

1. Clínica de Fertilidad *Inmater*, Lima, Perú.
2. *Genomics* Perú, Lima, Perú.
 - a. Maestro en ciencias
 - b. Tecnólogo en citogenética (ascp)
 - c. Médico cirujano

Financiamiento: ninguno

Conflicto de interés: ninguno

Recibido: 7 enero 2019

Aceptado: 17 enero 2019

Publicado online: 8 mayo 2019

Correspondencia:

Eduardo Gazzo

✉ eduardo.gazzo@inmater.pe

Citar como: Gazzo E, Peña F, Valdez F, Chung A, Ascenzo M, Velit M, Escudero E. Las contracciones en blastocistos humanos se correlacionan con aneuploidía, menor tasa de implantación y mayor tiempo de llegada a blastocisto: estudio retrospectivo con *Time-Lapse*. *Rev Peru Ginecol Obstet.* 2019;65(2):171-178. DOI: <https://doi.org/10.31403/rpgo.v65i2170>

Las contracciones en blastocistos humanos se correlacionan con aneuploidía, menor implantación y mayor tiempo de llegada a blastocisto: estudio retrospectivo con incubadora *Time-Lapse*

Contractions in human blastocysts correlate with aneuploidy, less implantation and delayed arrival to blastocyst: retrospective study with *Time-Lapse* incubator

Eduardo Gazzo^{1,a}, Fernando Peña^{1,a}, Federico Valdez², Arturo Chung^{1,ab}, Mario Ascenzo^{1,c}, Marcelo Velit^{1,c}, Ernesto Escudero^{1,c}

DOI: <https://doi.org/10.31403/rpgo.v65i2170>

ABSTRACT

Objectives: To identify contraction (CT) patterns in human blastocysts using a *Time-Lapse* incubator and to correlate them with their ploidy status by PGT-A analysis, the time they took to reach blastocyst state, implantation rate and clinical pregnancy rate. **Design:** Retrospective cohort study. **Interventions:** From October 2016 through May 2018, 270 patients were evaluated, 912 embryos were cultivated in the *Time-Lapse* (*Embryoscope*[™], *Vitrolife*) incubator; 778 of them were tested for aneuploidy using an NGS platform in a reference laboratory. Vitriification was performed according to the result of embryo development and awaiting the NGS result, followed by devitriification and transfer of a single embryo. Blastocyst contractions (CT) were determined using the *EmbryoViewer* (*EmbryoViewer*[™] drawing tools) in order to obtain area, percentage of contraction and the various types of contractions, and these were compared with the NGS genetic study result. 182 transfers were performed to patients with an average age of 30.4 years, range 24 to 39 years. Finally, we obtained the correlation of implantation rate and clinical pregnancy of euploid embryos transferred in the program of assisted reproduction. **Results:** Embryos were separated into two groups according to contraction during their development: those that contracted (CT) and those that did not, named "only expanding" (OE). OE embryos were euploid in 58.3%, while 53.6% of CT embryos were aneuploid, with a statistically significant difference ($p=0.029$), meaning that OE embryos had higher chances of being euploid than CT embryos. Pregnancy rate was also higher in OE embryos (63.1% vs. 46.7% in CT embryos; $p=0.012$). CT embryos took longer to reach the blastocyst stage compared to OE embryos ($p=0.004$). Women's age had no correlation with embryo contraction. **Conclusions:** In this study, embryos who showed contractions had a higher chance of aneuploidy, a lower implantation rate, and required longer to reach the blastocyst stage. The simple fact of observing contractions in an embryo could be useful to decide to transfer another embryo without contractions. Further studies are necessary to prove these findings. **Key words:** *Time-Lapse* monitoring, Blastocyst contraction, Single embryo transfer. Transfer of single embryo.

RESUMEN

Objetivos. Estudiar los patrones de contracciones en blastocistos humanos mediante el uso de una incubadora *time-lapse* y correlacionarlos con su estado de ploidía por análisis PGT-A, el tiempo para alcanzar el estado blastocisto, la tasa de implantación y de embarazo clínico. **Diseño.** Estudio de cohortes retrospectivo. **Intervenciones.** Entre octubre 2016 y mayo 2018, se evaluó 270 pacientes; se hizo cultivo extendido de 5 a 6 días a 912 embriones en la incubadora *time-lapse* (*Embryoscope*, *Vitrolife*), y a 778 se les estudió para aneuploidía usando una plataforma NGS en un laboratorio de referencia. Hubo posterior vitriificación, según resultado del desarrollo embrionario y en espera del resultado del NGS, seguido de desvitrificación y transferencia de embrión único. Se determinó las contracciones del blastocisto (CTB) mediante la herramienta de dibujo del embrión *EmbryoViewer* (*EmbryoViewer drawing tools*), de manera de obtener el área, porcentaje de contracción y los diferentes tipos de contracciones, y se comparó los embriones con el resultado del estudio genético



