

Gabriela SIMIONESCU  
Radu MAFTEI  
Emil ANTON  
Sabina VALEANU  
Bogdan DOROFTEI

Origyn Fertility Center, Iasi, Romania  
"Cuza Voda" Clinic Hospital of Obstetrics and Gynaecology, Iasi, Romania  
Department of Obstetrics and Gynecology, Univeristy of Medicine and Pharmacy GR.T.  
POPA, Iasi, Romania  
Research and Development Station for Cattle Breeding Dancu, Iasi, Romania

TIME-LAPSE MICROSCOPY  
ROLE IN IMPROVING THE  
OUTCOME OF IVF/ICSI  
CYCLES BY MONITORING AND  
SELECTION OF EARLY  
EMBRYO

Empirical  
Studies

---

**Keywords**

Infertility,  
IVF,  
ICSI,  
Pregnancy,  
Time-lapse monitoring

---

**Abstract**

*In vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) are well-established assisted reproductive biotechnologies used to overcome infertility in couples. Time-lapse monitoring is an imagistic technology which was elaborated to fulfill the need for observing the dynamics of the mammalian embryonic development in a continuous, non-invasive manner, without removing the embryos from the optimal culturing conditions. This technology offers unique information regarding the cleavage process, as well as morphological and structural modifications thus enabling the embryologists to select the embryos with elevated implantation potential.*

***Aim of the study:*** to identify, evaluate and summarize the available data regarding the role of time-lapse microscopy in improving the outcome of IVF and ICSI by monitoring and selection of early embryos

***Material and methods:*** we systematically reviewed the available evidence regarding the assessment of embryo quality through both conventional monitoring and time-lapse microscopy for couples undergoing in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The meta analysis included randomized trials and published data encountered on ISI Web of Knowledge Science, MedLine and Pubmed using the following keywords: time-lapse microscopy, IVF, ICSI, embryo, outcome, pregnancy. As criteria of differentiation, only studies that reported information regarding the implantation rate, aspects regarding clinical pregnancy or live birth were considered for analysis.

***Results:*** the info from the studies was extracted and included in the meta-analysis. A part of the retrospective studies conducted after 2010 have highlighted a correlation between time-lapse parameters and embryo viability as defined by the developmental competence and subsequently by the confirmation of clinical pregnancy. Other authors undertook a critical appraisal on potential benefit time-lapse monitoring may bring to ART.

***Conclusion:*** Even if time-lapse monitoring is likely to revolutionize the field of embryology by enabling an objective, automatize monitoring and selection of embryos, further randomized studies reporting clinical outcomes after IVF and ICSI are needed before adopting this technology for routine use in the laboratory.

## INTRODUCERE

Procedurile de reproducere umana asistata (RUAM) reprezinta parte din terapia cuplului infertil, cu accesibilitate si rezultate spectaculoase in ultimele 3 decenii. Nasterea primului copil conceput prin fertilizare in vitro a fost raportata in anul 1978. In 2005, cifrele mondiale estimau mai mult de 250.000 copii conceputi prin FIV, iar in prezent numarul depaseste 5 milioane (Kovacs, 2004). Daca in literatura de specialitate gasim date care compara rezultatele obstetricale si perinatale ale sarcinilor obtinute spontan versus prin tehnicile RUAM, acestea sunt mult mai putin documentate in cazul compararii acelorasi parametri la pacientele care au obtinut sarcini prin procedee diferite, in cadrul RUAM, fertilizare in vitro (FIV) versus injectare intracitoplasmatica a spermatozoidului (ICSI)/ injectare intracitoplasmatica a spermatozoidului selectat pe criterii morfologice (IMSI).

Procedura ICSI este folosita de rutina in cazurile de infertilitate masculina, oligozoospermie si mai ales oligoteratozoospermie severa, dar si in caz de: infertilitate de cauza inexplicabila, calitate slaba a ovocitelor ( "poor-responder", menopauza precoce, endometrioza ), varsta avansata a pacientei, esec de fertilizare la procedura de inseminare conventionala, testare genetica preimplantationala ( PGD ), fertilizare dupa maturare ovocitara in vitro ( IVM), fertilizarea ovocitelor crioprezervate (Kirkegaard si colab., 2015).

Introducerea sistemului "time lapse" pentru selectia embrionilor face tema cercetarii actuale si a studiilor din ultimii ani, considerand ca timpul de diviziune difera la embrionii cu potential mare de dezvoltare si implantare de cei cu potential limitat (Kazem si colab., 2013). Avantajul selectiei unui singur embrion, urmat de transferul acestuia in ziua 5 descurajeaza trasferul embrionilor supranumerari si, implicit, sarcina multipla. Se considera ca, prin studiul morfocinetic in sistem "time lapse", pot fi apreciate: predictibilitatea implantarii, a aneuploidiilor si abilitatea dezvoltarii - formarea blastocistului (Kazem si colab, 2013).

