

Universidad de Valencia  
Facultad de Ciencias Biológicas



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular  
Programa de Doctorado en Biotecnología

**Validación clínica de un sistema de análisis de imagen  
Aplicación del time-lapse en el análisis de marcadores morfocinéticos  
de desarrollo a blastocisto e influencia del método de fecundación y  
calidad seminal sobre la cinética de desarrollo embrionario.**

Memoria para optar al grado de Doctor presentada por  
María Cruz Palomino

Bajo la dirección de los doctores  
Marcos Meseguer Escrivá  
Nicolás Garrido Puchalt

Valencia 2012

**Marcos MESEGUER ESCRIVA**, Doctor Europeo en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA: Que, María Cruz Palomino ha realizado bajo mi dirección el trabajo para su Tesis Doctoral “Validación clínica de un sistema de análisis de imagen. Aplicación del time-lapse en el análisis de marcadores morfocinéticos de desarrollo a blastocisto e influencia del método de fecundación y calidad seminal sobre la cinética de desarrollo embrionario”. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado,

En Valencia a 1 de Noviembre de 2012

**Nicolás GARRIDO PUCHALT**, Doctor en Biología por la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA: Que, María Cruz Palomino ha realizado bajo mi dirección el trabajo para su Tesis Doctoral “Validación clínica de un sistema de análisis de imagen. Aplicación del time-lapse en el análisis de marcadores morfocinéticos de desarrollo a blastocisto e influencia del método de fecundación y calidad seminal sobre la cinética de desarrollo embrionario”. Revisado el presente trabajo, se encuentra conforme para ser presentado en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia, para optar al grado de Doctor en Biología.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado,

En Valencia a 1 de Noviembre de 2012

*La historia nos enseña  
que los hechos del hombre nunca son definitivos;  
la perfección estática no existe,  
ni un insuperable saber último.  
(Bertrand Russell)*

## **Agradecimientos**

Si estoy escribiendo estas palabras es porque el trabajo que inicié hace más de 4 años está llegando a su fin, con lo cual es el momento de dar las gracias a quienes me han acompañado en este camino.

En primer lugar, a mis compañeras del laboratorio de FIV de IVI Alicante por prestarme la infraestructura, sus conocimientos y el apoyo necesario para llevar a buen fin este proyecto.

Al Dr. Muñoz. Gracias Manolo por darme dignidad profesional y por ver en mí cosas que ni yo misma era capaz de creer que podía hacer. Si de algo estoy orgullosa es del camino que hemos recorrido juntos estos años.

A mis directores de tesis, Dr. Marcos Meseguer y Dr. Nicolás Garrido, por confiar en mí antes que nadie, por su apoyo y sobre todo por su amistad, por las oportunidades anteriores y por las que han venido después. Gracias siempre.

A Ander y Vero, y a Gorka; Madrid siempre fue una posibilidad estando vosotros allí. A Sonia, porque aunque no nos veamos, sé donde estás.

A las nuevas generaciones Lucía, Naia, Asier, Aritz e Irene; sois los pequeños amores de mi vida.

A Ana y a Vero, mis amigas desde hace más tiempo del que me gustaría recordar; gracias por estar a mi lado en los buenos y malos momentos, por esas tardes eternas en las que me hicisteis darme cuenta que contar con vuestra amistad era de lo mejor que me había pasado en la vida.

A Alfonso y a Susana, porque formar parte de vuestra familia me hace ser mejor persona; por vuestra paciencia, por vuestro apoyo, por creer en mí y por sostenerme cuando me he caído. Gracias una vez más y nunca serán suficientes.

A Eider, por ser como eres. A Gaizka, por ser tú. A ambos, porque la distancia no ha conseguido disminuir en lo más mínimo lo que significáis para mí.

A Mariana, porque ser familia no implica tener la misma sangre.

A mi familia, porque ellos representan el mejor ejemplo a seguir para convertirme en la persona que quiero ser.

A Laura, no sólo eres mi hermana sino mi compañera y mi mejor amiga. Gracias por estar ahí sin ni siquiera pedírtelo.

A mis padres, gracias por dejarme encontrar mi propio camino, aunque sé que no estaría aquí sin vosotros. Me inspiráis a ser la mejor versión de mi misma todos los días. Todo lo que soy os lo debo a vosotros. Os quiero.

## **Introducción**

- 1.- La infertilidad.
- 2.- Técnicas de Reproducción Asistida.
  - 2.1.- Programas de donación de ovocitos.
    - 2.1.1.- Preparación de las donantes.
    - 2.1.2.- Preparación endometrial de las receptoras.
    - 2.1.3.- Resultados de los programas de donación de ovocitos.
  - 2.2.- Limitaciones de las técnicas de Reproducción Asistida
- 3.- Marcadores de calidad embrionaria.
  - 3.1.- Marcadores clásicos.
  - 3.2.- Nuevos marcadores.
    - 3.2.1.- Respiración ovocitaria.
    - 3.2.2.- Recambio de aminoácidos.
    - 3.2.3.- Las “-ómicas” como herramientas de investigación.
- 4.- El blastocisto.
- 5.- Calidad seminal y desarrollo embrionario.
- 6.- Análisis de imagen. Aplicaciones en los programas de Reproducción Asistida
- 7.- Time-lapse y cinética de desarrollo embrionario.

## **Objetivos**

### **Material y Método**

- 1.- Donación de ovocitos.
  - 1.1.- Selección de las donantes.
    - 1.1.1.- Estimulación ovárica de las donantes.
  - 1.2.- Receptoras
    - 1.2.1.- Preparación endometrial de las receptoras.
- 2.- Punción ovárica y recuperación de ovocitos
- 3.- Obtención y procesamiento de las muestras de semen.
- 4.- Técnicas de fecundación *in vitro*
  - 4.1.- Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)
  - 4.2.- Fecundación *in vitro* (FIV)
- 5.- Análisis de la fecundación y evaluación embrionaria.
- 6.- Transferencia embrionaria.

## 7.- Sistemas de análisis de imagen. El Embryoscope.

7.1.- Preparación placas del Embryoscope.

7.2.- Software integrado en el Embryoscope: el EmbryoViewer.