mediante NGS. Se transfirió 182 embriones en pacientes de 30,4 años promedio, rango entre 24 y 39 años. Finalmente, se correlacionó la tasa de implantación y embarazo clínico de los embriones euploides que fueron transferidos, en el programa de reproducción asistida. **Resultados.** Se separó los embriones en dos grupos de acuerdo a las contracciones durante su desarrollo, en aquellos que las tuvieron (CT) y aquellos que no, denominados 'solo *expanding*' (SE). Los embriones SE fueron euploides en 58,3%, mientras los embriones CT fueron aneuploides en 53,6%, con significancia estadística ($p=0,012$). Ello indica que la mayoría de los embriones euploides hacen 'solo *expanding*' durante su desarrollo, mientras que la mayoría de los embriones aneuploides (53,9%) hacen contracciones durante su desarrollo ($p=0,029$). Del mismo modo, la tasa de embarazo clínico de los embriones SE euploides fue 63,1% frente a 46,7% de los embriones CT, $p=0,012$. Finalmente, los embriones euploides CT tardaron más en convertirse en blastocistos tempranos que los embriones SE, $p=0,004$. La edad de la mujer no representó un factor para contracción embrionaria. **Conclusiones.** Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los embriones que muestran contracciones, sin importar que tan intensas sean, están relacionados con mayor probabilidad de aneuploidías, menor tasa de implantación y ritmos de división lentos. El simple hecho de observar contracciones en un embrión podría ser útil para decidir transferir otro embrión que no las haya tenido. Se requiere más estudios para comprobar estos hallazgos.

Palabras clave. *Time-lapse*, Contracción de blastocisto, Transferencia de un solo embrión. Transferencia de un solo embrión.

INTRODUCCIÓN

El objetivo actual de los modernos laboratorios de reproducción asistida es conseguir un bebé sano en casa después de la primera transferencia intrauterina de un solo embrión; para conseguirlo, se deben emplear todas las herramientas tecnológicas disponibles. El monitoreo continuo de los embriones mediante la tecnología *time-lapse* viene revelando información bastante significativa, que estamos aprendiendo a interpretar.

La contracción de los blastocistos es un evento que ha sido reportado por primera vez por Lewis y Gregory, en el año 1929⁽¹⁾. Es un evento biológico de contracción causado por la salida de fluido del blastocele del embrión a través de canales celulares libres en el trofoectodermo. El mecanismo por el cual los embriones se colapsan y se recuperan reexpandiéndose nuevamente aún no está del todo claro. Se sabe, que cuando se expanden, el líquido se acumula gradualmente en el blastocele gracias al trabajo de la bomba de sodio ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPasa}$)^(2,3). Este proceso de expansión del blastocisto está relacionado con el afinamiento de la zona pelúcida del embrión para provocar su ruptura y poder así iniciar la eclosión.

Actualmente se registran pocas investigaciones sobre el tema. Niimura, en el año 2003, propuso medir las contracciones en embriones de ratón y fue el primero en sugerir una relación entre las contracciones fuertes y la inhibición en el proceso de eclosión embrionaria⁽⁴⁾.

Desde hace varios años, el monitoreo de embriones humanos por medio de la tecnología *time-lapse* está siendo más aceptada en los laboratorios de reproducción asistida como método para mejorar la selección embrionaria clásica⁽⁴⁻⁶⁾, resultando en varios algoritmos predictivos que han sido diseñados con la finalidad de escoger el embrión con la mejor capacidad de implantación^(5,7,8). Uno de los más citados es el propuesto por Meseguer, en 2014, en un ensayo clínico aleatorizado, prospectivo a doble ciego con ovocitos de donantes cultivados de manera aleatoria, tanto en incubadoras *time-lapse* como en incubadoras tradicionales, y sus resultados le permitieron validar por primera vez su algoritmo⁽⁵⁾.

Basile, en 2014, observó que existían ciertos parámetros morfocinéticos que se correlacionaban con aneuploidías embrionarias, proponiendo que los embriones euploides y aneuploides se comportan de manera diferente⁽⁹⁾. Sin embargo, hubo investigadores que obtuvieron resultados contradictorios a los del grupo de Basile, tal es el caso de Rienzi, en 2015, que no encontró correlación entre los parámetros morfocinéticos y el estatus cromosómico de los embriones que analizaron⁽¹⁰⁾. Aunque muchos investigadores informan que el monitoreo con *time-lapse* ha demostrado su eficiencia al mejorar las tasas de embarazo e implantación, el monitoreo mediante tecnología *time-lapse* no debe reemplazar al tamizaje genético preimplantacional (PGS)⁽¹⁰⁾.

Estudios recientes han encontrado relación entre las contracciones del blastocisto y una reducida tasa de implantación^(1,11,12). De la misma manera, hay quienes han hallado y clasificado los tipos de contracciones que se observan en los blastocistos a lo largo del desarrollo embrionario, asociándolas con un ritmo de división lento^(11,13).

