife, Göteborg, Sweden) after ICSI and were then incubated for 7 minutes in a ionomycin (MP Biomedical, USA) solution 10 µmol/l in G1™ PLUS. Next, oocytes were washed in G1™ PLUS and incubated in fresh G1™ PLUS for 30 minutes; subsequently, the oocytes were exposed for a second round to the ionomycin solution at 10 µmol/l in G1™ PLUS for 7 minutes. Finally, the inseminated oocytes were washed in G1™ PLUS and incubated under Primo Vision® microscopes (Vitrolife, Göteborg, Sweden) to monitor embryo development, in standard incubator conditions (37 °C, 6%CO₂, 5%O₂, and 95% relative humidity).

Primo Vision® System procedures

The morphokinetic development of all embryos was recorded and analyzed with Primo Vision® Analyzer Software. Primo Vision® captured 11 focal planes over a 100-µm scan range every 20 minutes and one bright field image of the embryos every 5 minutes. Embryo

development videos were recorded by Primo Vision Capture[®], and the same operator analyzed with Primo Vision Analyzer[®] each embryo developmental video.

Morphokinetic data collection

The morphokinetic timing nomenclature was based on the guidelines of Ciray et al. {Ciray, 2014 #3}. The analyzed events were: extrusion of the second polar body (tPB2), appearance of the pronuclei (tPN), pronuclear fading (tPNf), divisions to 2-cell through 8-cell stages (t2 to t8), start of blastulation (tSB) and full blastocyst stage (tB). All parameters were annotated considering time t0 as a time at the start of ICSI, i.e. the moment when the first oocyte of the cohort was injected (the injection of all cohorts was completed in less than 10 minutes). All these parameters are described in Table II.

Table II. Description and definition of the morphokinetic parameter analyzed. Definitions based on Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. Ciray et al. 2014

Morphokinetic parameter	Description	Definition
tPB2	Extrusion of the second polar body	Time when the second polar body is completely detached from the oolemma
tPN	Appearance of pronuclei	Time when fertilization status is confirmed
tPNf	Pronuclear breakdown	Time frame of pronuclei disappearance
t2	First cleavage division	Time of cleavage from zygote to 2-cell stage embryo
t3	Second cleavage division	Time of cleavage from 2-cell to 3-cell stage embryo
t4	Third cleavage division	Time of cleavage from 4-cell to 5-cell stage embryo
t5	fourth cleavage division	Time of cleavage from 4-cell to 5-cell stage embryo
t8	Eight cleavage division	Time of cleavage from 7-cell to 8-cell stage embryo
tSB	Initiation of blastulation	Time of cleavage first frame in which the blastocel is visible
tB	Full blastocyst	Time of cleavage last frame when zona pelucida starts to thin

Statistical analysis

For each embryonic developmental time (tPB2, tPN, tPNf, t2, t3, t4, t5, t8, tSB and tB) a Kaplan-Meier curve was plotted with assisted oocyte activation (AOA) as a factor. A Log Rank test (Mantel-Cox) was performed to test equality of survival distributions between cycles with and without AOA. All time points were weighted equally in this test.

RESULTS

The mean age of donors providing the oocytes in the study was 24.14 ± 2.36 years. The average age of the male patients was 42.85 ± 8.8 years. Embryo transfers for ICSI-AOA and ICSI cycles were performed on day 3 or 5 of in vitro development. Baseline characteristics are presented in Table I.

No statistically significant differences between groups were observed among most the morphokinetic parameters analyzed, with the exception of tPB2 and t3. Kaplan Meier curves of each morphokinetic parameter, representing the median time to achieve each milestone, are shown in Figure 1. The median development times did not show any difference among most morphokinetic parameters of embryos from cycles of ICSI vs. ICSI-AOA cycles, with the exception of tPB2, that was 3.43 vs. 2.17 hours ($p < 0.001$), and t3, that was 37.07 vs. 32.60 ($p = 0.043$), respectively. The other morphokinetic parameters values obtained were: tPN=7.72 vs 8.05 ($p = 0.33$); tPNf=23.45 vs 23.67 ($p = 0.90$); t2=26.88 vs 25.62 ($p = 0.99$); t4=39.12 vs 34.28 ($p = 0.15$); t5=50.28 vs 45.48 ($p = 0.09$), t8=53.15 vs 55.63 ($p = 0.83$); tSB=103.98 vs 102.53 ($p = 0.30$); tB=110.07 vs 115.57 ($p = 0.88$), for embryos from ICSI and ICSI-AOA cycles, respectively.

These results are detailed in Table III and represented in Figure 1. Reproductive outcomes also did not differ between groups except for fertilization rate (Table IV).

Table III. Median persistence times in hours by study group presented as time in hour and minutes, by study group.

	AOA	N	Estimate	SE	95% Confidence Interval		p*
					Lower Bound	Upper Bound	
tPB2	No	90	3.43	.14	3.17	3.70	<0.001
	Yes	36	2.17	.18	1.81	2.53	
tPN	No	100	7.72	.43	6.87	8.56	0.33
	Yes	40	8.05	.46	7.15	8.95	
tPNf	No	94	23.45	.35	22.77	24.13	0.90
	Yes	40	23.67	.79	22.12	25.22	
t2	No	99	26.88	.55	25.80	27.96	0.99
	Yes	38	25.62	.52	24.59	26.64	
t3	No	93	37.07	.26	36.55	37.58	0.043
	Yes	37	32.60	.58	31.47	33.73	
t4	No	94	39.12	.64	37.86	40.37	0.15
	Yes	34	34.28	.36	33.57	35.00	
t5	No	72	50.28	0.9	48.52	52.04	0.09
	Yes	30	45.48	1.26	43.02	47.95	
t8	No	27	53.15	1.95	49.32	56.98	0.83
	Yes	15	55.63	7.07	41.78	69.49	
tSB	No	19	103.98	2.25	99.58	108.38	0.30
	Yes	6	102.53	2.59	97.45	107.61	
tB	No	9	110.07	3.85	102.51	117.62	0.88
	Yes	5	115.57	2.01	111.63	119.50	

* Log Rang (Mantel-Cox test)

Table IV. Reproductive outcomes of the oocyte recipients, overall, and by study group

	With AOA (a) (n=)	Without AOA (a) (n=)	P (b)
Fertilization rate	63,6% (66)	83% (120)	0.009
Biochemical pregnancy	57% (7)	66% (18)	0.65
Clinical pregnancy	42% (7)	50% (18)	0.74
Ongoing pregnancy	28% (7)	44% (18)	0.62
Live birth	28% (7)	44% (18)	0.62

(a) Presented as % (n).

(b) From Pearson x2 test.

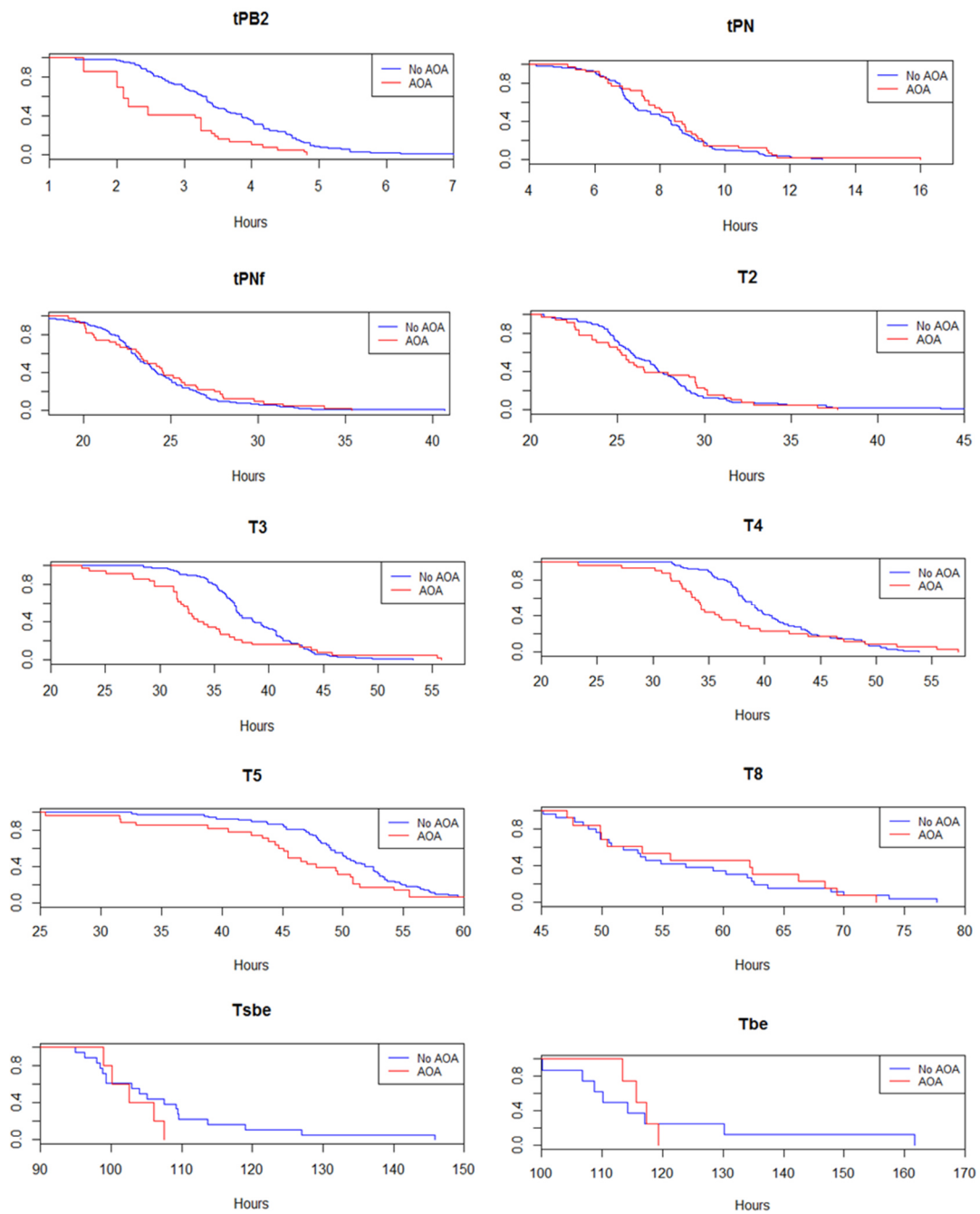


Figure 1. Depict the persistence times for each embryo stage

DISCUSSION

Assisted Oocyte Activation (AOA) is an experimental technique involving exposure of inseminated oocytes to calcium ionophore. However, it is unclear whether a few transient Ca^{2+} spikes, induced over a short period of time effectively recapitulate the signalling effects of the long-lasting Ca^{2+} oscillatory signature produced in the oocyte upon fertilization by the sperm (Nikiforaki et al., 2016; Vanden Meerschaut et al., 2014).

A greater understanding of how AOA affects embryo development is needed. In this study we wanted to assess if and how the artificial peaks of Ca^{2+} generated by ionomycin exposure alter the preimplantation development of the resulting embryos.

Overall, we found that embryos derived from ICSI-AOA cycles present similar developmental morphokinetic values when compared to embryos obtained from ICSI cycles. Nevertheless, two parameters diverge significantly in embryos obtained by ICSI-AOA cycles: tPB2 and t3.