7.3.- El Embryoscope en el laboratorio de FIV.

7.4.- Variables de estudio en el sistema de análisis de imagen.

7.5.- Categorías morfocinéticas

## 8.- Estudios

8.1.- Estudios de la validación clínica de un sistema de análisis de imagen en tratamientos de Reproducción Asistida.

8.1.1.- Variables de estudio

8.1.1.1.- Variables independientes.

8.1.1.2.- Variables dependientes.

8.1.2.- Análisis de datos.

8.2.- Examen de la influencia de la cinética embrionaria sobre las probabilidades de desarrollo a blastocisto y sus características morfológicas.

8.2.1.- Variables de estudio

8.2.1.1.- Variables independientes.

8.2.1.2.- Variables dependientes.

8.2.2.- Análisis de datos.

8.3.- Análisis del impacto de la calidad seminal y de las técnicas de fecundación *in vitro* sobre la cinética de desarrollo embrionario en un modelo de donación de ovocitos

8.3.1.- Calidad seminal y métodos de fecundación.

8.3.2.- Análisis de imagen.

8.3.3.- Análisis de datos.

## Resultados

1.- Estudios de la validación clínica de un sistema de análisis de imagen en tratamientos de Reproducción Asistida.

1.1.- Calidad embrionaria en día 3 de desarrollo.

1.2.- Tasa de desarrollo a blastocisto y viabilidad embrionaria en día 5.

1.3.- Transferencias embrionarias en día 3 y día 5.

1.4.- Tasa de gestación clínica e implantación Embryoscope versus incubador convencional.

2.- Examen de la influencia de la cinética embrionaria sobre las probabilidades de desarrollo a blastocisto y sus características morfológicas.

2.1.- Cinética de desarrollo embrionario a blastocisto y blastocisto óptimo.

2.2.- Distribución temporal de los blastocistos en los distintos cuarteles de las variables de tiempo analizadas.

2.3.- Intervalos óptimos de tiempo y proporción de blastocistos.

2.4.- Categorías morfocinéticas y tasa de desarrollo a blastocisto.

3.- Análisis del impacto de la calidad seminal y de las técnicas de fecundación *in vitro* sobre la cinética de desarrollo embrionario en un modelo de donación de ovocitos

3.1.- Cinética de desarrollo embrionario en función de la técnica de fecundación.

3.2.- Intervalos óptimos de división y método de fecundación.

3.3.- Categorías morfocinéticas y método de fecundación.

3.4.- Cinética de desarrollo embrionario en función de la concentración de espermatozoides.

3.5.- Intervalos óptimos de división y concentración espermática.

3.6.- Categorías morfocinéticas y concentración espermática.

3.7.- Cinética de desarrollo embrionario en función de la movilidad espermática.

3.8.- Intervalos óptimos de división y movilidad espermática.

3.9.- Categorías morfocinéticas y movilidad espermática

**Discusión.**

**Conclusiones**

**Bibliografía**

# **INTRODUCCIÓN**

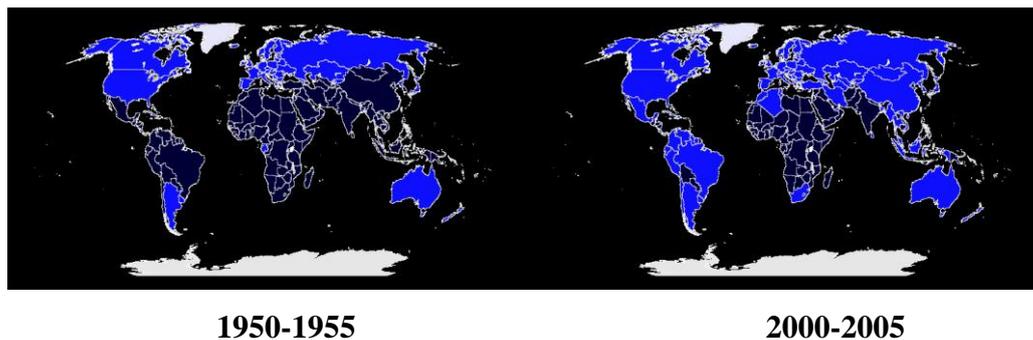
## **1.- La infertilidad.**

Una inspección global de las actitudes culturales alrededor del mundo demuestra que el sufrimiento personal asociado a la infertilidad forma parte de la condición humana. En los últimos años, los progresos logrados en tecnología médica han aportado soluciones a la mayor parte de parejas infértiles, especialmente en los países desarrollados; sin embargo, estos avances también han supuesto la aparición de ciertas cuestiones médicas, éticas y sociales que precisan de la atención no sólo de los profesionales sanitarios sino de la sociedad como conjunto.

La infertilidad y sus términos asociados presentan significados ambiguos según la disciplina que se considere. En medicina reproductiva, el término infertilidad se usa para mujeres (o parejas) que han mantenido relaciones sexuales sin protección durante más de un año y no han conseguido una gestación, pudiendo hablar de infertilidad primaria cuando no es posible lograr un embarazo en 1-2 años y no se había gestado previamente, y de infertilidad secundaria, la cual se aplica a mujeres que cumplen los criterios que definen a la infertilidad primaria pero que en algún momento anterior habían gestado (Lunenfeld et al. 2004).

En los países en desarrollo, la tasa de infertilidad primaria es baja en comparación con los países desarrollados, debido fundamentalmente a que los matrimonios y la maternidad ocurren a edades muy tempranas. Sin embargo, el escenario cambia radicalmente cuando se consideran los datos de infertilidad secundaria donde las enfermedades de transmisión sexual y la dificultad para acceder a unas prestaciones sanitarias higiénicas y seguras actúan como causas responsables de estos altos índices de infertilidad (World Health Organization 2001). Además, no hay que olvidar el impacto que pueda causar el virus del VIH sobre la fertilidad; las consecuencias de esta epidemia son devastadoras, afectando no sólo a las tasas de mortalidad adulta e infantil y a la esperanza de vida sino también a los factores económicos, sociales y demográficos que contribuyen al desarrollo de estos países.