Recientemente, Marcos en 2015 recomienda que los embriones que presentan contracciones fuertes no deberían ser transferidos (si es que hubiese otra alternativa de transferencia) y aconseja incluir este evento como un criterio adicional a los modelos actuales de selección embrionaria⁽¹¹⁾.



En el presente estudio, proponemos evaluar y diferenciar las contracciones de los blastocistos estudiados en una cohorte de pacientes infértiles; posteriormente las relacionaremos con el resultado del estudio genético (PGS) y evaluaremos la relación con la tasa de implantación, embarazo clínico y el tiempo de desarrollo de dichos embriones.

MÉTODOS

PACIENTES

Se consideró los embriones de las pacientes que se sometieron a procedimiento de reproducción asistida en la Clínica Inmater, desde octubre de 2016 hasta mayo de 2018. El promedio de edad de las pacientes fue de 30,23 años y el rango de edades osciló entre 18 a 43 años. Se consideró en el estudio tanto las pacientes que aportaron óvulos propios como las donantes de óvulos; el único criterio de exclusión fueron aquellas muestras de semen con examen de FISH alterado, como la fragmentación espermática.

ESTIMULACIÓN OVÁRICA

Para la estimulación ovárica se utilizó una dosis de 150 a 300 UI/día de FSH y/o HMG, durante los primeros 2 a 5 días del ciclo, de acuerdo con la edad, índice de masa corporal y respuesta a las estimulaciones previas. Cada dosis fue ajustada según la evaluación por ultrasonido, realizada a intervalos de 2 a 3 días. Por otro lado, recibieron antagonistas de la GnRH y la estimulación continuó hasta que los folículos principales alcanzaron 18 mm de diámetro medio. Para desencadenar la ovulación, se administró gonadotropina coriónica humana - hCG o un agonista de la GnRH; luego de 36 horas, se realizó la punción ovárica.

ASPIRACIÓN DE OVOCITOS Y FERTILIZACIÓN

Todos los procedimientos de aspiración folicular fueron realizados después de 36 horas de aplicada la inyección de hCG (gonadotropina coriónica humana). El procedimiento se realizó vía ecografía transvaginal y bajo anestesia local; se utilizó aguja 17 (*Ops Classic avec Robinet, Laboratoire CCD*).

Los folículos aspirados y recuperados fueron lavados en medio HEPES (*LifeGlobal, Canadá*)

y cultivados utilizando el medio de fertilización *Global Fertilization (LifeGlobal, Canadá)* a 5,6 % de concentración de CO₂, concentración de O₂ 5,0 % y temperatura 37°C. Fueron incubados en incubadoras trigas (*K Systems invi cell G210*), por un periodo de tres horas, previa decumulación de los ovocitos. La remoción de las células de la granulosa fue de manera mecánica con pipeta de vidrio. Se utilizó hialuronidasa para la decumulación y HTF HEPES para enjuagar los ovocitos (*Life Global, Canadá*). Los ovocitos en estadio de metafase II fueron guardados en las incubadoras trigas por un periodo de 40 minutos antes de realizar la inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI).

Todos los ovocitos fueron evaluados para fecundación en la mañana del día siguiente. Los ovocitos fecundados fueron transferidos a la placa de cultivo para *embryoscope (EmbryoSlide, Vitrolife, Dinamarca)* pre equilibrada durante toda la noche previa, a 5,6% CO₂, 5,0% O₂ y 37°C. El *EmbryoSlide* contiene 12 pocillos; en cada uno de ellos se sembró 20 uL de medio GTL (*Vitrolife, Canadá*) y la cápsula fue cubierta con 1,4 mL de aceite mineral OVOIL (*Vitrolife, Canadá*), para prevenir la evaporación.

Los cigotos fueron puestos en el *EmbryoScope (Vitrolife)* inmediatamente después de evaluada la fecundación (en estadio de dos pronúcleos) e incubados durante 5 o 6 días de manera ininterrumpida, dado que el medio de cultivo GTL utilizado no necesita ser reemplazado en día 3.

CULTIVO EMBRIONARIO Y POSTERIOR VITRIFICACIÓN

El *Embryoscope* fue programado para mantener condiciones estables de temperatura (37°C), concentración de CO₂ (5,6%) y concentración de O₂ (5,0%).

Todos los embriones que llegaron a estado de blastocisto fueron elegidos para posterior vitrificación (*Criotech Co, Ltd*) y para realizar la biopsia embrionaria para el estudio del trofoectodermo mediante la técnica de NGS.

ANOTACIONES EN TIME-LAPSE

La adquisición de imágenes estuvo programada cada 10 minutos, con una resolución de 1 000 x 1 000 píxeles. Las fotografías para cada embrión fueron registradas en 7 planos focales, con dis-



tancias entre ellas de 15 μm , lo que garantizaba una adecuada evaluación de la morfología embrionaria en el momento de la revisión del vídeo.