First, the extrusion of the second polar body (tPB2) ($p < 0.001$) occurs earlier in ICSI-AOA cycles. The extrusion of the second PB is the first morphological event of meiotic resumption and is directly driven by the early Ca^{2+} /CaMKII-dependent events (Miao et al., 2012). It has been shown that 30% of inseminated oocytes extrude their second PB as early as 45 minutes post ICSI, while most oocytes (about 80%) have extruded their polar body by 3 hours post ICSI (Martínez et al., 2016; Van Den Bergh et al., 1995).

During AOA, the exposure of the oocyte to ionomycin produces a transient and quick increase of free intracytoplasmic Ca^{2+} , resulting from extracellular Ca^{2+} influx as well as from Ca^{2+} release from the ER (Ferrer-Buitrago et al., 2018), compared to the sperm injection alone. Altogether, our results suggest that AOA procedure could accelerate tPB2 mainly due to the ability of ionomycin to produce quick release of Ca^{2+} that would, eventually, induce an immediate triggering of the mechanisms leading to PB2 extrusion.

Around 8 hours after meiotic resumption the majority of activated oocytes display two pronuclei (Z. P. Nagy et al., 1994). Although tPB2 occurred earlier in ICSI-AOA embryos, tPN was similar in both groups, occurring at around 8 hours after t0. Moreover, PN formation in mouse occurs even when Ca²⁺ spikes are not sufficient (in intensity and/or frequency) to completely resume meiosis, generating 3PN zygotes (Miao & Williams, 2012), and in humans the main cause for 3PN generating after ICSI is the non-extrusion of the second polar body (Grossmann et al., 1997). Considering together the studies from these authors and our own results suggests that the tPB2 and the tPN are somehow independent events.

Pronuclei fading (tPNf) and the first cell division (t2) occur in a similar pattern between study groups, and the values from tPNf and t2 comparing the two study groups are similar (p=0.90 and 0.99 respectively; Table III). These timings are in accordance with the literature as good indicators of embryo viability in ICSI-AOA cycles (Azzarello et al., 2012; Meseguer et al., 2011).

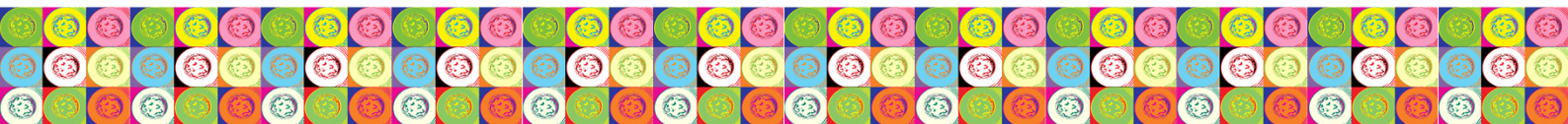
We found significant differences in t3 between both study groups. The second cell cycle starts significantly earlier in ICSI-AOA group (p=0.043). This could be explained by the relationship between artificial exposure to Ca²⁺, and the acceleration of the mitotic processes described in previous studies (Miao & Williams, 2012). Although this acceleration in the ICSI-AOA group remains evident up to t5, we did not find any significant differences between study groups at t8 coinciding with the stages when the human gene expression increase dramatically (Braude et al., 1988; Vassena et al., 2011). Our results could indicate that embryos from ICSI-AOA cycles are reasonably competent, as t2 and t5 are morphokinetic parameters that relate to implantation capacity (Conaghan et al., 2013; Meseguer et al., 2011). In the same way, we did not find significant differences between the two study groups on morphokinetic parameters tSB and tB, related with the probability of aneuploidy (Campbell et al., 2013) and chromosomal status of the embryos (Desai et al., 2018).

We do recognize some limitations in our study: first of all, we only included 41 embryos from ICSI-AOA cycles, due to the low frequency of AOA in IVF, and studies with larger

cohorts will be needed to confirm our findings. Second, all ICSI-AOA cycles came from couples with a diagnosed male factor and no apparent female factor, so, we cannot ascertain whether it is AOA that directly affects embryo morphokinetics, or if the male factor per se also plays a role.

In conclusion, we show that, overall, ionomycin mediated AOA does not seem to affect the morphokinetic pattern of preimplantation embryo development, despite alterations found in tPB2 and t3, which we hypothesize could directly reflect the use of a Ca²⁺ ionophore as a transient and quick non-physiologic increase of free intracytoplasmic Ca²⁺.

DISCUSSIÓ



1 Una nova perspectiva

L'estudi morfològic del desenvolupament embrionari preimplantacional s'ha pogut dur a terme *in vitro* en embrions humans des de l'inici de la FIV. Per aconseguir l'èxit clínic en els cicles de reproducció assistida hi intervenen molts factors, però conèixer en detall el desenvolupament dels embrions estudiats n'és una de les claus.

El coneixement del desenvolupament dels embrions en cultiu permet als embriòlegs avaluar quins embrions tenen més capacitat de donar una gestació a terme i assolir l'objectiu últim de totes les TRAs: "un nen sa a casa". Aquesta selecció es basa en una avaluació del desenvolupament embrionari *in vitro* i es pot fer en base a diferents criteris.

En la present tesi doctoral, s'ha volgut aprofundir en l'avaluació dels embrions des del punt de vista morfocinètic i sempre prenent com a referència l'avaluació morfològica. Això es deu a que clínicament les observacions i avaluacions de la morfologia embrionària han estat des de l'origen de la FIV l'eina clau i indispensable per a realitzar les avaluacions de les cohorts en cultiu. Aquestes avaluacions morfològiques també han estat utilitzades en recerca clínic i bàsica i s'han anat perfeccionant i millorant amb el temps convertint-se en escales i graduacions, a mida que els coneixements en el desenvolupament embrionari s'ampliaven.

D'uns anys ençà, la nova perspectiva del desenvolupament embrionari ha canviat amb l'arribada dels sistemes *time-lapse* als laboratoris de FIV. Aquesta eina es basa en controlar i enregistrar de manera continuada la morfologia embrionària durant el desenvolupament en cultiu per poder fer-ne les avaluacions mitjançant softwares específics. Aquesta nova eina dona una visió més dinàmica, acurada, i precisa del desenvolupament embrionari que la que donaven les avaluacions morfològiques tradicionals i, consegüentment, aporta molta més informació a l'embriòleg.

D'entrada, es podria afirmar que els antics sistemes de cultiu i avaluació han quedat obsolets per si mateixos. Si bé és cert que està demostrat que el cultiu continu en sistemes *time-lapse* millora la qualitat embrionària (Fujiwara et al., 2007; Lonergan et al., 2003) i que

l'ús dels models predictius i algoritmes morfocinètics (Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010) augmenten la probabilitat d'èxit als cicles de FIV, l'avaluació dels embrions usant *time-lapse* encara es basa en l'avaluació morfològica que només pot donar "l'ull clínic" de l'embriòleg, i a més a més està subjecta a certa controvèrsia pel que fa a la seva eficàcia.

Malgrat la bona perspectiva de les avantatges d'aquests sistemes en l'àmbit clínic, sobre els sistemes *time-lapse* se n'han qüestionat diferents aspectes. Com hem comentat en apartats anteriors, existeix una ampla controvèrsia descrita a la literatura respecte el grau d'efectivitat dels models predictius i algoritmes morfocinètics (Armstrong et al., 2018; M. Chen et al., 2017; Goodman et al., 2016). El treball més destacable en aquest sentit és una revisió de la Cochrane publicada per Armstrong i col·laboradors al 2019 (Armstrong et al., 2018), en la qual s'apunta directament a que no hi ha prou evidència científica per afirmar que les avaluacions morfocinètiques milloren els resultats reproductius d'implantació i nascut viu.

Altres aspectes sobre l'ús dels sistemes *time-lapse* s'han qüestionat. Per exemple, s'ha plantejat també la possible afectació de l'exposició de llum continuada per part de la càmera fotogràfica dels sistemes de cultiu. Actualment però, ja hi ha evidència de que el grau d'exposició dels embrions en cultiu a la llum no és major quan s'utilitzen sistemes *time-lapse* en comparació a quan es cultiven en incubadors convencionals. Això es deu bàsicament a que els embrions analitzats en aquest últim cas mitjançant la morfologia s'han de treure de l'incubador constantment exposant-los així a la llum ambient. A més, els sistemes *time-lapse* treballen amb una longitud d'ona d'aproximadament 600nm que no afecta en aquest sentit al desenvolupament embrionari.

Per altra banda i com s'ha comentat anteriorment, existeixen molts estudis publicats que defensen la millora dels resultats clínics gràcies a la selecció embrionària basada en la morfocinètica (Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010), però també n'hi ha que qüestionen l'efectivitat d'aquests (Armstrong et al., 2018; M. Chen et al., 2017; Goodman et al., 2016).

El que si que es pot afirmar amb certesa, és que l'ús dels sistemes *time-lapse* per a la selecció embrionària, ha estat especialment útil a nivell clínic en els darrers anys per aconseguir seleccionar un sol embrió que destaquí morfològicament i morfocinèticament dins la cohort. Aquesta selecció, té com a objectiu realitzar transferències embrionàries d'un sol embrió per evitar les gestacions gemel·lars o múltiples. Aquesta pràctica (*elective single embryo transfer* o eSET) és ja una prioritat a les clíniques de FIV donades les evidències científiques que apunten a l'elevat risc de les gestacions gemel·lars (Cabello et al., 2010; Gianaroli et al., 2012; Kupka et al., 2014). Però no obstant les avaluacions amb sistemes *time-lapse* poden ajudar molt a triar entre un embrió o l'altre a l'hora de transferir-ne un de sol, l'embriòleg encara té com a última referència la morfologia embrionària.

2 Reproductibilitat i fiabilitat d'una nova eina d'avaluació

Amb l'arribada dels sistemes *time-lapse* en la pràctica clínica, s'ha qüestionat la manca de fiabilitat en la reproductibilitat dels algorismes o models predictius descrits entre diferents condicions de cultiu, analistes o inclús entre diferents laboratoris (Aparicio et al., 2013; Chen et al., 2017; Sundvall et al., 2013). És ben sabut que l'observació i avaluació per part dels embriòlegs està sotmesa a un cert grau de subjectivitat que pot afectar a les decisions clíniques (Arce et al., 2006; Baxter Bendus et al., 2006; Paternot et al., 2011). Per tant, de la mateixa manera que en el seu moment es va testar la fiabilitat dels mètodes i escales d'avaluació basats en la morfologia (Paternot et al., 2011; De Assín et al., 2009) i consensuar entre especialistes (Balaban et al., 2011), també es fa necessari testar la fiabilitat de les mesures preses amb sistemes *time-lapse* abans d'utilitzar-la com a eina de recerca o diagnòstic clínic.

Amb aquest propòsit, en la present tesi doctoral s'ha realitzat un treball amb el qual s'ha volgut testar si les mesures realitzades amb els sistemes *time-lapse* no son observador (embriòleg) depenents i per tant són fiables. En l'esmentat treball s'ha conclòs que

efectivament, la variabilitat entre les mesures preses per diferents observadors és baixa i que, per tant, les mesures preses amb aquest sistema són fiables.