Por el contrario, en las sociedades más desarrolladas, la infertilidad primaria tiende a ser significativamente mayor que en los países en vías de desarrollo debido a que las mujeres retrasan la edad de su primera gestación; además, en las poblaciones contemporáneas de mujeres que intentan activamente concebir, el descenso en la fertilidad asociado a la edad es un hecho evidente. Por su parte, la infertilidad secundaria es menor debido a un control eficaz de las enfermedades de transmisión sexual y a una mayor accesibilidad a las políticas de salud reproductiva.



**Figura 1. Evolución de la infertilidad. En azul claro están representados los países con una elevada tasa de infertilidad, mientras que la tonalidad más oscura hace referencia a países con bajas tasas de infertilidad.**

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

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

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

## **2. Técnicas de Reproducción Asistida.**

Frente a la infertilidad, históricamente se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida, en función del motivo original por el cual una pareja no puede concebir. El objetivo principal de las técnicas de reproducción asistida (TRA) es generar una descendencia sana y viable; el nacimiento del primer “bebé-probeta” en

1978 supuso un hito para la medicina reproductiva, estableciendo las bases de un nuevo campo de investigación médica.

Una de las primeras técnicas de Reproducción Asistida desarrolladas para el tratamiento de una pareja infértil es la inseminación artificial que tradicionalmente consistía en el depósito de semen completo en el útero. Los intentos para lograr la fecundación *in vitro* (FIV) en humanos pasaron por varias etapas de investigación; esta técnica implica la fecundación del ovocito en condiciones de cultivo *in vitro*, previa obtención y preparación de los gametos para la posterior transferencia de los embriones a la cavidad uterina. Aunque la indicación inicial para realizar un ciclo de FIV fue la patología tubárica, en la actualidad podemos admitir que la situación ha cambiado ya que esta técnica también se aplica en casos de factor masculino anormal, esterilidad de causa desconocida, endometriosis, esterilidad plurifactorial...

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

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

selección y reducir el número de embriones transferidos. Los resultados obtenidos con embriones congelados son cada vez más similares a los de embriones frescos, por lo que los programas de congelación se convierten en una alternativa válida para rentabilizar los ciclos de estimulación ovárica a través de las transferencias de embriones congelados.

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

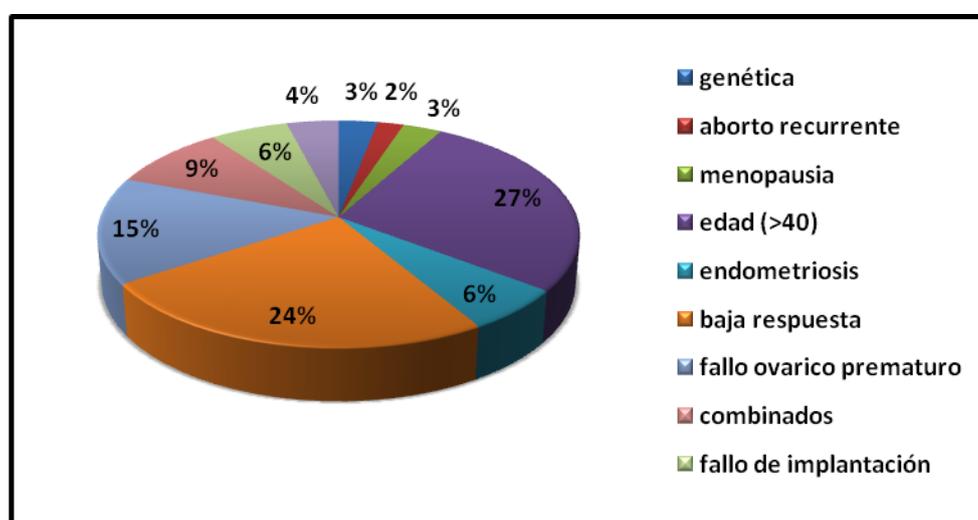
### **2.1 Programas de donación de ovocitos.**

En el modelo de sociedad actual, cada vez son más las mujeres que retrasan su maternidad hasta pasados los 35 años. El acusado descenso de la fertilidad que se produce a partir de esta edad hace que cada vez más mujeres necesiten recurrir a la donación de ovocitos para lograr una gestación.

Las primeras referencias científicas sobre la donación de ovocitos se sitúan en 1983 (Trounson et al. 1983) cuando se consigue la primera gestación con esta técnica. Un año más tarde, se publica el primer embarazo a término en una receptora de ovocitos (Lutjen et al. 1984). Desde ese momento, esta práctica se extiende por todo el mundo con gran rapidez debido a su eficacia y a la ampliación de sus indicaciones. En estos programas, la posibilidad de homogeneizar el factor femenino actúa como una potente herramienta de control, lo que permite estudiar la influencia real de otros factores como el espermatozoide y la endometriosis (Simon et al. 1994) ya que se reduce la variabilidad en la calidad ovocitaria introducida por la propia situación de infertilidad.

Inicialmente las indicaciones para la donación de ovocitos incluían el fallo ovárico prematuro y la presencia de alteraciones genéticas y/o cromosómicas, pero en la actualidad, los excelentes resultados obtenidos con esta estrategia de tratamiento han

permitido la ampliación de sus indicaciones en beneficio de un colectivo de mujeres cada vez mayor. Las principales causas por las que se recurre a la donación de ovocitos son por mala calidad ovocitaria, por enfermedades hereditarias transmisibles que no pueden ser detectadas por técnicas de diagnóstico genético pre-implantacional, mujeres con fallos repetidos en fecundación *in vitro* y/o alteraciones cromosómicas en la mujer o en los embriones, ovarios inaccesibles para la obtención de ovocitos y mujeres mayores de 40 años con ciclo ovárico normal: en estas pacientes, la probabilidad de gestación con sus propios ovocitos está muy disminuida mientras que la tasa de aborto y el riesgo de trisomías aumentan considerablemente (Santalla et al. 2008).