La revisión de los vídeos fue realizada inmediatamente después de que los embriones fueron retirados del equipo *embryoscope*, por dos expertos en su manejo (EG y FP), y cuando hubo discrepancia entre ellos se llegó a un acuerdo de manera consensuada. Se tomaron apuntes de las horas de inicio de blastulación y la hora de biopsia de todos los embriones. La hora de inicio de la blastulación se define como aquel preciso momento en el cual la zona pelúcida del embrión comienza a presentar adelgazamiento y el blastocelo empieza a evidenciar signos de formación de cavidad. Los embriones que presentaron algún tipo de contracción fueron analizados de manera particular. Se valoró de la misma forma la masa y el trofoectodermo y finalmente la anotación del blastocisto eclosionado (HB).

DEFINICIÓN DE LA MEDICIÓN DE LAS CONTRACCIONES

Para medir las contracciones de los blastocistos utilizamos el *embryoviewer drawing tools*, basándonos en el método descrito por Marcos y col. (2015), pero añadimos algunas modificaciones.

En primer lugar, la definición conocida de una contracción es cuando ocurre una separación entre el trofoectodermo del embrión y la zona pelúcida del mismo. Sin embargo, de esta manera no es posible saber qué tan intensa llegó a ser esa contracción, pues no tenemos un consenso establecido de cuándo se considera una contracción débil, moderada, fuerte o muy fuerte. Para poder clasificar las contracciones, nuestro equipo plantea el siguiente método para mejorar lo planteado por Marcos, en el 2015.

Primero analizamos cada vídeo cuidadosamente y se puso especial atención desde la primera expansión del blastocisto temprano. Cuando ocurría una contracción, se detenía el vídeo y se utilizaba la herramienta del *embryoviewer* llamada *draw ellipse*, para medir el área del blastocisto contraído. Luego se medía el área inmediatamente previa a dicha contracción, y se restaban ambas mediciones. Este valor se dividía entre el área mayor y se obtenía el porcentaje de contracción de dicho blastocisto. Este ejercicio solamente se hacía una vez en la contracción más

importante, en el caso que algún blastocisto hubiese tenido más de una contracción. De esta manera logramos obtener un valor de la intensidad de la contracción para cada embrión que presentó contracciones.

Para el resto de los embriones en los cuales no se evidencia una separación del trofoectodermo y la zona pelúcida, y solamente crecen y expanden hasta alcanzar la eclosión, fueron denominados 'solo *expanding*', y este nombre hace referencia a un desarrollo y crecimiento del embrión de manera constante y sin evidenciar síntomas de contracciones ni pulsos. Figuras 1 y 2.

BIOPSIA DE LOS BLASTOCISTOS

Los blastocistos fueron biopsiados inmediatamente después de que fueron retirados del *embryoscope*. Para la realización de la biopsia se usó el microscopio invertido OLYMPUS IX73 y el láser LIKOS (Hamilton Thorne) y los microinyectores

FIGURA 1. BLASTOCISTO INSTANTE ANTES DE HACER UNA CONTRACCIÓN; EN ESTA IMAGEN SE MIDE, EN PRIMERA INSTANCIA, EL ÚLTIMO MOMENTO ANTES DE QUE SE CONTRAIGA; HORA DEL EVENTO: H. 133.1. MEDIDA DE LA CIRCUNFERENCIA ROJA = 13737.

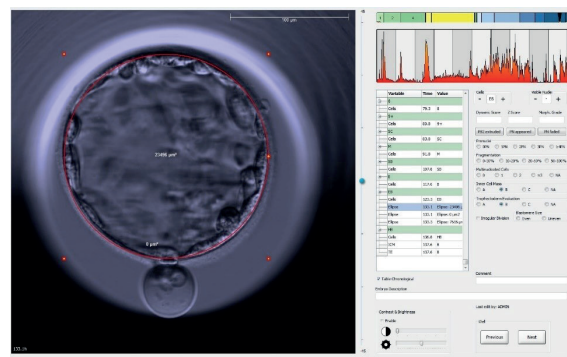
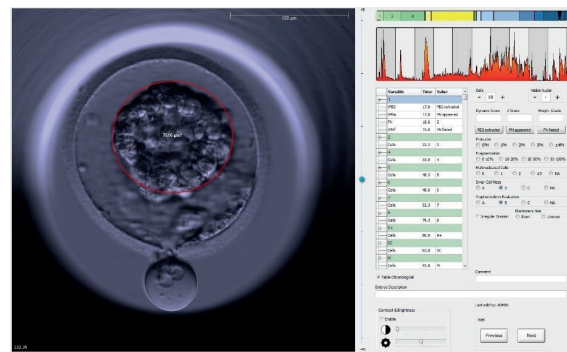


FIGURA 2. EN EL INSTANTE SIGUIENTE A LA CONTRACCIÓN, SE OBSERVA AL MISMO BLASTOCISTO EN SU PUNTO MÁXIMO DE CONTRACCIÓN; MOMENTO EN QUE SE HACE LA MEDICIÓN DEL EMBRIÓN CONTRAÍDO HORA DEL EVENTO: H. 133.1. MEDIDA DE LA CIRCUNFERENCIA ROJA = 4754. ESTE BLASTOCISTO TUVO UNA CONTRACCIÓN DEL 65,4% DE SU TAMAÑO.