En aquest treball, el sistema *time-lapse* que es va usar va ser Primo Vision[®], en un dels primers models del sistema sortits al mercat. La qualitat d'imatge que s'aconseguia amb aquests primers models no era tan alta com actualment i en conseqüència, la probabilitat d'error a l'hora d'analitzar les imatges era llavors més alta.

Concretament, per a l'avaluació de les primeres divisions cel·lulars (paràmetres morfocinètics des de t2 a t5) el grau de concordança entre observadors (embriòlegs) va resultar ser alt (*good agreement*) amb una ICC de més 0,80 (Patrick E. Shrout & Fleiss, 1979) i independentment de l'experiència dels embriòlegs.

Pel que fa als paràmetres morfocinètics relacionats amb l'avaluació de la fecundació (tPB2, tPN i tPNf) aquests van resultar presentar un bon grau de concordança entre observadors amb una ICC de 0.63 (Shrout and Fleiss, 1979). Això és especialment important ja que aquests paràmetres són determinants per detectar correctament les fecundacions anòmales (> 3PN, 3PN, 1PN).

Finalment en aquest treball es va avaluar per primer cop la concordança entre observadors a l'hora de valorar el temps d'aparició del segon corpuscle polar (tPB2). Els resultats Inter-observador van mostrar que la concordança era baixa entre embriòlegs amb alt grau d'experiència (ICC de 0,51) i encara menor entre embriòlegs novells (ICC 0,27), (Shrout and Fleiss, 1979). Aquests resultats reflecteixen la dificultat d'aquesta mesura. Però malgrat això en l'anàlisi intra-observador la concordança va resultar bona (ICC de 0,77), la qual cosa indica que si les mesures es prenen sempre per un mateix observador, es poden considerar fiables.

Aquests resultats de fiabilitat, s'han pres com a fonamentals per extreure les conclusions dels dos treballs següents presentats en aquesta tesi, sobre l'afectació de la vitrificació oocitària i l'AOA sobre el patró morfocinètic dels embrions derivats.

3 *Time-lapse* com a eina de recerca

Tot i que actualment la tecnologia *time-lapse* s'aplica principalment en clínica per a fer avaluacions morfocinètiques, també s'utilitza en recerca clínica i bàsica del desenvolupament embrionari preimplantacional. Aquesta aplicació va creixent ja que cada cop són més els estudis publicats en els que s'ha utilitzat aquesta tecnologia i la conseqüent valoració morfocinètica en la recerca del desenvolupament embrionari (G. Coticchio et al., 2018; Esbert et al., 2018; Lammers et al., 2015; Mangoli et al., 2018; Marcos et al., 2015; Rosário et al., 2016).

En el mateix sentit, el segon treball d'aquesta tesi doctoral presenta l'avaluació del patró morfocinètic d'embrions procedents d'oòcits que han estat sotmesos a cicles de vitrificació i desvitrificació abans de ser inseminats.

Donat que és ben sabut que els primers temps de divisió cel·lular estan relacionats amb la viabilitat embrionària (Del Carmen Nogales et al., 2017; Meseguer et al., 2011; C. C. Wong et al., 2010), en aquest estudi es va valorar la morfocinètica dels embrions procedents de cicles de vitrificació per a explorar les conseqüències d'aquest factor d'exposició sobre els cicles de FIV i determinar si cal o no adaptar els indicadors de viabilitat embrionària quan s'apliquen els algoritmes a embrions derivats d'oòcits vitrificats. L'objectiu va ser comprovar la integritat i viabilitat d'aquests embrions procedents d'oòcits vitrificats ja que, tot i els bons resultats a nivell de qualitat embrionària i resultats reproductius publicats (Solé et al., 2013; Song et al., 2013), algunes evidències publicades suggerien un possible efecte a nivell molecular de la vitrificació sobre els oòcits (Chamayou et al., 2011; Martínez-Burgos et al., 2011; Shi et al., 2007).

Aquest estudi, va ser publicat al 2016 (Martínez et al., 2016), i va valorar els primers paràmetres de desenvolupament embrionari i els primers temps de divisió cel·lular des de t2 fins a t5. Per a fer aquesta valoració es van comparar els valors d'aquests paràmetres morfocinètics entre dos cohorts embrionàries: una d'embrions procedents de cicles de

donació d'òocits en fresc amb una altra d'embrions procedents de cicles de donació d'òocits vitrificats.

Per als temps analitzats no es van trobar diferències significatives i per tant es va concloure que la vitrificació d'òocits no afecta al patró de desenvolupament morfocinètic fins a dia 3.

Ara bé, posteriorment al 2016 s'han publicat estudis similars però que han ampliat les variables d'anàlisi. Concretament s'han trobat diferències entre el temps de formació del blastocist (tB) entre embrions procedents d'òocits frescos i vitrificats (Cobo et al., 2017). Això en part coincideix amb els nostres resultats però apunta a un desenvolupament més lent dels embrions procedents d'òocits vitrificats a partir de dia 3 que és quan s'activa més notablement l'expressió del genoma humà (Braude et al., 1988; Vassena et al., 2011). No obstant, en els resultats de l'estudi de Cobo i col·laboradors (Cobo et al., 2017), tampoc es van trobar diferències significatives en els resultats reproductius a nivell d'implantació entre embrions procedents d'òocits frescos i vitrificats.

Més recentment s'ha publicat un treball en el que es va analitzar una mostra més gran d'embrions i en la que es van trobar diferències significatives en dotze paràmetres *time-lapse* entre embrions procedents d'òocits germans (sibling) vitrificats i frescos de cicles donació (De Gheselle et al., 2020). Aquest estudi va concloure que la velocitat de desenvolupament embrionari dels embrions procedents d'òocits vitrificats és més lenta que la d'embrions procedents d'òocits frescos.

Per tant, davant d'aquests resultats podem concloure que la nostra hipòtesi inicial no estava desencaminada i que la vitrificació dels òocits podria tenir un efecte sobre el desenvolupament morfocinètic embrionari, que es posaria especialment de manifest a partir del tercer dia de vida de l'embrió. Tot i que en el nostre estudi no vam trobar diferències significatives entre cohorts, és possible que en els nostres resultats hi influís la mida de la mostra, l'acotació de l'edat de les donants d'òocits (menors de 30 anys) i a què no es van poder analitzar els paràmetres *time-lapse* a partir de dia 3 (des de t5 fins a tB), degut a que la majoria dels cultius embrionaris inclosos en el nostre estudi s'aturaven a dia 3 de desenvolupament, per a realitzar les transferències a dia 3. Aquests paràmetres si

s'han analitzat i mostrat en els esmentats altres estudis posteriors (Cobo et al., 2017; De Gheselle et al., 2020).

Per altra banda, en el tercer treball de la present tesi doctoral, es va estudiar l'efecte de l'aplicació d'AOA sobre el patró morfocinètic dels embrions resultants, amb la mateixa premissa que l'anterior treball, que accepta que els primers temps de divisió cel·lular estan relacionats amb la viabilitat embrionària (Meseguer et al., 2011; Petersen et al., 2016; Wong et al., 2010).

En el cas de la vitrificació d'òocits, tot i que hi havia certa evidència de que es tracta d'una tècnica que pot tenir un efecte nociu a nivell molecular, es considerava una tècnica que ja estava establerta i àmpliament protocol·litzada als laboratoris de FIV (Solé et al., 2013). Per contra, en el cas de l'AOA, es tracta d'una tècnica encara molt controvertida a nivell clínic i que presenta per tant més justificació en l'estudi del seu impacte a nivell de desenvolupament embrionari.

Actualment encara no hi ha un consens clínic clar que aprovi la manera d'actuar per aplicar AOA als laboratoris de FIV. Però independentment dels ionòfors o protocols que s'usin, es ben sabut que l'aplicació d'AOA exposa als òocits a uns nivell de Ca^{2+} artificial que fan que incrementi tant el flux de Ca^{2+} extracel·lular com l'intracel·lular (Ferrer-Buitrago et al., 2018).

En el tercer treball presentat en aquesta tesi, s'ha avaluat el possible efecte d'aquests pics de Ca^{2+} durant el protocol d'AOA a nivell de patró morfocinètic dels embrions resultants. Per a fer-ho s'ha fet una comparativa dels valors dels paràmetres *time-lapse* des de tPB2 fins a tB entre una cohort d'embrions procedents de cicles de donació d'òocits on es va realitzar la inseminació amb ICSI i AOA i una cohort d'embrions on no es va aplicar AOA i va servir per tant de control.

Tot i que per a la majoria de variables morfocinètiques no es van trobar diferències significatives entre els embrions de cicles ICSI amb AOA i els de cicles ICSI sense AOA, si que

es van trobar diferències significatives en alguns paràmetres: en tPB2 i t3 entre les dues cohorts analitzades.

Pel paràmetre tPB2, es va proposar que probablement les altes concentracions de Ca^{2+} extracel·lular durant els processos de AOA, eren capaces de desbloquejar la l'estat de MII de l'oòcit de manera accelerada, avançant el desbloqueig meiòtic. En condicions normals o fisiològiques aquest desbloqueig és produït per l'entrada de l'espermatozou dins l'oòcit i la conseqüent activació de la cascada de senyalitzacions Ca^{2+} dependents (Gadella & Evans, 2011; Rogers et al., 2004; Saunders et al., 2002).

És interessant, però, el fet que tot i haver aquesta acceleració en el procés de la maduració oocitària, el següent esdeveniment subjacent a la fecundació que és l'aparició dels 2 pronuclis (tPN), no es va mostrar diferent entre les cohorts estudiades. Aquest resultat, conjuntament amb altres estudis que apunten a què es poden formar 3 pronuclis tot i no haver extrusionat els segon corpuscle polar (Grossmann et al., 1997) o tot i haver al medi baixes concentracions de Ca^{2+} (Miao & Williams, 2012), suggereixen una independència en les vies de senyalització entre aquests dos fenòmens (extrusió del segon corpuscle polar i formació de pronuclis).

A partir de l'aparició dels pronuclis, a més, es manté l'equivalència entre paràmetres morfocinètics, exceptuant t3. Però tot i que efectivament no hi ha diferències significatives, es pot observar una tendència a l'acceleració del desenvolupament embrionari en els embrions procedents de cicles ICSI on s'ha aplicat AOA, fins a dia 3. Aquest fet és interessant ja que és a partir del dia 3 de vida que s'activa més dràsticament l'expressió del genoma humà (Braude et al., 1988; Vassena et al., 2011), i per tant això podria ser un factor que estabilitzés o frenés la morfocinètica de desenvolupament embrionari en els embrions procedents de cicles d'ICSI amb AOA.

4 El futur del *time-lapse*: entrant en l'era de la intel·ligència artificial

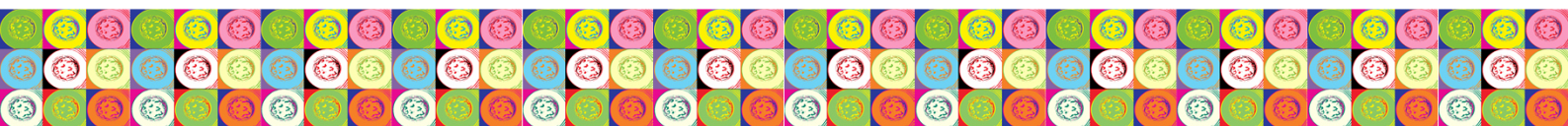
Independentment de la controvèrsia comentada anteriorment sobre la efectivitat i la reproductibilitat dels sistemes *time-lapse*, els avantatges d'aquesta tecnologia són probablement molts més de els que ara mateix es contemplen. Els sistemes *time-lapse* es poden considerar el primer pas cap a l'avaluació autònoma de desenvolupament embrionari amb sistemes d'intel·ligència artificial (IA). Concretament alguns sistemes *time-lapse* actuals com l'Embryoscope® ja incorporen alguna adaptació d'IA en els seus softwares d'avaluació, però val a dir que encara disten de fer una avaluació purament autònoma i independent a l'ull clínic de l'embrióleg.