**Figura 2. Indicaciones donación de ovocitos** (Budak et al. 2007)

La donación de ovocitos debe ser anónima y nunca tendrá un carácter lucrativo o comercial. La donante debe tener entre 18-35 años, su estado psicofísico deberá cumplir los términos de un protocolo obligatorio de estudio de las donantes, que tendrá carácter general y que incluirá las características fenotípicas de la donante, además de ser no portadora de enfermedades genéticas, hereditarias o infecciosas transmisibles; también es importante llevar a cabo una evaluación psicológica para comprobar que presenta un perfil idóneo como donante. Los centros autorizados deberán controlar que de una misma donante no nazcan más de 6 hijos en territorio nacional, además de intentar garantizar la máxima similitud fenotípica, inmunológica y de compatibilidad sanguínea con la receptora. Las donantes de ovocitos deberán firmar un documento aportado por el

centro, en el que constarán los objetivos y las consecuencias de la donación, así como las pruebas a las que serán sometidas.

En el proceso de donación de ovocitos se distinguen dos elementos fundamentales: las donantes en las que se realiza una estimulación ovárica controlada e inducción de la ovulación y las receptoras, en las que se aplica un protocolo de preparación endometrial y mantenimiento del embarazo mediante el aporte exógeno de hormonas.

### **2.1.1 Preparación de las donantes.**

El objetivo de los protocolos de estimulación en las donantes es la prevención de un pico prematuro de hormona luteinizante (LH) a través de la administración de análogos de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y al mismo tiempo alcanzar un reclutamiento y desarrollo folicular múltiple mediante la estimulación con gonadotropinas.

En los programas de donación de ovocitos, es importante garantizar la seguridad de las donantes en relación a los riesgos de sufrir un síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). El control de esta patología requiere la identificación de las pacientes de alto riesgo y el uso de protocolos de estimulación adecuados. El empleo de gonadotropina coriónica humana (hCG) para la maduración final del ovocito y la posterior ovulación, especialmente en mujeres jóvenes con una respuesta ovárica intensa a la estimulación, se asocia a un elevado riesgo de síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO) como consecuencia del desarrollo de numerosos cuerpos lúteos y de la presencia de concentraciones suprafisiológicas de estradiol (E2) y progesterona (P4), ya que la vida media de la hCG es mayor a la de la LH. Teniendo en cuenta estas observaciones, algunos autores recomiendan usar agonistas de la GnRH en la inducción final de la ovulación; con este protocolo se han obtenido resultados similares a los tratamientos con hCG al mismo tiempo que se reduce al mínimo el riesgo de SHO (Borini et al. 2011).

### **2.1.2 Preparación endometrial de las receptoras.**

Se considera un paso imprescindible para el éxito de esta técnica, ya que el endometrio de la receptora debe presentar una receptividad óptima para la implantación. Para ello, es necesario el aporte exógeno de estrógenos y progesterona que igualen los efectos de las hormonas ováricas sobre el tejido endometrial. En pacientes con función

ovárica, la transferencia embrionaria puede realizarse durante ciclos naturales sin necesidad de terapia hormonal; sin embargo, resulta bastante complicado sincronizar el ciclo con la donante por lo que esta modalidad raramente se utiliza.

Existen numerosos protocolos de sustitución hormonal que difieren en la vía de administración de los estrógenos. El protocolo más frecuente incluye la administración de valerianato de estradiol (2-6 mg) por vía oral o transdérmica; en una primera fase se administran concentraciones crecientes de estrógenos para conseguir una proliferación endometrial adecuada que se controla mediante determinaciones séricas de estradiol y ecografías seriadas para medir el grosor endometrial. Un día después de que se haya realizado la punción de la donante y se haya confirmado la calidad ovocitaria y la fecundación, la receptora debe empezar a administrarse progesterona micronizada a razón de 800 mg/día por vía vaginal (Escriba et al. 2006).

La transferencia embrionaria se realiza en día 3-día 5 pero el tratamiento con estrógenos y progesterona debe mantenerse hasta la siguiente regla o si se produce gestación, durante las primeras 12 semanas. Si existe función ovárica en las receptoras, ésta puede influir negativamente en la preparación endometrial al desarrollarse un endometrio secretor antes de la administración de progesterona, lo cual nos lleva a un descenso en las tasas de gestación. Para evitarlo, se suprime sistemáticamente la producción endógena de gonadotropinas con la administración de un análogo de la GnRH (Klein and Sauer 2002).

### **2.1.3. Resultados de los programas de donación de ovocitos.**

Como se ha comentado previamente, la donación de ovocitos es la técnica de reproducción asistida con mejores resultados. Según los registros de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE), en España el 12.2% de los ciclos se realiza en pacientes por encima de los 40 años (Andersen et al. 2005). Dentro de las variables que pueden influir en los resultados destacan el número de embriones transferidos, la edad de la receptora, la edad de la donante y la indicación de la técnica; de todos los posibles factores a tener en cuenta, la calidad de los ovocitos y el grosor endometrial en la receptora están considerados como los parámetros más fiables a la hora de predecir una gestación.

La gran mayoría de trabajos publicados no describen disminuciones notables en los resultados gestacionales en función de la edad de la receptora, aunque se ha demostrado que las tasas de gestación, implantación y aborto empeoran

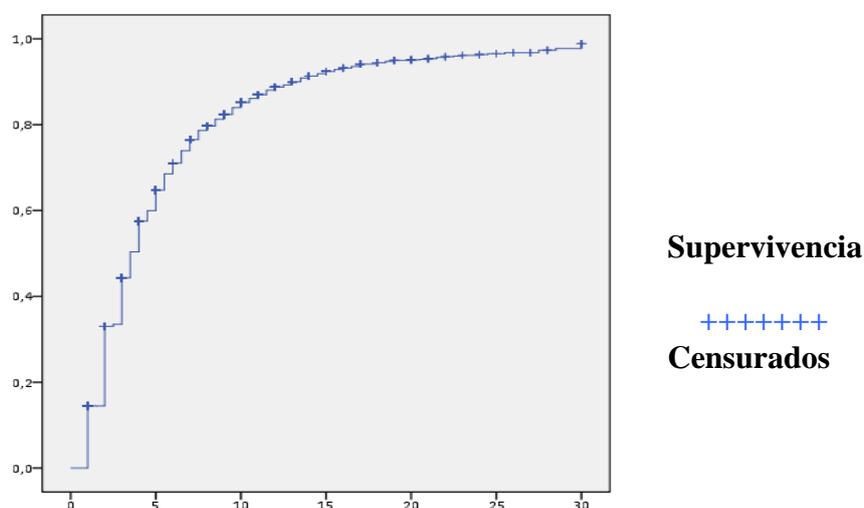
progresivamente a partir de los 45 años (Soares et al. 2005). Sin embargo, este tema sigue generando opiniones controvertidas en cuanto a la posibilidad de establecer un límite de edad por encima del cual deba rechazarse la realización de un tratamiento de fertilidad, ya que se han descrito numerosos ejemplos de los riesgos que conlleva un embarazo en mujeres de edad avanzada como son los casos de muerte fetal, bajo peso, hipertensión o diabetes (Salihu et al. 2003). Actualmente se considera la idea de que, aunque cada caso debe valorarse de forma individual, en principio debe desaconsejarse la donación de ovocitos en receptoras que sobrepasen los 50 años; estas consideraciones coinciden con los fundamentos de la Ley de Reproducción Asistida que fija la edad límite de las usuarias de estas técnicas de reproducción en la ausencia de riesgos para ellas mismas durante el tratamiento y embarazo, y para la descendencia que se puedan derivar de una maternidad a una edad clínicamente inadecuada.