Dispozitivul este un incubator care mentine conditiile fiziologice necesare cerute de un embrion viu, pe parcursul dezvoltarii sale in laborator. Acesta are un sistem timp incorporat si o camera, care surprinde in mod continuu imaginii si le inregistreaza ca un film al dezvoltarii embrionare.

La pacientele care au beneficiat de FIV, rata de complicatii obstetricale, precum ruptura prematura de membrane, declansarea prematura a travaliului sau incontinenta cervico-istmica sunt mai frecvent descrise in literatura, necesitand spitalizare mai frecvent in trimestrul al doilea si al treilea, decat pentru tehnica ICSI.

Varsta gestationala medie este semnificativ redusa la sarcinile concepute prin ICSI, iar in ceea ce priveste greutatea mica la nastere, procentul dominant este tot la categoria ICSI. Scorul Apgar la 1 si 10 minute sunt mai mici pentru sarcinile obtinute prin ICSI si tot copiii nascuti in urma acestei proceduri au necesitat admisie mai frecvent in unitatile de terapie intensiva neonatala. O explicatie plauzibila pentru acest fenomen este ca manipularea timpurie a ovocitului pentru ICSI ar putea avea un impact negativ pe termen lung. Malformatiile congenitale fetale majore nu inregistreaza diferente intre cele doua grupuri (Levi si colab., 2016).

Cele mai frecvente anomalii congenitale majore implica sistemul cardiovascular, genitourinar si gastrointestinal. Datele sugereaza ca diagnosticul de infertilitate in sine este numitor comun pentru cresterea ratelor de anomalii observate in RUAM si conceptia spontana (Morken si colab., 2010). Statistica europeana realizata pe categoriile de varsta gestationala : extrem de prematur ( < 28 saptamani ), foarte prematur ( 28-31 saptamani ) si moderat prematur ( 32-36 saptamani ), prezentate pentru nasterile spontane ( 81,1% ) si iatrogene ( 77% ) si in conformitate cu metoda de fertilizare ( FIV sau ICSI ), reda procent majoritar pentru categoria moderat prematur (British Fertility Society RCOG, 2012). In ceea ce priveste mortalitatea in primul an de viata, datele din literatura recunosc un procent de 1,3% la copiii obtinuti prin FIV conventional si 0,9% la cei prin ICSI (Bengt si colab., 2005). Problemele de adaptare respiratorie a nou-nascutilor, apreciate in functie de necesitatea ventilarii asistate si CPAP, au fost mai frecvent citate in cazul FIV, comparativ cu ICSI, iar in ceea ce priveste convulsiile neonatale, nu s-au inregistrat diferente semnificative intre cele doua categorii (Bengt si colab., 2005). Unul dintre cele mai importante aspecte legate de conceptia prin FIV este dezvoltarea neuromotorie, cognitiva si comportamentala a copiilor, care pare sa fie similara cu cea a celor conceputi natural (Watanabe si colab., 2014).

Screeningul antenatal combinat de prim trimestru (ecografic si biochimic) este recomandat tuturor sarcinilor obtinute prin proceduri de reproducere asistata, mentionand ca nivelul proteinei plasmatice asociata sarcinii ( PAPP-A ) est redus la ciclurile cu transfer fresh (Watanabe si colab., 2014). Relatia cauzala preeclampsie- sarcina obtinuta prin FIV este inca dezbatuta, mecanismul ramanand incomplet clarificat. Cea mai plauzibila explicatie ar fi aceea a placentatiei anormale, transferul embrionului in cavitatea uterina si mediul hormonal modificat, care au ca rezultat dezvoltarea aberanta a interfetei maternofetale (Ewka si colab, 2014).

Studiile la nivel molecular sustin ipoteza conform căreia în țesutul placentar al pacientelor FIV / ICSI apar aberații epigenetice comparativ cu țesutul placentar din sarcinile obținute spontan. Analiza microarray pentru investigarea genomului este folosit pentru identificarea cailor alterate în placentă din FIV / ICSI. În ceea ce privește importanța genelor implicate, o atenție deosebită a fost acordată mai multor gene legate de creștere [H19, IGF2, pleckstrin omolog-like family A domain 2 (PHLDA2), inhibitorul 1C al kinazei ciclino-dependente (CDKN1C), MEST izoform  $\alpha$  și  $\beta$ ], prin analiza expresiei folosind PCR în timp real (qPCR) (Kanninen și colab., 2015).