Recentment s'han publicat diferents treballs on es mostra com, poc a poc, la IA va entrant dins del món de la FIV (Babayev & Feinberg, 2020; Tran et al., 2019). Alguns d'aquests treballs proposen, per exemple, mètodes automàtics de classificació embrionària en estadis precompactació i de blastocist (Khosravi et al., 2019; Kragh et al., 2019). També hi ha treballs que han publicat mètodes d'avaluació del desenvolupament embrionari basats en la IA, mostrant-ne l'efectivitat. Aquests mètodes arriben a tenir una precisió del 90% (Kanakasabapathy et al., 2019) a l'hora de classificar els embrions en estadis precompactació.

El perquè és necessària o no introduir la IA al laboratori de FIV és encara una qüestió controvertida. Els estudis publicats fins ara argumenten que és necessari utilitzar la IA a l'hora d'avaluar la qualitat embrionària per evitar la subjectivitat intrínseca a les mesures preses pels embriólegs (Kanakasabapathy et al., 2019; Khosravi et al., 2019). Aquesta afirmació és qüestionable, doncs com hem comentat al llarg d'aquesta tesi, múltiples estudis avalen la fiabilitat de les mesures d'avaluació embrionària preses pels embriólegs per categoritzar els embrions tant amb mètodes morfològics (Baxter Bendus et al., 2006) com morfocinètics (Martínez et al., 2018; Sundvall et al., 2013). Concretament, els resultats obtinguts en el nostre estudi publicat a la present tesi doctoral (Martínez et al., 2018) mostrem l'alta fiabilitat de les mesures preses amb sistemes *time-lapse* entre diferents analistes.

No obstant, és cert que l'entrada de la IA al laboratori de FIV és imminent i, val a dir, que la comunitat científica n'espera d'ella probablement més que obtenir simplement classificacions de la qualitat embrionària (Babayev & Feinberg, 2020; Fernandez et al., 2020). Per exemple, és possible que, en un futur, s'aconsegueixi automatitzar alguns processos repetitius que han de realitzar els embriòlegs quan cultiven o avaluen embrions gràcies a la IA, la qual cosa podria agilitzar la feina dels embriòlegs deixant-los temps per a altres activitats de major valor afegit. De tota manera, és possible que els aspectes més interessants que podrà avaluar la IA en un futur siguin aquells que ara ni tant sols imaginem. És possible que la IA sigui capaç de determinar, en l'observació del desenvolupament embrionari, aspectes, fenòmens i ítems que l'ull humà no és capaç de distingir per si sol.

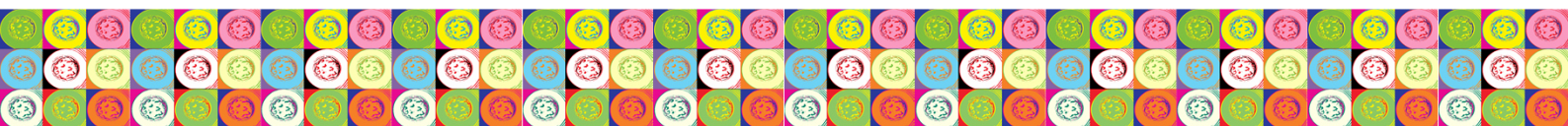
CONCLUSIONS



A partir dels treballs realitzats en aquesta tesi doctoral sobre la fiabilitat de l'ús de la tecnologia *time-lapse* com a eina clínica i de recerca, i l'estudi de les variacions en el patró morfocinètic de desenvolupament d'embrions procedents d'òcits de donant sotmesos a protocols de vitrificació o protocols d'activació oocitària assistida (AOA), podem concloure d'acord amb els objectius establerts que:

1. L'ús de la tecnologia *time-lapse* és fiable a l'hora de valorar el patró morfocinètic dels embrions en desenvolupament.
2. Aquesta fiabilitat és extensible i independent al grau de formació dels embriòlegs, exceptuant la valoració del paràmetre morfocinètic tPB2.
3. Els estudis on es vulgui tenir en compte tPB2 com a variable, han d'estar preferiblement realitzats per un mateix observador, ja que la concordança (i per tant fiabilitat de la mesura) intra-observador és per a aquest paràmetre morfocinètic alta però per contra no ho és inter-observador (quan es realitza la mateixa mesura per diferents observadors).
4. La vitrificació d'òcits no afecta al patró morfocinètic dels embrions en desenvolupament fins a dia 3.
5. L'aplicació de AOA afecta al patró morfocinètic dels paràmetres relacionats amb l'activació de l'òcit durant la fecundació, concretament accelera el desbloqueig meiótic i l'aparició dels segon corpuscle polar.
6. Exceptuant les mesures de tPB2 i t3, el patró morfocinètic dels embrions derivats de cicles d'ICSI amb AOA no es mostra significativament diferent als embrions procedents de cicles ICSI, i això està en concordança amb els resultats reproductius, els quals només mostren diferències significatives en taxa de fecundació.

BIBLIOGRAFIA



- Abe, K. ichiro, Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., Schultz, R. M., & Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804309115>
- Adamson, G. D., Abusief, M. E., Palao, L., Witmer, J., Palao, L. M., & Gvakharia, M. (2016). Improved implantation rates of day 3 embryo transfers with the use of an automated time-lapse-enabled test to aid in embryo selection. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.030>
- Aguilar, J., Motato, Y., Escribá, M. J., Ojeda, M., Muñoz, E., & Meseguer, M. (2014). The human first cell cycle: Impact on implantation. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.014>
- Alizadeh, Z., Kageyama, S. I., & Aoki, F. (2005). Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: Selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.20340>
- Alvarez, M., Solé, M., Devesa, M., Fábregas, R., Boada, M., Tur, R., Coroleu, B., Veiga, A., & Barri, P. N. (2014). Live birth using vitrified-warmed oocytes in invasive ovarian cancer: Case report and literature review. In *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.010>
- Aparicio, B., Cruz, M., & Meseguer, M. (2013). Is morphokinetic analysis the answer? In *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.017>
- Apter, S., Ebner, T., Freour, T., Guns, Y., Kovacic, B., Le Clef, N., Marques, M., Meseguer, M., Montjean, D., Sfontouris, I., Sturmey, R., & Coticchio, G. (2020). Good practice recommendations for the use of time-lapse technology†. *Human Reproduction Open*. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoaa008>
- Arce, J. C., Ziebe, S., Lundin, K., Janssens, R., Helmgard, L., & Sørensen, P. (2006). Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/del106>
- Armstrong, S., Bhide, P., Jordan, V., Pacey, A., & Farquhar, C. (2018). *Time-lapse systems for embryo incubation and assessment in assisted reproduction (Review) SUMMARY OF FINDINGS FOR THE MAIN COMPARISON*. 5. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011320.pub3.www.cochranelibrary.com>
- Armstrong, S., Vail, A., Mastenbroek, S., Jordan, V., & Farquhar, C. (2015). Time-lapse in the IVF-lab: How should we assess potential benefit? In *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu250>
- Arnold, S. J., & Robertson, E. J. (2009). Making a commitment: Cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm2618>

- Asch, R., Simerly, C., Ord, T., Ord, V. A., & Schatten, G. (1995). The stages at which human fertilization arrests: Microtubule and chromosome configurations in inseminated oocytes which failed to complete fertilization and development in humans. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/1.5.239>
- Azzarello, A., Hoest, T., & Mikkelsen, A. L. (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des210>
- Babayev, E., & Feinberg, E. C. (2020). Embryo through the lens: from time-lapse cinematography to artificial intelligence. In *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.12.001>
- Balaban, Başak, Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., Ebner, T., Gardner, D., Hardarson, T., Lundin, K., Magli, M. C., Mortimer, D., Mortimer, S., Munné, S., Royere, D., Scott, L., Smitz, J., Thornhill, A., Van Blerkom, J., & Van Den Abbeel, E. (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.02.001>
- Balaban, Basak, Yakin, K., Urman, B., Isiklar, A., & Tesarik, J. (2004). Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61651-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61651-3)
- Barberet, J., Bruno, C., Valot, E., Antunes-Nunes, C., Jonval, L., Chammas, J., Choux, C., Ginod, P., Sagot, P., Soudry-Faure, A., & Fauque, P. (2019). Can novel early non-invasive biomarkers of embryo quality be identified with time-lapse imaging to predict live birth? *Human Reproduction (Oxford, England)*, 34(8), 1439–1449. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez085>
- Basile, N., Caiazza, M., & Meseguer, M. (2015). What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes? In *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000166>
- Basile, N., Morbeck, D., García-Velasco, J., Bronet, F., & Meseguer, M. (2013). Type of culture media does not affect embryo kinetics: A time-lapse analysis of sibling oocytes. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des462>
- Basile, N., Nogales, M. D. C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., García-Velasco, J., & Meseguer, M. (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.005>
- Baxter Bendus, A. E., Mayer, J. F., Shipley, S. K., & Catherino, W. H. (2006). Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.05.037>

- Best, L., Campbell, A., Duffy, S., Montgomery, S., & Fishel, S. (2013). O-214 does one model fit all? Testing a published embryo selection algorithm on independent time-lapse data. *Human Reproduction*.
- Bland, J. M., & Altman, D. G. (1990). A note on the use of the intraclass correlation coefficient in the evaluation of agreement between two methods of measurement. *Computers in Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0010-4825\(90\)90013-F](https://doi.org/10.1016/0010-4825(90)90013-F)
- Bonte, D., Ferrer-Buitrago, M., Dhaenens, L., Popovic, M., Thys, V., De Croo, I., De Gheselle, S., Steyaert, N., Boel, A., Vanden Meerschaut, F., De Sutter, P., & Heindryckx, B. (2019). Assisted oocyte activation significantly increases fertilization and pregnancy outcome in patients with low and total failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection: a 17-year retrospective study. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.04.006>
- Borges, E., Ferreira Braga, D. P. de A., de Sousa Bonetti, T. C., Iaconelli, A., & Franco, J. G. (2009). Artificial oocyte activation using calcium ionophore in ICSI cycles with spermatozoa from different sources. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60423-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60423-3)
- Botros, L., Sakkas, D., & Seli, E. (2008). Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Molecular Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan066>
- Braude, P., Bolton, V., & Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/332459a0>
- Cabello, Y., Gómez-Palomares, J. L., Castilla, J. A., Hernández, J., Marqueta, J., Pareja, A., Luceño, F., Hernández, E., & Coroleu, B. (2010). Impact of the Spanish Fertility Society guidelines on the number of embryos to transfer. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.020>
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Hickman, C. F. L. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.006>
- Cetinkaya, M., Pirkevi, C., Yelke, H., Colakoglu, Y. K., Atayurt, Z., & Kahraman, S. (2014). Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0341-x>
- Chamayou, S., Bonaventura, G., Alecci, C., Tibullo, D., Di Raimondo, F., Guglielmino, A., & Barcellona, M. L. (2011). Consequences of metaphase II oocyte cryopreservation on mRNA content. *Cryobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2011.01.014>