## **2.2 Limitaciones de las técnicas de reproducción asistida.**

La mayor parte de los embriones obtenidos *in vitro* y transferidos ven interrumpido su desarrollo, apoyando la teoría de que sólo una pequeña fracción de éstos está destinada a convertirse en un recién nacido vivo (Patrizio and Sakkas 2009). A pesar de la aplicación intensiva de las TRA y de las cada vez mayores tasas de éxito, hay ciertos aspectos de estos tratamientos que continúan sin resolverse, siendo una limitación importante la incapacidad de distinguir con fiabilidad entre embriones competentes y embriones con anomalías cromosómicas.

Los criterios de selección morfológica están correlacionados con las tasas de gestación pero no implican una selección fiable de embriones genéticamente normales (Shulman et al. 1993); por un lado, el valor predictivo de estos criterios clásicos de selección no es perfecto y por otro lado, está la cuestión de que la mayoría de embriones cromosómicamente anormales son capaces de progresar hasta la etapa de blastocisto y no pueden detectarse antes de la transferencia. En un intento para superar este obstáculo, se transfiere más de un embrión con la esperanza de que al menos uno de ellos sea cromosómicamente normal, implante y culmine en un nacido vivo, al mismo tiempo que se aplican protocolos de estimulación más agresivos con el objetivo de maximizar los ovocitos recuperados y aumentar la cantidad de embriones potencialmente transferibles; es decir, se transfieren más embriones porque no es posible garantizar su normalidad cromosómica a pesar de que desde un punto de vista morfológico son perfectamente aptos para la transferencia.

Aunque esta aproximación parezca lógica hay que tener en cuenta los costes y los riesgos que conlleva. Una estimulación ovárica agresiva enfocada a la obtención de más embriones aumenta los riesgos de aparición de complicaciones como el SHO y eleva los costes económicos ya que se necesitan mayores cantidades de gonadotropinas; por otro lado, la transferencia de más de un embrión eleva las tasas de gestación múltiple con el correspondiente aumento de la mortalidad perinatal. La creencia de que es mejor transferir más de un embrión contrasta con varias observaciones entre las que destaca que la mayor parte de embriones generados *in vitro* y transferidos no acaban en un nacimiento sino que se pierden (Patrizio and Sakkas 2009).



**Figura 3. Tasa acumulada de recién nacido vivo en ciclos de donación de ovocitos (Garrido et al. 2011)**

Siguiendo esta misma línea argumental, cuyo punto de partida es la evidencia de que no todos los ciclos finalizan con un recién nacido vivo en el primer intento y que no todos los ciclos tienen éxito independientemente del número de tentativas, nuestro centro (Garrido et al. 2011) llevó a cabo un estudio en el que se calculó la tasa acumulada de recién nacido vivo en función del número de embriones transferidos (en sucesivos ciclos) para alcanzar el objetivo propuesto. Como se observa en la figura, la probabilidad de que una pareja logre llevarse un bebé a casa aumenta conforme lo hace la cantidad de embriones transferidos en ciclos consecutivos de estimulación. Sin embargo, de la gráfica también se deduce el hecho de que independientemente del número de embriones transferidos, existe un porcentaje de ciclos que nunca logran el objetivo deseado.

El fin último de todas estas consideraciones está dirigido a la transferencia de un único embrión lo que supone el perfeccionamiento de los criterios de selección que definen la calidad embrionaria

### **3.- Marcadores de calidad embrionaria.**

Los avances relacionados con las técnicas de fecundación *in vitro* se basan en una serie de progresos significativos a nivel médico y tecnológico. Estas nuevas perspectivas de trabajo se traducen en una mayor cantidad y calidad de los embriones disponibles para la transferencia (y/o para congelar); de acuerdo a estas condiciones, la transferencia de más de un embrión por ciclo de tratamiento se ha convertido en una práctica común debido a que la mayoría de embriones generados mediante FIV tienen una viabilidad relativamente baja (Kovalevsky and Patrizio 2005) y a que no existen herramientas para identificar eficazmente a los embriones con mayor potencial de implantación.

#### **3.1 Marcadores clásicos.**

En las tres últimas décadas, la evolución de los métodos de observación embrionaria no ha experimentado cambios de especial importancia. Aunque se han acumulado una gran cantidad de datos morfológicos y de experiencia, todos los métodos de examen descansan sobre el mismo instrumental y la misma representación visual; sin embargo, gracias a estas mediciones ha sido posible profundizar en la apariencia de un embrión óptimo en diferentes etapas del desarrollo.