Defectele placentare ar conduce, probabil, la creșterea stresului oxidativ și inflamație, cauze implicate în mecanismul declanșării nasterii premature (Imudia și colab., 2012). Practicienii domeniului RUAM recunosc asocierea unei valori a estradiolului circulant  $> 3450$  pg / ml, în ziua administrării de hCG pentru maturarea ovocitara cu dezvoltarea mai frecvent a preeclampsiei și greutatea mică la naștere (Esh-Broder și colab., 2011). Anomalii de localizare sau aderența placentară, de tipul placentei praevia sau accreta au raportări în literatura de specialitate, posibilă patogeneza incluzând un factor mecanic (deficit primar de decidualizare, cauzat de traumatisme locale ale peretelui uterin) și un factor biologic (răspunsul matern anormal la invazia trofoblastică). Riscul de a dezvolta diabet gestațional este de două ori mai mare la pacientele care au conceput printr-o procedură de reproducere umană asistată cu transferul unui singur embrion, comparativ cu sarcinile obținute spontan. În plus, asocierea cu folosirea progesteronului la sarcinile obținute prin tehnici de reproducere asistată pare a fi implicat în apariția dezechilibrului metabolismului carbohidraților (Ashrafia și colab, 2013).

**SCOPUL STUDIULUI** este acela de a evalua corespunzător complicațiile obstetricale și cele legate de perioada perinatală și neonatală a copiilor concepuți prin fertilizare in vitro versus injectare intracitoplasmatică a spermatozoidului.

Scopul cercetării are la bază transferul unui singur embrion de ziua 5 (blastocist), selectat pe criterii morfokinetice, a cărui dezvoltare este monitorizată cu ajutorul unui sistem time lapse, urmat de sarcina unică, monembrionară, cu evoluție ulterioară a fătului până la viabilitate.

**OBIECTIVUL PRINCIPAL** îl reprezintă evaluarea sarcinilor obținute prin procedură de FIV versus ICSI (aici diferă doar tehnica de manipulare a celulelor în laborator), cu evidențierea complicațiilor fetale și neonatale comune și a celor particulare fiecăreia. Va fi cerut acordul fiecărei paciente și se va păstra confidențialitatea legată de

identitate. Sintetizând, etapele de lucru sunt următoarele:

- luarea în evidență cât mai devreme în sarcină (2 săptămâni după embriotransfer și pozitivarea testului biochimic de sarcină), efectuarea testelor și monitorizarea întocmai ca la o sarcină concepută spontan;
- corelarea datelor clinice și biochimice din viața prenatală și neonatală cu tehnica de laborator folosită și morfokinetica diviziunii blastocistului (fără a trece în plan secund particularitățile fiecărei paciente); accesibilitatea într-un laborator care poate testa potențialul de evolutivitate a blastocistului face posibilă selectarea unui singur embrion, pentru acuratețea informațiilor și rezultatelor obținute.

**OBIECTIVELE SECUNDARE** includ:

- strângerea datelor privind pacientele cu sarcină obținută cu ajutorul RUAM, care au dat naștere la fete vii sau morți, cu vârsta viabilă (peste 26 săptămâni de sarcină și peste 500 grame, în România)
- prelucrarea statistică a datelor obținute
- cercetarea particularităților dezvoltării embrionare (\*morfokinetica embrionară prin time lapse), a frecvenței apariției complicațiilor în perioada de final a trimestrului doi sau în trimestrul trei și a tipului de patologiei (*materna*: preeclampsie/eclampsie și complicațiile acestora: sdr HELLP, ficatul acut de sarcină, sindrom hepato-renal, tulburări multiple de organ, apoplexie utero-placentară, ruptura prematură de membrane, *anexială*: patologie placentară de localizare și aderență (ex placenta praevia, accreta), patologie de cordon: ex artera ombilicală unică, *fetala*: malformații, anomalii de creștere și dezvoltare, retard de creștere intrauterină, naștere prematură, complicații neurologice, moarte fetală în utero.)
- studiul adaptării nou născuților la viața extrauterină, scorul Apgar la naștere, admisia în unitățile de terapie intensivă și condițiile medicale care necesită tratament, precum: prematuritatea, sindromul de detresă respiratorie, tulburări metabolice multiple (hipoglicemia, hiperbilirubinemie, hipocalcemie, acidoză metabolică)
- coroborarea datelor și elaborarea unei strategii privind îmbunătățirea efectuării investigațiilor specifice pentru pacientele cu risc crescut de complicații obstetricale și neonatale și stabilirea unui pattern în profilaxia sau tratarea timpurie a acestora.