- Chamayou, S., Romano, S., Alecci, C., Storaci, G., Ragolia, C., Palagiano, A., & Guglielmino, A. (2015). Oocyte vitrification modifies nucleolar remodeling and zygote kinetics—a sibling study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0446-x>
- Chang, C. C., Elliott, T. A., Wright, G., Shapiro, D. B., Toledo, A. A., & Nagy, Z. P. (2013). Prospective controlled study to evaluate laboratory and clinical outcomes of oocyte vitrification obtained in in vitro fertilization patients aged 30 to 39 years. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.02.008>
- Chavez, S. L., Loewke, K. E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., Behr, B., & Reijo Pera, R. A. (2012). Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms2249>
- Chawla, M., Fakhri, M., Shunnar, A., Bayram, A., Hellani, A., Perumal, V., Divakaran, J., & Budak, E. (2014). Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0372-3>
- Chen, A. A., Tan, L., Suraj, V., Reijo Pera, R., & Shen, S. (2013). Biomarkers identified with time-lapse imaging: Discovery, validation, and practical application. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.143>
- Chen, M., Wei, S., Hu, J., Yuan, J., & Liu, F. (2017). Does time-lapse imaging have favorable results for embryo incubation and selection compared with conventional methods in clinical in vitro fertilization? A meta-analysis and systematic review of randomized controlled trials. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178720>
- Chen, Z., & Zhang, Y. (2019). Loss of DUX causes minor defects in zygotic genome activation and is compatible with mouse development. In *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0418-7>
- Chian, R. C., Wang, Y., & Li, Y. R. (2014). Oocyte vitrification: Advances, progress and future goals. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0180-9>
- Ciray, H. Nadir, Campbell, A., Agerholm, I. E., Aguilar, J., Chamayou, S., Esbert, M., & Sayed, S. (2014). Proposed guidelines on the nomenclature and annotation of dynamic human embryo monitoring by a time-lapse user group. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu278>
- Ciray, Haydar Nadir, Aksoy, T., Goktas, C., Ozturk, B., & Bahceci, M. (2012). Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media—a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9818-7>
- Clift, D., & Schuh, M. (2013). Restarting life: Fertilization and the transition from meiosis to

- mitosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/nrm3643>
- Cobo, A. (2012). Oocyte vitrification: A watershed in ART. In *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1096>
- Cobo, A., Coello, A., Remohí, J., Serrano, J., de los Santos, J. M., & Meseguer, M. (2017). Effect of oocyte vitrification on embryo quality: time-lapse analysis and morphokinetic evaluation. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.024>
- Cobo, A., Domingo, J., Pérez, S., Crespo, J., Remohí, J., & Pellicer, A. (2008). Vitrification: An effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients. *Clinical and Translational Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s12094-008-0196-7>
- Cobo, A., Kuwayama, M., Pérez, S., Ruiz, A., Pellicer, A., & Remohí, J. (2008). Comparison of concomitant outcome achieved with fresh and cryopreserved donor oocytes vitrified by the Cryotop method. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.050>
- Cobo, A., Serra, V., Garrido, N., Olmo, I., Pellicer, A., & Remohí, J. (2014). Obstetric and perinatal outcome of babies born from vitrified oocytes. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.019>
- Combelles, C. M. H., Morozumi, K., Yanagimachi, R., Zhu, L., Fox, J. H., & Racowsky, C. (2010). Diagnosing cellular defects in an unexplained case of total fertilization failure. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deq064>
- Conaghan, J., Chen, A. A., Willman, S. P., Ivani, K., Chenette, P. E., Boostanfar, R., Baker, V. L., Adamson, G. D., Abusief, M. E., Gvakharia, M., Loewke, K. E., & Shen, S. (2013). Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: Results from a prospective multicenter trial. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.021>
- Condic, M. L. (2014). Totipotency: What it is and what it is not. In *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0364>
- Coroleu, B., Barri, P. N., Carreras, O., Belil, I., Buxaderas, R., Veiga, A., & Balasch, J. (2006). Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: A prospective, randomized, controlled study. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/del045>
- Coroleu, B., Barri, P. N., Carreras, O., Martinez, F., Veiga, A., & Balasch, J. (2002). The usefulness of ultrasound guidance in frozen-thawed embryo transfer: A prospective randomized clinical trial. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2885>
- Coticchio, G., Renzini, M. M., Novara, P. V., Lain, M., Ponti, E. De, Turchi, D., Fadini, R., & Canto, M. D. (2018). Focused time-lapse analysis reveals novel aspects of human

fertilization and suggests new parameters of embryo viability. *Human Reproduction*.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dex344>

Coticchio, Giovanni, Bromfield, J. J., Sciajno, R., Gambardella, A., Scaravelli, G., Borini, A., & Albertini, D. F. (2009). Vitrification may increase the rate of chromosome misalignment in the metaphase II spindle of human mature oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60281-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60281-7)

Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., & Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive BioMedicine Online*.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.06.017>

Cuevas Saiz, I., Carne Pons Gatell, M., Vargas, M. C., Delgado Mendive, A., Rives Enedáguila, N., Moragas Solanes, M., Carrasco Canal, B., Teruel López, J., Busquets Bonet, A., & Hurtado de Mendoza Acosta, M. V. (2018). The Embryology Interest Group: updating ASEBIR's morphological scoring system for early embryos, morulae and blastocysts. *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*.
<https://doi.org/10.1016/j.medre.2017.11.002>

D'Haeseleer, E., Vanden Meerschaut, F., Bettens, K., Luyten, A., Gysels, H., Thienpont, Y., De Witte, G., Heindryckx, B., Oostra, A., Roeyers, H., Sutter, P. De, & Van Lierde, K. (2014). Language development of children born following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) combined with assisted oocyte activation (AOA). *International Journal of Language and Communication Disorders*. <https://doi.org/10.1111/1460-6984.12100>

Dal Canto, M., Coticchio, G., Mignini Renzini, M., De Ponti, E., Novara, P. V., Brambillasca, F., Comi, R., & Fadini, R. (2012). Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.07.016>

De Assín, R. R., Clavero, A., Gonzalvo, M. C., Ramírez, J. P., Zamora, S., Fernández, A., Martínez, L., & Castilla, J. A. (2009). Comparison of methods to determine the assigned value in an external quality control programme for embryo evaluation. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.09.026>

De Gheselle, S., De Sutter, P., & Tilleman, K. (2020). In-vitro development of embryos derived from vitrified-warmed oocytes is delayed compared with embryos derived from fresh oocytes: a time-lapse sibling oocyte study. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.09.010>

Deemeh, M. R., Tavalae, M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2015). Health of children born through artificial oocyte activation: A pilot study. *Reproductive Sciences*.
<https://doi.org/10.1177/1933719114542017>

- Del Carmen Nogales, M., Bronet, F., Basile, N., Martínez, E. M., Liñán, A., Rodrigo, L., & Meseguer, M. (2017). Type of chromosome abnormality affects embryo morphology dynamics. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.019>
- Desai, N., Goldberg, J. M., Austin, C., & Falcone, T. (2018). Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.12.025>
- Desch, L., Bruno, C., Luu, M., Barberet, J., Choux, C., Lamotte, M., Schmutz, E., Sagot, P., & Fauque, P. (2017). Embryo multinucleation at the two-cell stage is an independent predictor of intracytoplasmic sperm injection outcomes. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.09.022>
- Diamond, M. P., Suraj, V., Behnke, E. J., Yang, X., Angle, M. J., Lambe-Steinmiller, J. C., Watterson, R., Athayde Wirka, K., Chen, A. A., & Shen, S. (2014). Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0366-1>
- Diedrich, K., Fauser, B. C. J. M., Devroey, P., & Griesinger, G. (2007). The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm011>
- Dobson, A. T., Raja, R., Abeyta, M. J., Taylor, T., Shen, S., Haqq, C., & Reijo Pera, R. A. (2004). The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Human Molecular Genetics*. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh157>
- Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2013). Fertility preservation in women. In *Nature Reviews Endocrinology*. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.205>
- Ducibella, T., & Fissore, R. (2008). The roles of Ca²⁺, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. In *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.12.012>
- Ducibella, T., Huneau, D., Angelichio, E., Xu, Z., Schultz, R. M., Kopf, G. S., Fissore, R., Madoux, S., & Ozil, J.-P. (2002). Egg-to-Embryo Transition Is Driven by Differential Responses to Ca²⁺ Oscillation Number. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.2002.0788>
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., & Tews, G. (2003). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: A review. In *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg021>
- Ergin, E. G., Çalışkan, E., Yalçinkaya, E., Öztel, Z., Çökelez, K., Özay, A., & Özörnek, H. M. (2014). Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its

impact on pregnancy outcome. *Fertility and Sterility*.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.030>

- Esbert, M., Pacheco, A., Soares, S. R., Amorós, D., Florensa, M., Ballesteros, A., & Meseguer, M. (2018). High sperm DNA fragmentation delays human embryo kinetics when oocytes from young and healthy donors are microinjected. *Andrology*.
<https://doi.org/10.1111/andr.12551>
- Esfandiari, N., Javed, M. H., Gotlieb, L., & Casper, R. F. (2005). Complete failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection - Analysis of 10 years' data. *International Journal of Fertility and Women's Medicine*.
- Faramarzi, A., Khalili, M. A., Micara, G., & Agha-Rahimi, A. (2017). Revealing the secret life of pre-implantation embryos by time-lapse monitoring: A review. In *International Journal of Reproductive BioMedicine*. <https://doi.org/10.29252/ijrm.15.5.257>
- Fatemi, H. M., & Popovic-Todorovic, B. (2013). Implantation in assisted reproduction: A look at endometrial receptivity. In *Reproductive BioMedicine Online*.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.05.018>
- Fernandez, E. I., Ferreira, A. S., Cecílio, M. H. M., Chéles, D. S., de Souza, R. C. M., Nogueira, M. F. G., & Rocha, J. C. (2020). Artificial intelligence in the IVF laboratory: overview through the application of different types of algorithms for the classification of reproductive data. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
<https://doi.org/10.1007/s10815-020-01881-9>
- Ferrer-Buitrago, M., Bonte, D., De Sutter, P., Leybaert, L., & Heindryckx, B. (2018). Single Ca²⁺ transients vs oscillatory Ca²⁺ signaling for assisted oocyte activation: Limitations and benefits. In *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0098>
- Forman, E. J., Li, X., Ferry, K. M., Scott, K., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2012). Oocyte vitrification does not increase the risk of embryonic aneuploidy or diminish the implantation potential of blastocysts created after intracytoplasmic sperm injection: A novel, paired randomized controlled trial using DNA fingerprinting. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.028>
- Freour, T., Basile, N., Barriere, P., & Meseguer, M. (2015). Systematic review on clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring. *Human Reproduction Update*, 21(1), 153–154.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmu054>
- Fujiwara, M., Takahashi, K., Izuno, M., Duan, Y. R., Kazono, M., Kimura, F., & Noda, Y. (2007). Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: Comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
<https://doi.org/10.1007/s10815-006-9088-3>