La evaluación morfológica, aunque imperfecta, es actualmente el método más popular de selección embrionaria previo a la transferencia. Históricamente, el embriólogo se ha basado en las observaciones realizadas al microscopio óptico para describir las características morfológicas de un embrión como indicadores potenciales de la viabilidad. Sin embargo, el empleo de criterios de selección morfológica basados en métodos de observación estáticos deriva en tasas de implantación que todavía son relativamente bajas en relación al número de embriones transferidos, siendo la explicación más probable que el examen de la calidad embrionaria en un momento determinado no es representativo del desarrollo global ni del gameto ni del embrión, por lo que las conclusiones extraídas de la valoración morfológica pueden ser engañosas en relación a la competencia embrionaria. Además, los resultados obtenidos cuando se transfieren embriones congelados son similares o incluso mejores (Levens et al. 2008)

con respecto a la transferencia de embriones frescos, lo que hace sospechar que se ha errado en la identificación del embrión con mayor competencia evolutiva, lo cual constituye otra prueba de que los métodos convencionales de selección embrionaria no son especialmente fiables.

Los métodos actuales de selección embrionaria incluyen el análisis de los gametos y embriones en distintas etapas del desarrollo comenzando con los ovocitos, seguido de los cigotos en pronúcleos y de las sucesivas divisiones embrionarias hasta que se alcanza el estadio de blastocisto; adicionalmente, se han estudiado otros marcadores como la morfología ovocitaria, el “score” pronuclear y la división temprana (Rienzi et al. 2005). Todos estos parámetros complementan individualmente o en conjunto la evaluación “original” del embrión, aunque su utilidad y aplicación práctica sean objeto de un intenso debate.

Mientras que el examen morfológico tiene la ventaja de ser un método sencillo, no invasivo y rápido, presenta el inconveniente de ser poco fiable, altamente subjetivo, que precisa de formación especializada y cierto grado de experiencia y con pocas esperanzas de estandarización. Además, la definición de calidad embrionaria es un concepto vago e impreciso; incluso en el mejor escenario posible, donde la calidad embrionaria se determina retrospectivamente en función de las tasas de gestación, los embriólogos únicamente pueden inferir la calidad de los embriones que han gestado. Resulta inquietante advertir que esta definición tan imprecisa de los fenotipos deseados impacta directamente sobre la interpretación de los resultados, ya que actualmente no podemos apreciar su valor sin ser capaces de situarlos dentro de un contexto fisiológico.

### **3.2 Nuevos marcadores.**

Las limitaciones de los criterios morfológicos de selección embrionaria han conducido al desarrollo de nuevas tecnologías con el propósito de conocer el potencial reproductivo de un embrión en concreto. Por lo tanto, la búsqueda de un test objetivo y fiable que evalúe la viabilidad tanto del ovocito como del embrión y que conduzca a un descenso en las tasas de gestación múltiple mientras se mantienen los resultados globales, se ha convertido en uno de los desafíos más importantes de la medicina reproductiva contemporánea.

Hasta hace relativamente poco tiempo, se partía del fenotipo como principal fuente de información para el estudio de una patología y/o para describir la eficacia de un determinado procedimiento médico. Aunque estas aproximaciones son valiosas,

actualmente se dispone de técnicas que amplían la descripción fenotípica y cuya aplicación clínica está condicionada por su complejidad metodológica y porque precisan de cierto grado de manipulación embrionaria. La posibilidad de acceder a estos conocimientos supone una nueva forma de pensamiento global en lo que a cuestiones biológicas se refiere, aunque la interpretación y gestión de esta información precise el desarrollo de herramientas estadísticas y bioinformáticas de probada eficacia y potencia.

**3.2.1 Respiración ovocitaria.** El estudio del metabolismo embrionario, y en particular del consumo de oxígeno, puede mejorar la selección embrionaria a partir de la identificación de los embriones con mayor competencia en el desarrollo (Tejera et al. 2011). Este factor está considerado como el mejor indicador de la actividad metabólica global (Overström 1987) y como un parámetro importante en la evaluación de la calidad embrionaria (Harvey et al. 2004).

Los resultados obtenidos aportan información relativa a la carga mitocondrial del ovocito, un factor indicativo del crecimiento y maduración ovocitaria, ya que si un ovocito tiene poco material mitocondrial, no será capaz de completar la fecundación ni sostener el posterior desarrollo embrionario como consecuencia de la escasez de ATP (Dumollard et al. 2007). Se ha podido determinar la relación directa entre el consumo de oxígeno y la calidad embrionaria, aplicándose por primera vez este análisis en la rutina clínica (Tejera et al. 2011). La posibilidad de determinar tasas individuales de respiración en diferentes etapas del desarrollo embrionario puede resultar útil en el estudio de procesos biológicos como la respuesta embrionaria en situaciones de estrés o qué impacto tiene la congelación sobre las membranas de los orgánulos celulares.

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

embrionaria y consumo/síntesis de aminoácidos, independientemente de otros factores como la evaluación morfológica.

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

**- genómica.** La secuencia del DNA condiciona la síntesis de proteínas y el fenotipo, por lo que no se puede descartar la presencia de determinantes genéticos relacionados con la viabilidad embrionaria, aunque las variaciones específicas del DNA relacionadas con una mejora en las perspectivas de desarrollo no han sido identificadas.

El estudio de la integridad y de la dotación cromosómica es importante debido a que las aneuploidías no son compatibles con el desarrollo de individuos sanos, son la causa más común de aborto espontáneo y son mucho más frecuentes a nivel embrionario (Munne et al. 1995).

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

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

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

**- metabolómica.** El examen de los metabolitos presentes en el medio de cultivo se erige en un método potencial de selección embrionaria que optimiza las oportunidades de gestación mejorando la eficacia de los tratamientos de fecundación *in*