TransferMan 4r (Eppendorf); las agujas con las que se realizaron las biopsias de los embriones fueron de la marca ORIGIO, se usó el modelo HOLDING MPH-MED-30, y para la biopsia fue la BIOPSY MBB-FP-M-30.

Se graduó el láser LIKOS en el modo *validation*, con un power de 100% y pulsos de 430 microsegundos. Los embriólogos que realizaron las biopsias contaban con mucha experiencia biopsiando embriones y todas las biopsias se realizaron usando un máximo de 4 disparos con el láser. Posteriormente a la biopsia, se procedió a realizar el *tubing* según el protocolo descrito y recomendado por Genomics Perú.

ESTUDIO GENÉTICO DE LOS BLASTOCISTOS POR NGS

Un total de 912 embriones fueron estudiados en el *Embryoscope*®, de los cuales 778 fueron biopsiados para el estudio genético. Posteriormente a la biopsia, los embriones fueron vitrificados y se mantuvieron a la espera del resultado.

El PGS fue realizado en el laboratorio de genética asociado Genomics Perú, utilizando un equipo Miseq® (Illumina® Inc). La amplificación del genoma completo se realizó por el método Sureplex siguiendo las indicaciones del fabricante, y la preparación de las librerías se hizo usando kits de Illumina® Veriseq. El análisis de datos de citogenética molecular se efectuó por medio del software BlueFuse illumina®.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis de proporciones no paramétricas, se utilizó la prueba chi-cuadrado, y para la comparación de cantidades con distribución normal, se usó la prueba de análisis de varianza (ANOVA). Se consideró estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$. Para el análisis e interpretación de datos se usó el *Statistical Package for the Social Sciences 24.0* (SPSS Inc.).

RESULTADOS

Un total de 182 blastocistos únicos fueron transferidos (promedio de edad de las pacientes con transferencia fue 30,23 años y el rango de edades osciló entre 18 a 43 años). Todos los blastocistos transferidos fueron categorizados según el tipo de desarrollo embrionario que presentaron en cuanto a su movimiento de contracción,

puediendo ser este únicamente de dos categorías: A) contracción y/o B) solo *expanding*. A los embriones que pertenecían al grupo que presentaban contracciones (grupo A), se les midió la intensidad de la contracción para registrarla.

De los 912 embriones estudiados, 257 embriones presentaron contracciones (28,2%). Este valor resulta estar en el medio de lo que reporta Bodri en un trabajo publicado en el 2016, en donde publica un porcentaje de contracción embrionaria de 46%⁽¹²⁾. Por su parte, Marcos, en el 2015, publica un porcentaje global de contracción embrionaria de 19,4%⁽¹¹⁾. Cuando evaluamos la incidencia de euploidia dentro de los embriones con contracciones, encontramos que de los 257 embriones con contracciones se estudiaron 196 embriones para tamizaje genético y se encontraron 91 embriones euploides (46,4%). De la misma manera, la incidencia de euploidia para los embriones 'solo *expanding*', cuando se analizaron 534 embriones hubo 311 embriones euploides (58,3%). Figura 3.

Otro resultado que obtuvimos y el cual es de particular importancia es la tasa de embarazo clínico en los embriones euploides transferidos según el tipo de movimiento que presentaron, ya sea contracción o solo *expanding*. Transferimos 84 embriones del tipo 'solo *expanding*', de los cuales se registraron 56 casos con β -hCG positiva y se tradujo en 53 embarazos en curso, dando una tasa de embarazo clínico de 63,1%. Para el caso de los embriones con contracciones, transferimos 30 embriones euploides y registramos 14 embarazos en curso; la tasa de embarazo clínico fue 46,7%; el análisis estadístico que se usó fue el chi-cuadrado y la p resultó con significancia estadística válida ($p=0,012$). Figura 4.

Finalmente, el ultimo parámetro que evaluamos y que encontramos con diferencia estadística fue el tiempo que le toma a los blastocistos eu-

FIGURA 3. TASA DE EUPLOIDÍA EN EMBRIONES SEGÚN SU 'CONTRACCIÓN' O 'SOLO EXPANDING'.