- Gadella, B. M., & Evans, J. P. (2011). Membrane fusions during mammalian fertilization. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4_5
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1997). Culture and selection of viable blastocysts: A feasible proposition for human IVF? In *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/3.4.367>
- Gardner, D. K., & Lane, M. (1998). Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Human Reproduction*. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_3.148
- Gardner, D. K., & Schoolcraft, W. B. (1999). Culture and transfer of human blastocysts. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1097/00001703-199906000-00013>
- Gianaroli, L., Racowsky, C., Geraedts, J., Cedars, M., Makrigiannakis, A., & Lobo, R. A. (2012). Best practices of ASRM and ESHRE: A journey through reproductive medicine. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1164>
- Giorgetti, L., Vergara, M. R., Evangelista, M., Lo Schiavo, F., Terzi, M., & Nuti Ronchi, V. (1995). On the occurrence of somatic meiosis in embryogenic carrot cell cultures. *MGG Molecular & General Genetics*. <https://doi.org/10.1007/BF00290710>
- Goodman, L. R., Goldberg, J., Falcone, T., Austin, C., & Desai, N. (2016). Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.10.013>
- Grossmann, M., Calafell, J. M., Brandy, N., Vanrell, J. A., Rubio, C., Pellicer, A., Egozcue, J., Vidal, F., & Santaló, J. (1997). Origin of trippronucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.12.2762>
- Gulyas, B. J. (1975). A reexamination of cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: Rotation of blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. *Journal of Experimental Zoology*. <https://doi.org/10.1002/jez.1401930212>
- Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., & Lundin, K. (2001). Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: Indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.2.313>
- Hardarson, T., Löfman, C., Coull, G., Sjögren, A., Hamberger, L., & Edwards, R. G. (2002). Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reproductive Biomedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61594-5](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61594-5)
- Hardarson, Thorir, Van Landuyt, L., & Jones, G. (2012). The blastocyst. *Human Reproduction*

(Oxford, England). <https://doi.org/10.1093/humrep/des230>

- Heindryckx, Björn, De Gheselle, S., Gerris, J., Dhont, M., & De Sutter, P. (2008). Efficiency of assisted oocyte activation as a solution for failed intracytoplasmic sperm injection. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60313-6](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60313-6)
- Heindryckx, Björn, Van der Elst, J., De Sutter, P., & Dhont, M. (2005). Treatment option for sperm- or oocyte-related fertilization failure: Assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei029>
- Herrero, J., & Meseguer, M. (2013). Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: The era of morphokinetics. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.089>
- Holte, J., Berglund, L., Milton, K., Garello, C., Gennarelli, G., Revelli, A., & Bergh, T. (2007). Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/del403>
- Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., & Mio, Y. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0195-2>
- Janny, L., & Menezo, Y. J. R. (1996). Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Molecular Reproduction and Development*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199609\)45:1<31::AID-MRD4>3.3.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199609)45:1<31::AID-MRD4>3.3.CO;2-1)
- Kahraman, S., Çetinkaya, M., Pirkevi, C., Yelke, H., & Kumtepe, Y. (2012). Comparison of Blastocyst Development and Cycle Outcome in Patients with eSET Using Either Conventional or Time Lapse Incubators. A Prospective Study of Good Prognosis Patients. *Journal of Reproductive and Stem Cell Biotechnology*. <https://doi.org/10.1177/205891581200300204>
- Kanakasabapathy, M. K., Thirumalaraju, P., Bormann, C. L., Kandula, H., Dimitriadis, I., Souter, I., Yogesh, V., Kota Sai Pavan, S., Yarravarapu, D., Gupta, R., Pooniwala, R., & Shafiee, H. (2019). Development and evaluation of inexpensive automated deep learning-based imaging systems for embryology. *Lab on a Chip*. <https://doi.org/10.1039/c9lc00721k>
- Kaser, D. J., Farland, L. V., Missmer, S. A., & Racowsky, C. (2017). Prospective study of automated versus manual annotation of early time-lapse markers in the human preimplantation embryo. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex229>
- Kaser, D. J., & Racowsky, C. (2014). Clinical outcomes following selection of human

preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Human Reproduction Update*, 20(5), 617–631. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu023>

- Kemler, R. (1993). From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. In *Trends in Genetics*. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90250-L](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90250-L)
- Khosravi, P., Kazemi, E., Zhan, Q., Malmsten, J. E., Toschi, M., Zisimopoulos, P., Sigaras, A., Lavery, S., Cooper, L. A. D., Hickman, C., Meseguer, M., Rosenwaks, Z., Elemento, O., Zaninovic, N., & Hajirasouliha, I. (2019). Deep learning enables robust assessment and selection of human blastocysts after in vitro fertilization. *Npj Digital Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41746-019-0096-y>
- Kieslinger, D. C., De Gheselle, S., Lambalk, C. B., De Sutter, P., Kosteljik, E. H., Twisk, J. W. R., Van Rijswijk, J., Van Den Abbeel, E., & Vergouw, C. G. (2016). Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: A prospective two-center pilot study. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew207>
- Kirkegaard, K., Kesmodel, U. S., Hindkjær, J. J., & Ingerslev, H. J. (2013). Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: A prospective cohort study. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/det300>
- Kirkegaard, Kirstine, Agerholm, I. E., & Ingerslev, H. J. (2012). Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. In *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des079>
- Kirkegaard, Kirstine, Ahlström, A., Ingerslev, H. J., & Hardarson, T. (2015). Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. In *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.003>
- Kirkegaard, Kirstine, Hindkjaer, J. J., & Ingerslev, H. J. (2013). Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.028>
- Kottner, J., Audige, L., Brorson, S., Donner, A., Gajewski, B. J., Hróbjartsson, A., Roberts, C., Shoukri, M., & Streiner, D. L. (2011). Guidelines for Reporting Reliability and Agreement Studies (GRRAS) were proposed. *International Journal of Nursing Studies*. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2011.01.016>
- Kottner, J., & Streiner, D. L. (2011). The difference between reliability and agreement. In *Journal of Clinical Epidemiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.12.001>
- Kragh, M. F., Rimestad, J., Berntsen, J., & Karstoft, H. (2019). Automatic grading of human blastocysts from time-lapse imaging. *Computers in Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2019.103494>

- Kramer, Y. G., Kofinas, J. D., Melzer, K., Noyes, N., McCaffrey, C., Buldo-Licciardi, J., McCulloh, D. H., & Grifo, J. A. (2014). Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-014-0285-1>
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. In *Journal of animal science*. https://doi.org/10.2527/2004.8213_supplE14x
- Kupka, M. S., Ferraretti, A. P., de Mouzon, J., Erb, K., D'Hooghe, T., Castilla, J. A., Calhaz-Jorge, C., De Geyter, C., Goossens, V., Strohmer, H., Bogaerts, K., D'Hooghe, T., Kyurkchiev, S., Antonova, I., Rezabek, K., Markova, J., Erb, K., Gissler, M., Tiitinen, A., ... Baranowski, R. (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: Results generated from European registers by ESHRE. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu175>
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., & Leibo, S. P. (2005). Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60837-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60837-1)
- L., R., M., S., A., C., R., M., S., R., A., A., C., S., D., C., E., I., L., D., & F., S. (2014). Aneuploidy and implantation potential of euploid blastocysts cannot be predicted by non-invasive morphokinetic analysis during in vitro culture. *Human Reproduction*. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/humrep/29.Supplement_1.1
- Lammers, J., Reignier, A., Spingart, C., Catteau, A., David, L., Barriere, P., & Freour, T. (2015). Does sperm origin affect embryo morphokinetic parameters? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0517-z>
- Lan, K. C., Huang, F. J., Lin, Y. C., Kung, F. T., Hsieh, C. H., Huang, H. W., Tan, P. H., & Chang, S. Y. (2003). The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg239>
- Lee, B., Yoon, S. Y., & Fissore, R. A. (2006). Regulation of fertilization-initiated [Ca²⁺]_i oscillations in mammalian eggs: A multi-pronged approach. In *Seminars in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2006.02.011>
- Lemmen, J. G., Agerholm, I., & Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60222-2](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60222-2)
- Liu, Y., Chapple, V., Feenan, K., Roberts, P., & Matson, P. (2016). Time-lapse deselection

- model for human day 3 in vitro fertilization embryos: The combination of qualitative and quantitative measures of embryo growth. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.003>
- Liu, Y., Feenan, K., Chapple, V., & Matson, P. (2019). Assessing efficacy of day 3 embryo time-lapse algorithms retrospectively: impacts of dataset type and confounding factors. *Human Fertility*. <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1425919>
- Lonergan, P., Rizos, D., Guitiérrez-Adán, A., & Boland, M. P. (2003). Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - Experience from animal studies. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)62088-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)62088-3)
- M.G., M., A., C., T., R., A., R., V., C., F., S. S., F., S. S., F., F., M.T., V., E., G., Minasi, M. G., Colasante, A., Riccio, T., Ruberti, A., Casciani, V., Scarselli, F., Spinella, F., Fiorentino, F., Varricchio, M. T., & Greco, E. (2016). Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew183>
- Machaca, K. (2004). Increased sensitivity and clustering of elementary Ca²⁺ release events during oocyte maturation. *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.08.004>
- Malcuit, C., Kurokawa, M., & Fissore, R. A. (2006a). Calcium oscillations and mammalian egg activation. In *Journal of Cellular Physiology*. <https://doi.org/10.1002/jcp.20471>
- Malcuit, C., Kurokawa, M., & Fissore, R. A. (2006b). Calcium oscillations and mammalian egg activation. *Journal of Cellular Physiology*, 206(3), 565–573. <https://doi.org/10.1002/jcp.20471>
- Mangoli, E., Khalili, M. A., Talebi, A. R., Ghasemi-Esmailabad, S., & Hosseini, A. (2018). Is there any correlation between sperm parameters and chromatin quality with embryo morphokinetics in patients with male infertility? *Andrologia*. <https://doi.org/10.1111/and.12997>
- Marcos, J., Pérez-Albalá, S., Mifsud, A., Molla, M., Landeras, J., & Meseguer, M. (2015). Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: A time-lapse study. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev216>
- Marek, D., Langley, M., Gardner, D. K., Confer, N., Doody, K. M., & Doody, K. J. (1999). Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertility and Sterility*. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00409-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00409-4)
- Martínez-Burgos, M., Herrero, L., Megías, D., Salvanes, R., Montoya, M. C., Cobo, A. C., & Garcia-Velasco, J. A. (2011). Vitrification versus slow freezing of oocytes: Effects on morphologic appearance, meiotic spindle configuration, and DNA damage. *Fertility*

and Sterility. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1089>

- Martínez, M., Obradors, A., Vernaev, V., Santaló, J., & Vassena, R. (2016). Oocyte vitrification does not affect early developmental timings after intracytoplasmic sperm injection for women younger than 30 years old. *Molecular Reproduction and Development*, 83(7). <https://doi.org/10.1002/mrd.22667>
- Martínez, M., Santaló, J., Rodríguez, A., & Vassena, R. (2018). High reliability of morphokinetic annotations among embryologists. *Human Reproduction Open*. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoy009>
- Mature oocyte cryopreservation: A guideline. (2013). *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.09.028>
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remoh, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/der256>
- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., & Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.016>
- Miao, Y. L., & Williams, C. J. (2012). Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: The influence of subcellular localization. In *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.22078>
- Milewski, R., Kuć, P., Kuczyńska, A., Stankiewicz, B., Łukaszuk, K., & Kuczyński, W. (2015). A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0440-3>
- Mio, Y., & Maeda, K. (2008). Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.07.023>
- Montag, M., Liebenthron, J., & Köster, M. (2011). Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? *Placenta*. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.07.009>
- Montjean, D., Geoffroy-Siraudin, C., Gervoise-Boyer, M., Tourame, P., & Boyer, P. (2015). Morphokinetics analysis of embryos derived from vitrified/warmed oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0569-0>
- Monzo, C., Haouzi, D., Roman, K., Assou, S., Dechaud, H., & Hamamah, S. (2012). Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des153>