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

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

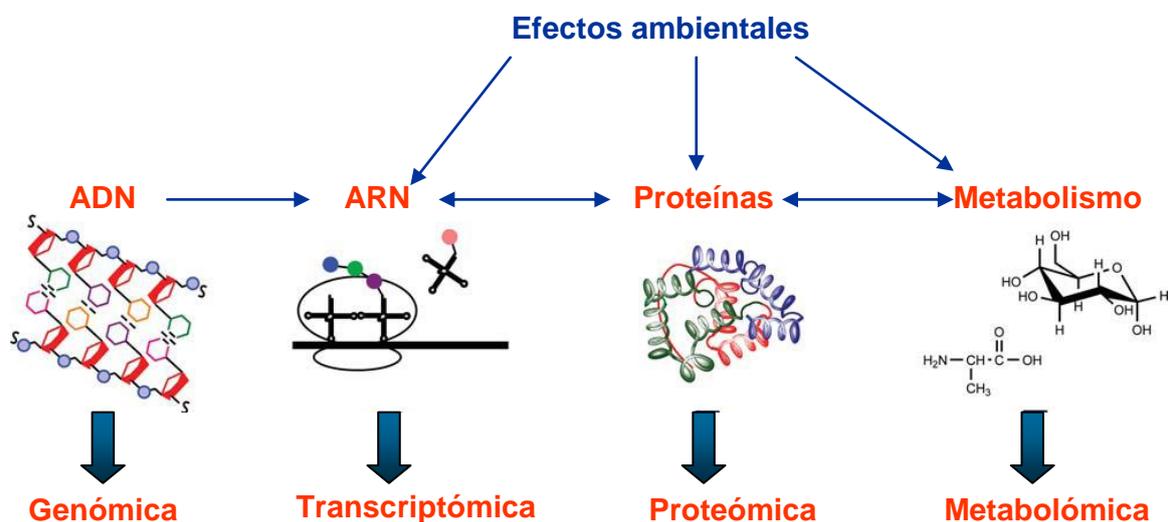


Figura 4. “-Ómicas” como herramientas de investigación

#### 4.- El blastocisto

El desarrollo de un embrión pre-implantatorio en humanos se inicia con la fecundación y culmina con la formación de una estructura diferenciada, el blastocisto, aproximadamente 5-6 días después. Durante este periodo el embrión experimenta varios procesos entre los que se incluyen la proliferación celular, la compactación, la cavitación y finalmente la diferenciación en dos poblaciones celulares, un grupo de células en posición más o menos central conocida como masa celular interna (MCI) y una monocapa externa de células epiteliales denominada trofoectodermo (TE).

El desarrollo embrionario *in vitro* hasta la etapa de blastocisto depende fundamentalmente de las condiciones de cultivo (Martin 2000). En función de esta premisa, uno de los grandes retos a los que se ha enfrentado la comunidad científica ha sido la optimización de las condiciones de cultivo, de modo que aquellos embriones genéticamente competentes puedan expresar su potencial de desarrollo y evolucionar hacia blastocistos viables en condiciones *in vitro*. Debido a que el embrión pre-implantatorio necesita una serie de nutrientes externos y metabolitos para alcanzar este estadio del desarrollo, un factor esencial es la composición del medio de cultivo, ya que hay datos que revelan que el embrión humano varía sus requerimientos nutricionales desde la fase de cigoto hasta la de blastocisto (Hardy et al. 1990, Houghton et al. 2002). Los últimos trabajos se han centrado en mejorar las condiciones de cultivo; por un lado, se han desarrollado sistemas de co-cultivo con células somáticas autólogas y heterólogas (Menezo et al. 1992) y por otro, se han puesto a punto medios de cultivo secuenciales que reflejan los cambios en los requerimientos nutricionales del embrión (Martin and Leese 1995) así como las variaciones que ocurren a lo largo de su desplazamiento por el tracto reproductivo femenino (Gardner et al. 1996).

Muchas de las ventajas derivadas del cultivo de blastocistos se han aplicado a los ciclos de fecundación *in vitro*, ya que hay varios estudios que han demostrado que la transferencia de blastocistos eleva las tasas de implantación por embrión transferido en comparación con la transferencia en día 3 de desarrollo. El por qué de estas mejoras se debe a que las transferencias en día 5 reflejan un carácter más fisiológico, al sincronizar el desarrollo embrionario con el recorrido por el tracto reproductor femenino y minimizar la exposición del embrión a un ambiente materno hiperestimulado; además, prolongar el cultivo hasta día 5-6, después de la activación del genoma embrionario, ayuda en la selección de embriones con mayores probabilidades de implantación al

actuar como un filtro de selección natural en el conjunto de la cohorte embrionaria (Martin. K.L 2004).

El aumento en las tasas de implantación asociado a la transferencia de blastocistos ayuda a mejorar las bajas tasas de gestación obtenidas con la fecundación *in vitro*. En un análisis retrospectivo (Marek et al. 1999), se demuestra un aumento significativo en la tasa de gestación en día 5 (61.3%) en comparación con los resultados obtenidos al transferir en día 3 (47.5%), incluso cuando en el caso de los blastocistos se han transferido menos embriones. Estos resultados sugieren que la transferencia de menos embriones en estadio de blastocisto ayuda a reducir los elevados porcentajes de gestaciones múltiples asociados a los tratamientos de reproducción asistida y aumentan las oportunidades de encontrar criterios cuantitativos para la selección de embriones viables.

En cuanto a las posibilidades de criopreservación y teniendo en cuenta que el cultivo de blastocistos actúa como una herramienta de selección de los embriones con mayor potencial de implantación, en día 5 se congelan menos embriones pero con más perspectivas de viabilidad (Kaufman et al. 1995). El cultivo de blastocistos también facilita la realización de un diagnóstico genético preimplantacional al ampliar el tiempo disponible entre el análisis genético y una evaluación posterior del embrión, y también permite el análisis genético de las células del trofoectodermo disminuyendo el riesgo de error en el diagnóstico por mosaico. Por último, permite la derivación de células madre embrionarias desde la MCI.

Sin embargo, la prórroga del cultivo embrionario no implica únicamente beneficios. Entre las desventajas destacan las elevadas tasas de pérdida embrionaria, ya que sólo un 50% de los embriones alcanza este grado de desarrollo incluso en unas condiciones de cultivo óptimas, por lo que es posible que haya ciclos que se cancelen al no haber blastocistos en día 5 de desarrollo. La descripción morfológica no está considerada como un buen factor pronóstico del desarrollo a blastocisto; aproximadamente el 50% de los embriones de buena calidad en día 3 evolucionan hacia blastocisto e incluso un 20% de embriones definidos como subóptimos son capaces de progresar hasta esta etapa del desarrollo (Rijnders and Jansen 1998). Además, también se sabe que el 34% de los blastocistos son aneuploides lo que corrobora la idea de que la morfología no es un buen factor de predicción de los futuros resultados del ciclo (Sandalinas et al. 2001). Otras desventajas asociadas al cultivo *in vitro* de blastocistos es que aumenta la frecuencia de gemelos monozigóticos (da Costa AL et al. 2001) y se

describe una mayor tendencia hacia una descendencia de género masculino en comparación con la transferencia de embriones en etapas anteriores del desarrollo (Kausche et al. 2001).