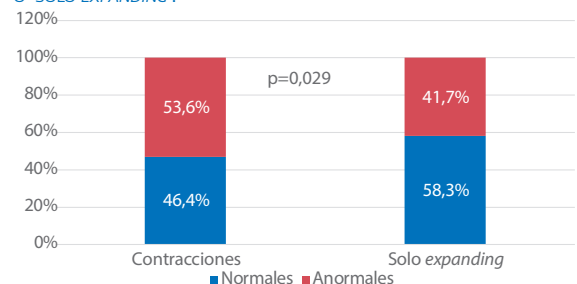
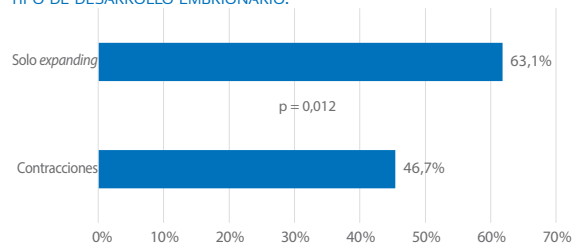




FIGURA 4. EMBARAZO CLÍNICO EN EMBRIONES EUPLOIDES, SEGÚN EL TIPO DE DESARROLLO EMBRIONARIO.



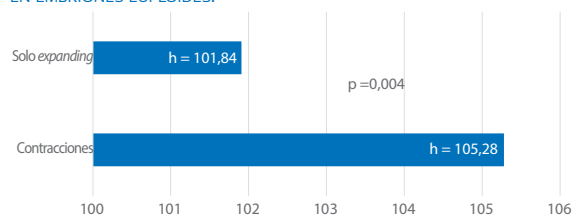
ploides en llegar a alcanzar los estadios iniciales de blastulación. Nosotros medimos el tiempo a todos los embriones, desde la fecundación hasta la formación inicial del blastocisto o el adelgazamiento de la zona pelúcida, y encontramos que 81 embriones euploides con contracciones demoraron 105,28 horas en promedio en alcanzar el primer adelgazamiento de la zona pelúcida, mientras que 296 embriones euploides del tipo 'solo expanding' demoraron apenas 101,84 horas en alcanzar el mismo estadio. Según el análisis estadístico con el test de Anova para análisis de varianza, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0,004$). Figura 5.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue estudiar el movimiento de contracción de los blastocistos humanos cultivados *in vitro* en incubadora *time-lapse* y tratar de encontrar un marcador predictivo eficiente para la implantación embrionaria. Para esto, establecimos una nueva nomenclatura para los embriones que no hacen contracciones y proponemos una nueva manera para medir la intensidad de las contracciones.

Lewis y colaboradores, en el año 2003, hicieron un estudio en ratones y establecieron que los blastocistos sufren contracciones débiles de manera seguida, mayormente en el estadio cercano al *hatching*, y aquellos blastocistos que sufren contracciones fuertes o *collapses* son más propensos a tener fallas en el momento de la eclosión. Sus resultados sugieren que las

FIGURA 5. TIEMPO DE LLEGADA A BLASTOCISTO TEMPRANO (EN HORAS) EN EMBRIONES EUPLOIDES.



contracciones débiles (menos de 20% de reducción en el volumen del blastocisto) tienen rol importante en el *hatching*. Por otro lado, las contracciones fuertes (20% o más del volumen de reducción) tienen un efecto inhibitorio del *hatching*. Nosotros, a diferencia de Lewis, no encontramos diferencias que alcanzaran significancia estadística cuando analizamos los embriones con contracciones menores al 20%, al 30% ni menores al 40%, cuando los comparamos con su capacidad para llegar a hacer la eclosión. Es importante mencionar que a la mayoría de los embriones se les hizo *hatching* asistido en día 4 (795 de 912). Sin embargo, cuando comparamos los embriones a los que no se les hizo *hatching* asistido en día 4 (117 de 912), el porcentaje de embriones que presentaron contracciones fue similar (39,6% versus 38,5%), lo que sugiere que el evento de contracción embrionaria es independiente a si el embrión tiene o no una apertura en su zona pelúcida para facilitar la eclosión.

Marcos y colaboradores, en el año 2015 estudiaron el colapso en los blastocistos y los relacionaron a baja tasa de implantación; en su trabajo definen como 'colapso' cuando observan una separación de más de 50% del trofoectodermo con respecto a la zona pelúcida, y llaman 'contracción' cuando esta separación es menor al 50%. Para esto utilizan como herramienta de medición una línea que divide en dos al blastocisto y lo usan como referencia para estimar los cálculos de las contracciones embrionarias; miden el tiempo exacto de cada colapso y su duración hasta la reexpansión.

Bodri y colaboradores, en el año 2016, hacen un estudio similar al de Marcos y encuentran semejanzas y diferencias importantes entre estos estudios. Entre las diferencias está la tasa de embriones que hacen contracciones (Marcos 19,4% / Bodri 46%) y que el grupo de Bodri informa una disminución de la calidad en los blastocistos con contracciones, mientras que el grupo de Marcos la halla estable. Pero ambos estudios coinciden en indicar una disminución en la tasa de implantación en los grupos de blastocistos con contracciones. Claramente existieron diferencias en los grupos de pacientes en ambos estudios, en las condiciones de cultivo, las marcas de los medios y concentraciones de gases. Sin embargo, ambos grupos usaron la misma metodología (la publicada por Marcos) para medir las contracciones en los embriones estudiados⁽¹²⁾.