- Moos, J., Visconti, P. E., Moore, G. D., Schultz, R. M., & Kopf, G. S. (1995). Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.3.692>
- Motato, Y., de los Santos, M. J., Escriba, M. J., Ruiz, B. A., Remohí, J., & Meseguer, M. (2016). Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.001>
- Muñoz, M., Cruz, M., Humaidan, P., Garrido, N., Pérez-Cano, I., & Meseguer, M. (2012). Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.06.016>
- Murugesu, S., Saso, S., Jones, B. P., Bracewell-Milnes, T., Athanasiou, T., Mania, A., Serhal, P., & Ben-Nagi, J. (2017). Does the use of calcium ionophore during artificial oocyte activation demonstrate an effect on pregnancy rate? A meta-analysis. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.029>
- Nagy, Z. P., Liu, J., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. (1994). Fertilization and early embryology: Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138786>
- Nagy, Zsolt P., Janssenswillen, C., Janssens, R., De Vos, A., Staessen, C., Van de Velde, H., & Van Steirteghem, A. C. (1998). 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. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.6.1606>
- Nikiforaki, D., Vanden Meerschaut, F., De Roo, C., Lu, Y., Ferrer-Buitrago, M., De Sutter, P., & Heindryckx, B. (2016). Effect of two assisted oocyte activation protocols used to overcome fertilization failure on the activation potential and calcium releasing pattern. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.007>
- Noyes, N., Porcu, E., & Borini, A. (2009). Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reproductive BioMedicine Online*. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60025-9](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60025-9)
- Okabe, M. (2013). The cell biology of mammalian fertilization. *Development (Cambridge)*. <https://doi.org/10.1242/dev.090613>
- Olivera, M., Ruiz, T., Tarazona, A., & Giraldo, C. (2006). El espermatozou, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*.
- Palermo, G. D., Schlegel, P. N., Hariprashad, J. J., Ergün, B., Mielnik, A., Zaninovic, N., Veeck,

- L. L., & Rosenwaks, Z. (1999). Fertilization and pregnancy outcome with intracytoplasmic sperm injection for azoospermic men. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.3.741>
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P., & Van Steirteghem, A. C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92425-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92425-F)
- Papale, L., Fiorentino, A., Montag, M., & Tomasi, G. (2012). The zygote. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des205>
- Parrington, J., Lai, F. A., & Swann, K. (1998). A Novel Protein for Ca²⁺ Signaling at Fertilization. *Current Topics in Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60457-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60457-3)
- Paternot, G., Wetsels, A. M., Thonon, F., Vansteenbrugge, A., Willemen, D., Devroey, J., Debrock, S., D'Hooghe, T. M., & Spiessens, C. (2011). Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: A multicentre study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-127>
- Pauken, C. M., & Capco, D. G. (1999). Regulation of cell adhesion during embryonic compaction of mammalian embryos: Roles for PKC and β -catenin. *Molecular Reproduction and Development*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199910\)54:2<135::AID-MRD5>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199910)54:2<135::AID-MRD5>3.0.CO;2-A)
- Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.3.532>
- Pennings, G., De Wert, G., Shenfield, F., Cohen, J., Tarlatzis, B., & Devroey, P. (2009). Providing infertility treatment in resource-poor countries. In *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/den503>
- Perona, R. M., & Wassarman, P. M. (1986). Mouse blastocysts hatch in vitro by using a trypsin-like proteinase associated with cells of mural trophoderm. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90382-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90382-9)
- Petersen, B. M., Boel, M., Montag, M., & Gardner, D. K. (2016). Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew188>
- Pinborg, A. (2005). IVF/ICSI twin pregnancies: Risks and prevention. In *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi027>

- Plachot, M., & Mandelbaum, J. (1990). Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *British Medical Bulletin*.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072424>
- Polanski, L. T., Coelho Neto, M. A., Nastri, C. O., Navarro, P. A., Ferriani, R. A., Raine-Fenning, N., & Martins, W. P. (2014). Time-lapse embryo imaging for improving reproductive outcomes: Systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1002/uog.13428>
- Prados, F. J., Debrock, S., Lemmen, J. G., & Agerholm, I. (2012). The cleavage stage embryo. *Human Reproduction (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des224>
- Pribenszky, C., Losonczi, E., Molnár, M., Lang, Z., Mátyás, S., Rajczy, K., Molnár, K., Kovács, P., Nagy, P., Conceicao, J., & Vajta, G. (2010). Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reproductive BioMedicine Online*.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.12.007>
- Quaas, A. M., Melamed, A., Chung, K., Bendikson, K. A., & Paulson, R. J. (2013). Egg banking in the United States: Current status of commercially available cryopreserved oocytes. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.10.047>
- Racowsky, C., Kovacs, P., & Martins, W. P. (2015). A critical appraisal of time-lapse imaging for embryo selection: where are we and where do we need to go? In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0510-6>
- Racowsky, C., Vernon, M., Mayer, J., Ball, G. D., Behr, B., Pomeroy, K. O., Winger, D., Gibbons, W., Conaghan, J., & Stern, J. E. (2010). Standardization of grading embryo morphology. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
<https://doi.org/10.1007/s10815-010-9443-2>
- Rashid, N. A., Lalitkumar, S., Lalitkumar, P. G., & Gemzell-Danielsson, K. (2011). Endometrial receptivity and human embryo implantation. *American Journal of Reproductive Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01048.x>
- Reignier, A., Girard, J. M., Lammers, J., Chtourou, S., Lefebvre, T., Barriere, P., & Freour, T. (2019). Performance of Day 5 KIDScore™ morphokinetic prediction models of implantation and live birth after single blastocyst transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 36(11), 2279–2285. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01567-x>
- Reignier, A., Lammers, J., Barriere, P., & Freour, T. (2018). Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reproductive BioMedicine Online*, 36(4), 380–387. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.01.001>
- Rice, A., Parrington, J., Jones, K. T., & Swann, K. (2000). Mammalian sperm contain a Ca²⁺-sensitive phospholipase C activity that can generate InsP₃ from PIP₂ associated with

intracellular organelles. *Developmental Biology*.
<https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9929>

- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (2012). The oocyte. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des200>
- Rienzi, L., Cobo, A., Paffoni, A., Scarduelli, C., Capalbo, A., Vajta, G., Remoh, J., Ragni, G., & Ubaldi, F. M. (2012). Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification: An observational longitudinal cohort multicentric study. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/des088>
- Robertson, S., & Lin, R. (2013). The oocyte-to-embryo transition. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4015-4-12>
- Roesner, S., Dietrich, J. E., Weigert, J., Montag, M., Toth, B., & Strowitzki, T. (2017). Time-lapse imaging reveals differences in growth dynamics of embryos after in vitro maturation compared with conventional stimulation. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.12.026>
- Rogers, N. T., Hobson, E., Pickering, S., Lai, F. A., Braude, P., & Swann, K. (2004). Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00484>
- Rosário, G. R. F., Vidal, D. S., Silva, A. V., & Franco, A. C. C. (2016). The impact of male age on embryo quality: A retrospective study using time-lapse imaging. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160041>
- Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. In *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.017178>
- Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., & Meseguer, M. (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: A randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.738>
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M. J., Bellver, J., & Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: A time-lapse study. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135>
- Sakkas, D., & Gardner, D. K. (2005). Noninvasive methods to assess embryo quality. In *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1097/01.gco.0000169106.69881.3e>
- Sakkas, D., Shoukir, Y., Chardonnens, D., Bianchi, P. G., & Campana, A. (1998). Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm

- injection as an indicator of embryo viability. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/13.1.182>
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., & Lai, F. A. (2002). PLC ζ : A sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*.
- Sawada, H., Yamazaki, K., & Hoshi, M. (1990). Trypsin-like hatching protease from mouse embryos: Evidence for the presence in culture medium and its enzymatic properties. *Journal of Experimental Zoology*. <https://doi.org/10.1002/jez.1402540112>
- Schultz, R. M., & Kopf, G. S. (1995). Molecular Basis of Mammalian Egg Activation. *Current Topics in Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60563-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60563-3)
- Scott, L. (2003). The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. In *Human Reproduction Update*. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmg023>
- Shi, L. Y., Jin, H. F., Kim, J. G., Mohana Kumar, B., Balasubramanian, S., Choe, S. Y., & Rho, G. J. (2007). Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.06.020>
- Shrout, P E, & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability.1. Shrout PE, Fleiss JL: Intraclass correlations: uses in assessing rater reliability. *Psychol Bull* 1979, 86:420–8. *Psychological Bulletin*.
- Shrout, Patrick E., & Fleiss, J. L. (1979). Intraclass correlations: Uses in assessing rater reliability. *Psychological Bulletin*. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.86.2.420>
- Siano, L., Engmann, L., Nulsen, J., & Benadiva, C. (2013). A prospective pilot study comparing fertilization and embryo development between fresh and vitrified sibling oocytes. In *Connecticut Medicine*.
- Solé, M., Santaló, J., Boada, M., Clua, E., Rodríguez, I., Martínez, F., Coroleu, B., Barri, P. N., & Veiga, A. (2013). How does vitrification affect oocyte viability in oocyte donation cycles? A prospective study to compare outcomes achieved with fresh versus vitrified sibling oocytes. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/det242>
- Song, W. yan, Xin, Z. min, Jin, H. xia, Peng, Z. feng, Chen, X. mei, Shi, S. lin, Dai, S. jun, & Sun, Y. pu. (2013). Effects of frozen timing on the spindle density, the angle between the polar body and spindle, and embryo development of intracytoplasmic sperm injection in mouse mature oocytes. *Cell Biology International*. <https://doi.org/10.1002/cbin.10073>
- Stephenson, R. O., Yamanaka, Y., & Rossant, J. (2010). Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin.