## PERSPECTIVE

Datele cercetării științifice vor putea contribui activ la îmbunătățirea protocolului de investigație în sarcina la pacientele care au beneficiat de o procedură de reproducere umană asistată. Poate fi accesată noua tehnologie bazată pe analiza markerilor biologici, care să constituie screening pentru insuficiența creșterii fetale intrauterine (SGA – small for gestational age), anomalii de placentatie și aprecierea riscului preeclampsiei (ex screening biochimic al factorilor proangiogenetici și angiogenetici PLGF – factor de creștere placentară sFLT – soluble tyrosin kinase), riscul dezvoltării diabetului gestational sau al nasterii premature (selectarea pacientelor și testarea fibronectinei fetale), teste de care dispunem actual, dar aproape nefolosite, din cauza unei lipse a evidenței complicațiilor celor mai importante în sarcina la astfel de paciente.

Integrarea diagnosticului și potențialelor complicații neonatale și perinatale survenite pot constitui un ajutor al sistemului de sănătate publică, cu reducerea costurilor legate de admisia și perioada de îngrijire în secțiile de terapie neonatală.

## REFERINȚE

- [1] Kovacs P., 2014. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 201412:124 DOI: 10.1186/1477-7827.
- [2] Kirkegaard K., Ahlström A., Ingerslev H.J., Hardarson T., 2015. Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertility and Sterility*, 103, (2), pp. 323–332, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.003>.
- [3] Kazem N., Johannes O., Stoegbauer L., Pietrowski D., Frantal S., Katharina W., 2013. Obstetric and perinatal outcomes in IVF versus ICSI-conceived pregnancies at a tertiary care center - a pilot study. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 11: 84. doi: 10.1186/1477-7827-11-84.
- [4] Levi P.E., Moioli M., Smeraldi A., Cesaratto E., Menduni F., Livio S., Morengi E., Patrizio P., 2016. Obstetric outcome and incidence of congenital anomalies in 2351 IVF/ICSI babies. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. Volume 154, Issue 1, January 2011, pp. 62–66
- [5] Morken NH, 2010. Preterm delivery in IVF versus ICSI singleton pregnancies: a national population-based cohort. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.*, 154(1), pp. 62-66, doi: 10.1016/j.ejogrb.2010.08.025
- [6] British Fertility Society RCOG, 2012. In vitro fertilization: perinatal risks and early childhood outcomes – [https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/scientific-impact-papers/sip\\_8.pdf](https://www.rcog.org.uk/globalassets/documents/guidelines/scientific-impact-papers/sip_8.pdf)
- [7] Bengt K., Finnström O., Nygren K.G, Olausson P.O, 2005. In vitro fertilization (IVF) in Sweden: infant outcome after different IVF fertilization methods. *Fertility and Sterility*; 84, 3.
- [8] Watanabe N., Fujiwara T., Suzuki T., Jwa S.C., Taniguchi K., Yamanobe Y., Kozuka K., Sago H., 2014. Is in vitro fertilization associated with preeclampsia? A propensity score matched study, *BMC Pregnancy Childbirth.*, 14: 69. doi: 10.1186/1471-2393-14-
- [9] Ewka C.M., Dumoulin J.C.M., Busato F, Ponger L., Eijssen L.M., Evers J. L.H., Tost J., van Montfoort P.A., 2014. Altered gene expression in human placentas after IVF/ICSI., *Hum. Reprod.*, 29 (12): 2821-2831., doi: 10.1093/humrep/deu241
- [10] Kanninen T.T., Sisti G., Ramer I., Goldschlag D., Witkin S. S., Spandorfer S. D., 2015. Predictive biomarkers of preterm delivery in women with ongoing IVF pregnancies, *Journal of Reproductive Immunology*, 112, pp 58–62
- [11] Imudia A.N., A. O. Awonuga, Doyle J. O., Kaimal A.J., Wright D.L., Toth T.L., Styer A.K., 2012. Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclampsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 97, 6, pp. 1374–1379
- [12] Esh-Broder E., Ariel I., Abas-Bashir N., Bdola Y., Celnikier D.H., 2011. Placenta accreta is associated with IVF pregnancies retrospective chart review. *General obstetric*, 118, 9, pp. 1084–1089.
- [13] Ashrafia M., Gosilia R., Hosseinia R., Arabipoora A., Ahmadia J., Chehrazic M., 2014. Risk of gestational diabetes mellitus in patients undergoing assisted reproductive techniques. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 176, pp. 149–152.