Nosotros planteamos algo un poco distinto. Primero, consideramos únicamente dos tipos de movimientos, como ya lo hemos explicado anteriormente: A) contracción, cuando el trofoectodermo se separa de la zona pelúcida, y B) solo *expanding*, cuando el trofoectodermo nunca se separa de la zona pelúcida y únicamente crece hasta la eclosión. Las contracciones de los embriones las medimos de manera precisa utilizando la misma herramienta que viene en el software del equipo *embryoscope*, llamada *embryoviewer drawing tools*, la cual permite obtener el porcentaje exacto de contracción del trofoectodermo, como también se ha mencionado anteriormente. En todos los blastocistos que presentaron contracciones, se pudo observar una gran variabilidad en el porcentaje de contracciones, siendo la mínima observada de 8,6% y la máxima 89,9%. Esto nos permitió poder clasificar a los embriones según su porcentaje de contracción y estudiar de una manera más aguda a partir de qué porcentaje de contracciones es que se observan los efectos de las contracciones.

De nuestros datos obtuvimos que 257 de un total de 912 embriones tuvieron contracciones, (28,2%), a diferencia de lo publicado por Marcos y colaboradores que encontraron 19,4% y de lo publicado por Bodri y colaboradores con 46%. Y con respecto a la disminución en la calidad de los blastocistos que presentaron contracciones, nuestro grupo no encontró diferencias significativas, concordando con lo hallado por el grupo español.

Luego de haber realizado el estudio genético por NGS a un grupo de embriones (773 embriones), tuvimos 257 con contracciones y observamos que, sin importar qué tan intensa haya sido su contracción, estos embriones tiene una probabilidad más baja de ser euploides (46,4% versus 58,3%) de los embriones solo *expanding*, los cuales tienen una probabilidad más alta de ser euploides. Este análisis alcanzó una clara significancia estadística ($p=0,029$); esto es una diferencia porcentual de 12 puntos que, según análisis chi-cuadrado, es estadísticamente significativo.

Por otro lado, cuando estudiamos el embarazo clínico de los embriones euploides transferidos, vimos que los embriones euploides con contracciones tienen una menor tasa de embarazo clínico (46,7%), que los euploides 'solo *expanding*' (63,1%). De la misma manera, esto resulta con significancia estadística importante. Estos re-

sultados guardan relación con lo publicado por el grupo de Marcos y Meseguer, en el año 2015, de una menor tasa de implantación en embriones con contracciones versus los que no las presentan. También concuerdan con lo encontrado por Bodri y colaboradores en el 2016, en donde hallan que la tasa de bebe nacido vivo va decreciendo progresivamente en tres de los grupos de blastocistos transferidos que estudiaron (sin colapso, con un colapso, con más de un colapso).

Otro parámetro de estudio en donde encontramos significancia estadística, fue en el tiempo de inicio de la blastulación; los embriones que no hacían contracciones tuvieron un tiempo de llegada a blastocisto significativamente menor (101,84 horas desde la fecundación) que aquellos que si presentaron contracciones (105,28 horas desde la fecundación); los tiempos en que los embriones con contracciones permanecían en el *time-lapse* eran más largos, pues los ciclos de colapso y de reexpansión tomaban más tiempo para alcanzar los estadios finales de blastulación. Hay que hacer hincapié en que las contracciones pueden ocurrir desde el estadio de mórula compactada hasta el último estadio embrionario, llámese blastocisto *hatched* o tardío; de ninguna manera ocurren contracciones en los tiempos de clivaje embrionario o inmediatamente anteriores a la formación de la mórula compactada. Los tiempos que medimos para determinar que los embriones que hacen contracciones son más lentos que los embriones que hacen solo *expanding*, son justamente hasta la formación inicial del blastocisto o cuando la zona pelúcida empieza a adelgazarse. De esto podemos inferir que el proceso de contracción embrionaria es algo que parece estar programado en la genética del embrión, pues primero ocurre el retraso en los tiempos de clivaje y después ocurre la contracción.

Nuestros resultados no guardan relación con lo publicado por Marcos y colaboradores en el 2015, cuando encuentran una tendencia (sin significancia estadística) de variables morfo-cinéticas en los tiempos de clivaje, tiempos de llegada a mórula, de formación de blastocisto y de eclosión de blastocisto más rápidos en embriones con contracciones. Ya se ha demostrado por diferentes autores^(6,14) que estas variables morfo-cinéticas son fuertes predictores de la implantación y han sido incluidas en varios modelos predictivos.