Development. <https://doi.org/10.1242/dev.050195>

- Step toe, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. In *Lancet*. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)92957-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)92957-4)
- Storr, A., Venetis, C. A., Cooke, S., Susetio, D., Kilani, S., & Ledger, W. (2015). Morphokinetic parameters using time-lapse technology and day 5 embryo quality: a prospective cohort study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0534-y>
- Stricker, S. A. (1999). Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. In *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9340>
- Sundvall, L., Ingerslev, H. J., Breth Knudsen, U., & Kirkegaard, K. (2013). Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Human Reproduction (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1093/humrep/det366>
- Swann, K., & Parrington, J. (1999). Mechanism of Ca²⁺ release at fertilization in mammals. *Journal of Experimental Zoology*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19991015\)285:3<267::AID-JEZ10>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19991015)285:3<267::AID-JEZ10>3.0.CO;2-P)
- Tejera, A., Mollá, M., Muriel, L., Remohí, J., Pellicer, A., & De Pablo, J. L. (2008). Successful pregnancy and childbirth after intracytoplasmic sperm injection with calcium ionophore oocyte activation in a globozoospermic patient. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.11.056>
- Tesarik, J., & Greco, E. (1999). The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.5.1318>
- Tesarik, J., Mendoza, C., & Greco, E. (2002). Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.184>
- Torra-Massana, M., Cornet-Bartolomé, D., Barragán, M., Durban, M., Ferrer-Vaquero, A., Zambelli, F., Rodriguez, A., Oliva, R., & Vassena, R. (2019). Novel phospholipase C zeta 1 mutations associated with fertilization failures after ICSI. *Human Reproduction (Oxford, England)*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez094>
- Tran, D., Cooke, S., Illingworth, P. J., & Gardner, D. K. (2019). Deep learning as a predictive tool for fetal heart pregnancy following time-lapse incubation and blastocyst transfer. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez064>
- Tsafir, A., Haimov-Kochman, R., Margalioth, E. J., Eldar-Geva, T., Gal, M., Bdolah, Y., Imbar, T., Hurwitz, A., Ben-Chetrit, A., & Goldberg, D. (2015). Ovarian stimulation for oocyte cryopreservation for prevention of age-related fertility loss: One in five is a low

responder. *Gynecological Endocrinology*.
<https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1062859>

- Uyar, A., & Seli, E. (2014). The impact of assisted reproductive technologies on genomic imprinting and imprinting disorders. In *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*.
<https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000071>
- Vajta, G., & Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>
- Van Den Bergh, M., Bertrand, E., & Englert, Y. (1995). Second polar body extrusion is highly predictive for oocyte fertilization as soon as 3 hr after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
<https://doi.org/10.1007/BF02212928>
- Vanden Meerschaut, F., Nikiforaki, D., Heindryckx, B., & De Sutter, P. (2014). Assisted oocyte activation following ICSI fertilization failure. In *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.01.008>
- Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., & Belmonte, J. C. I. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development*.
<https://doi.org/10.1242/dev.064741>
- Vestweber, D., Gossler, A., Boller, K., & Kemler, R. (1987). Expression and distribution of cell adhesion molecule uvomorulin in mouse preimplantation embryos. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(87\)90498-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(87)90498-2)
- Walls, M. L., Ryan, J. P., Keelan, J. A., & Hart, R. (2015). In vitro maturation is associated with increased early embryo arrest without impairing morphokinetic development of useable embryos progressing to blastocysts. *Human Reproduction*.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dev125>
- Wamaitha, S. E., & Niakan, K. K. (2018). Human Pre-gastrulation Development. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 128). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.004>
- Watson, A. J., Natale, D. R., & Barcroft, L. C. (2004). Molecular regulation of blastocyst formation. *Animal Reproduction Science*.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.004>
- Watson, Andrew J. (1992). The cell biology of blastocyst development. *Molecular Reproduction and Development*. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080330417>
- Wittemer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., Rongières, C., Nisand, I., & Gerlinger, P. (2000). Zygote evaluation: An efficient tool for embryo selection. *Human Reproduction*.
<https://doi.org/10.1093/humrep/15.12.2591>

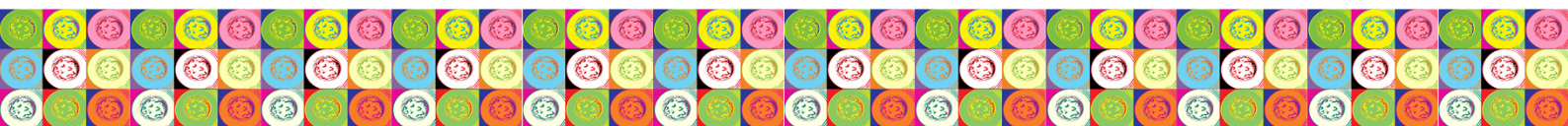
- Wong, C. C., Loewke, K. E., Bossert, N. L., Behr, B., De Jonge, C. J., Baer, T. M., & Pera, R. A. R. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1686>
- Wong, C., Chen, A. A., Behr, B., & Shen, S. (2013). Time-lapse microscopy and image analysis in basic and clinical embryo development research. In *Reproductive BioMedicine Online*. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.11.003>
- Wu, Y. G., Lazzaroni-Tealdi, E., Wang, Q., Zhang, L., Barad, D. H., Kushnir, V. A., Darmon, S. K., Albertini, D. F., & Gleicher, N. (2016). Different effectiveness of closed embryo culture system with time-lapse imaging (EmbryoScope™) in comparison to standard manual embryology in good and poor prognosis patients: A prospectively randomized pilot study. *Reproductive Biology and Endocrinology*. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0181-x>
- Yalçinkaya, E., Ergin, E. G., Çalışkan, E., Öztel, Z., Özay, A., & Özörnek, H. (2014). Reproducibility of a Time-Lapse embryo selection model based on morphokinetic data in a sequential culture media setting. *Journal of the Turkish German Gynecology Association*. <https://doi.org/10.5152/jtgga.2014.13068>
- Yamaguchi, T., Ito, M., Kuroda, K., Takeda, S., & Tanaka, A. (2017). The establishment of appropriate methods for egg-activation by human PLCZ1 RNA injection into human oocyte. *Cell Calcium*. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.03.002>
- Yamamoto, A., Kitamura, K., Hihara, D., Hirose, Y., Katsuyama, S., & Hiraoka, Y. (2008). Spindle checkpoint activation at meiosis I advances anaphase II onset via meiosis-specific APC/C regulation. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200802053>
- Yan, L. Y., Yan, J., Qiao, J., Zhao, P. L., & Liu, P. (2010). Effects of oocyte vitrification on histone modifications. *Reproduction, Fertility and Development*. <https://doi.org/10.1071/RD09312>
- Yanagida, K., Katayose, H., Yazawa, H., Kimura, Y., Sato, A., Yanagimachi, H., & Yanagimachi, R. (1999). Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.5.1307>
- Yang, L., Cai, S., Zhang, S., Kong, X., Gu, Y., Lu, C., Dai, J., Gong, F., Lu, G., & Lin, G. (2018). Single embryo transfer by Day 3 time-lapse selection versus Day 5 conventional morphological selection: A randomized, open-label, non-inferiority trial. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey047>
- Yang, Z., Zhang, J., Salem, S. A., Liu, X., Kuang, Y., Salem, R. D., & Liu, J. (2014). Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: A prospective

study with sibling oocytes. *BMC Medical Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-38>

Yurttas, P., Morency, E., & Coonrod, S. A. (2010). Use of proteomics to identify highly abundant maternal factors that drive the egg-to-embryo transition. In *Reproduction*. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0538>

Ziebe, S., Petersen, K., Lindenberg, S., Andersen, A. G., Gabrielsen, A., & Andersen, A. N. (1997). Embryo morphology or cleavage stage: How to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Human Reproduction*. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.7.1545>

AGRAÏMENTS



En primer lloc vull agrair als meus directors de tesi, al Dr. Josep Santaló i a la Dra. Rita Vassena, haver-me acompanyat i guiat en aquest llarg projecte.

Gràcies Josep per guiar-me tan bé i donar-me tants bons consells, i sobre tot per fer-ho sempre d'una manera tan propera. T'agraeixo moltíssim la gran feina que has fet revisant-me la tesi tan acuradament. Ha estat una gran sort i un plaer tenir-te com a director de tesi.

Rita, solo tengo palabras de agradecimiento para ti. Gracias por enseñarme a escribir artículos, a leerlos y a entenderlos de manera crítica. Por darme la oportunidad de descubrir este mundo que me apasiona y hacerme ser insistente y perseverante. Por revisar una y otra vez mis manuscritos con tanta paciencia. Espero que ahora recuerdes igual que yo con cariño y humor los primeros "escritos" que te mandaba. Y, sobre todo, gracias por confiar en mí.

Vull agrair, molt especialment a la Désirée Garcia, la seva ajuda, sense la qual no hauria ni començat ni acabat aquesta tesi doctoral. Gracias Désirée, por ayudarme siempre con tanta generosidad sin esperar nada a cambio. Eres una gran profesional y sobre todo una gran amiga y persona.

També a l'Aïda Pujol i a la Mercè Durban, per encoratjar-me en aquest llarg treball. Gràcies a les dues per ser els meus referents en aquest gran projecte. Per escoltar-me i animar-me a continuar malgrat les dificultats. A tu Mercè, mil gràcies per obrir-me les portes d'Eugin fa ja gairebé 12 anys, on hi he trobat una família.

A tot el personal de la clínica Eugin Barcelona, molt especialment a l'equip de laboratori. A la Maria José, l'Anna, i la Sònia especialment, amb qui tants anys, hores i batalles he compartit. Tants canvis, notícies inesperades i sorpreses. Prou bé que ho hem fet. A tots els meus companys, biòlegs i tècnics de laboratori. El millor equip, el més treballador i rialler, amb qui es poden passar les hores de feina. Mil gràcies a tots.

Al laboratori d'investigació bàsica d'Eugin. Montse, Filippo i Gustavo, gràcies per la vostra ajuda, aprenc molt sempre de vosaltres. I molt especialment gràcies a l'Anna Ferrer. Gràcies pels teus coneixements, però sobretot pel teu optimisme i sentit de l'humor que sempre em transmetes.

Gràcies també als qui m'han vist créixer en aquest projecte, i arribar fins al final. A la Marta, per ser-hi sempre, per creure en mi i encoratjar-me incondicionalment. A la Noe, a qui sempre sentiré a prop, a la Míriam i la Sonia, la meva "pichurri", per fer-me riure tant durant aquests anys i ser les millors companyes. A la llonganissa Cris, qui sempre em posa un toc d'humor al meu dia a dia. A la Marta V. per compartir tots aquests anys amb mi i no canviar mai. A les "Antònies", que tant han amenitzat aquest últim any de tesi amb el seu sentit de l'humor. A la Federica, per ajudar-me i fer-me riure tant.

A la meva gran família repartida aquí i allà, que m'ha vist créixer. A la de Galicia, on hi tinc mitges arrels. A la M^a Carmen, l'Eladio, l'Anxo i la Melania. A Santomé. A la de Barcelona, on hi tinc l'altre meitat. A la Cristina, els Jordis i l'Alba. A la meva família putativa, Griselda, Josep, Silvia i Jordi. A la Mercedes i al Salva. A la meva tieta Mercedes molt especialment, per ensenyar-me el gust per les ciències des de petita i per escoltar-me sempre. I la resta de la meva família. Als qui hi són i als qui ja no. A les meves àvies.

Gràcies Albert. A qui més he d'agrair. Gràcies per estar sempre amb mi. Per des-complicar-me les meves complicacions. Per la teva paciència durant aquests anys. No hagués pogut acabar això sense tu. Tampoc començar-ho. Ets el millor company de vida que es pot tenir.

Gràcies als meus pares la Lola i l'Eladi, per cuidar dels meus nens quan he hagut d'escriure i treballar en aquest projecte. Però també per cuidar de mi. Per estar sempre per mi incondicionalment. I per haver-me convertit en el que sóc.

I finalment gràcies als meus nens petits, a qui estimo més que res al món, l'Adrià i la Marina. Gràcies per ser els millors fills, per ser tan bons i per estimar-me tant. A vosaltres us dedico aquest treball.