Nosotros apoyamos la recomendación de Marcos y colaboradores que sugieren escoger para la transferencia a los embriones que no presenten contracciones, para mejorar la posibilidad de implantación. Definitivamente faltan más estudios sobre el mecanismo de contracción y sobre las causas negativas que este proceso deja en los embriones, pero es factible especular que las contracciones comprometen de alguna manera la capacidad implantatoria de los embriones, y es muy probable que las contracciones generen un desgaste energético en el embrión dejándolo sin reservas energéticas para el momento de la comunicación con el endometrio y posterior implantación.

Las contracciones en los blastocistos, motivo de esta investigación, podrían convertirse en una importante variable predictiva que debería ser tomada en cuenta como un factor de selección adicional a los ya existentes.

Nuestro trabajo tiene limitaciones y creemos que la principal es el bajo número de transferencias únicas de blastocisto realizadas (182), en comparación con los trabajos similares encontrados en la literatura. Sin embargo, fue suficiente para encontrar significancia estadística en varios puntos de estudio. Para estudiar las contracciones embrionarias, nuestro número de embriones estudiados fue suficiente e incluso superior a algunos trabajos citados (912) y los embriones analizados genéticamente fueron 773. Creemos que este tamaño muestral fue suficiente y robusto, pero definitivamente se deben hacer más investigaciones al respecto, para confirmar los hallazgos.

Finalmente, cabe resaltar que nosotros y varios autores hemos demostrado que existe una relación entre los blastocistos que presentan contracciones con disminuciones en las tasas de implantación. Es por esto que recomendamos aprovechar la tecnología *time-lapse* para utilizarla como un criterio adicional para seleccionar embriones para la transferencia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewis WH, Gregory PW, Niimura S. Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev.* 2003;49(6):413-23. DOI.10.1126/science.69.1782.226
2. Baltz JM, Smith SS, Biggers JD, Lechene C. Intracellular ion concentrations and their maintenance by Na⁺/K⁽⁺⁾-ATPase in preimplantation mouse embryos. *Zygote.* 1997; 5 (1):1-9. DOI.nih.gov/pubmed/9223240
3. Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC. Molecular regulation of blastocyst formation. *Anim Reprod Sci.* 2004;82-83:583-92. DOI.10.1016/j.anireprosci.2004.04.004
4. Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A. Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertil Steril.* 2012;98(6):1481-9. e10. DOI.10.1016/j.fertnstert.2012.08.016
5. Rubio I, Galán A, Larreategui Z, Ayerdi F, Bellver J, Herrero J, et al. Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: A randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertil Steril.* 2014;102(5):1287-94. DOI.10.1016/j.fertnstert.2014.07.738
6. Vermilyea MD, Tan L, Anthony JT, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, et al. Computer-automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: A blinded, multi-centre study. *Reprod Biomed Online.* 2014;29(6):729-36. DOI.10.1016/j.rbmo.2014.09.005
7. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remoh J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26(10):2658-71. DOI.org/10.1093/humrep/der256
8. Storr A, Venetis C, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Time-lapse algorithms and morphological selection of day-5 embryos for transfer: a preclinical validation study. *Fertil Steril.* 2018;109(2):276-83.e3. DOI.10.1016/j.fertnstert.2017.10.036
9. Basile N, Nogales MDC, Bronet F, Florensa M, Riqueiros M, Rodrigo L, et al. Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertil Steril.* 2014;101(3):699-704.e1. DOI.10.1016/j.fertnstert.2013.12.005
10. Rienzi L, Capalbo A, Stoppa M, Romano S, Maggiulli R, Albricci L, et al. No evidence of association between blastocyst aneuploidy and morphokinetic assessment in a selected population of poor-prognosis patients: A longitudinal cohort study. *Reprod Biomed Online.* 2015;30(1):57-66. DOI.10.1016/j.rbmo.2014.09.012
11. Marcos J, Pérez-Albalá S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: A time-lapse study. *Hum Reprod.* 2015;30(11):2501-8. DOI.10.1093/humrep/dev216
12. Bodri D, Sugimoto T, Yao Serna J, Kawachiya S, Kato R, Matsumoto T. Blastocyst collapse is not an independent predictor of reduced live birth: a time-lapse study. *Fertil Steril.* 2016; 105 (6):1476-1483.e3. DOI.10.1016/j.fertnstert.2016.02.014
13. Huang TTF, Chinn K, Kosasa T, Ahn HJ, Kessel B. Morphokinetics of human blastocyst expansion in vitro. *Reprod Biomed Online.* 2016;33(6):659-67. DOI.10.1016/j.rbmo.2016.08.020
14. Basile N, Vime P, Florensa M, Aparicio Ruiz B, García Velasco JA, Remohí J, et al. The use of morphokinetics as a predictor of implantation: A multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection. *Hum Reprod.* 2015;30(2):276-83. DOI.10.1016/j.fertnstert.2013.12.005