### **5.- Calidad seminal y desarrollo embrionario.**

En los últimos años, el aumento generalizado de la infertilidad masculina ha puesto de manifiesto la necesidad de redefinir los métodos clásicos de diagnóstico. La Organización Mundial de la Salud (OMS), organizaciones no gubernamentales, y otras instituciones sociales deben desempeñar una función importante en este sistema; el rastreo temprano de las posibles causas de infertilidad masculina puede ser de gran ayuda a la hora de planear opciones de tratamiento y en la identificación de factores de riesgo relacionados con determinadas áreas geográficas que describen a una población con elevadas probabilidades de sufrir infertilidad. Este interés en la etiología de la infertilidad masculina ha conducido a un aumento en las investigaciones de carácter andrológico con el objetivo de conocer la fisiología del espermatozoide y desarrollar terapias más eficaces, alternativas quirúrgicas y técnicas sofisticadas que separen a los espermatozoides funcionales de aquéllos que no son competentes en el contexto de un proceso de fecundación.

El diagnóstico de un varón como fértil o infértil es un proceso extremadamente difícil dado que su estatus puede variar en periodos cortos de tiempo e incluso entre distintas parejas. Estas afirmaciones deben considerarse desde el punto de vista de un sólo eyaculado, de modo que resulta mucho más adecuado definir una muestra de semen como apta o no para fecundar en vez de determinar si el varón tiene o no problemas de índole reproductiva (Braundmeier and Miller 2001).

	Daño nuclear espermático	Exposición testicular y del feto
Causas	Estrés oxidativo Déficits hormonales. Microdeleciones del cromosoma Y. Escasez de protaminas.	Disruptores endocrinos. Contaminantes ambientales. Estilo de vida.
Efectos	Alteraciones genéticas (cualitativas/cuantitativas)	Aumento del daño del ADN espermático. Alteración función de las células de Sertoli. Alteración patrones de metilación. Alteración perfil genético del ARN. Disrupción rutas apoptóticas. Aumento susceptibilidad de los factores ambientales.
Resultados	Mala calidad seminal Bajas tasas de fecundación/ infertilidad. Herencia epigenética a la descendencia	Síndrome de disgenesia testicular. Anomalías en el recuento/función espermática

**Figura 5. Vulnerabilidad del aparato reproductor masculino.**

Actualmente, en la mayoría de centros de reproducción asistida, la única herramienta aceptada en la estimación del potencial reproductivo masculino es el análisis de semen según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cual se basa en el examen de características microscópicas y macroscópicas de los espermatozoides como son el volumen, la concentración, el porcentaje de formas móviles y la morfología. Los resultados de estas valoraciones, junto con una serie de trabajos relacionados con el diagnóstico de la infertilidad femenina, aportan a la pareja información realista sobre las probabilidades de concebir un hijo antes de ser considerados infértiles (Garrido et al. 2008). Dentro de las investigaciones desarrolladas en este campo, una situación bastante generalizada es la infertilidad masculina de origen desconocido, que implica la obtención de un seminograma normal en un varón infértil (Kumar et al. 2006). Esta definición está claramente orientada a poner de manifiesto la necesidad de contar con nuevos marcadores de infertilidad masculina que ayuden a predecir con seguridad y fiabilidad las probabilidades reales de gestación; sin embargo, se trata de un tema bastante

complicado ya que los factores y/o marcadores estudiados en uno sólo de los componentes de la pareja deben extrapolarse a los resultados derivados de la interacción entre el gameto masculino y el femenino. Los modelos experimentales empleados actualmente en la investigación de la infertilidad masculina presentan sesgos importantes ya que no suele tenerse en cuenta la influencia del factor femenino, lo cual conduce al establecimiento de relaciones falsas entre parámetros espermáticos y fertilidad masculina. Para resolver esta cuestión, los estudios se reorientan hacia un modelo de donación de ovocitos que permite analizar las características seminales a partir de la estandarización de la calidad ovocitaria (Meseguer et al. 2006).

Excepto las aneuploidías cromosómicas (Rubio et al. 2001) y las microdeleciones del cromosoma Y (Martinez et al. 2000), ambas relacionadas con alteraciones severas de la concentración espermática, se desconocen numerosos aspectos referentes a las características moleculares que puedan complementar la información derivada del análisis convencional de una muestra de semen. Dentro de esta nueva disciplina de investigación, se ha estudiado la influencia de la integridad del ADN espermático, el estrés oxidativo y otros marcadores que evidencian el origen multifactorial de las disfunciones espermáticas. La incorporación reciente de las “ómicas” a las técnicas de reproducción asistida ha permitido la identificación de perfiles complejos de la infertilidad masculina en relación a la expresión de RNA mensajero, proteínas y metabolitos (Garcia-Herrero et al. 2010a, Garcia-Herrero et al. 2010b).

La calidad seminal afecta no sólo a la fecundación sino también al posterior desarrollo embrionario; en relación a este tema, hay trabajos publicados que describen un fuerte efecto paterno sobre el desarrollo del embrión pre-implantatorio en estudios *in vitro* con blastocistos (Janny and Menezo 1994), retrasos en la fecundación y una pobre calidad embrionaria asociada a un descenso en la calidad seminal después de un ciclo de FIV (Ron-el et al. 1991), la implicación de los espermatozoides en la calidad embrionaria, incluso en etapas tempranas del desarrollo al mostrarse una correlación morfológica entre el espermatozoide y el embrión (Parinaud et al. 1993), peores tasas de gestación e implantación en situaciones de teratozoospermia severa y de oligoastenozoospermia (Grow et al. 1994) y se ha demostrado que los efectos sobre el desarrollo embrionario como consecuencia de una calidad seminal disminuida son patentes en el primer ciclo celular posterior a la fecundación (Agarwal et al. 2004).

Las contribuciones de los espermatozoides a la embriogénesis van más allá del hecho de ser responsables del 50% del resultado final de un ciclo de reproducción

asistida. Además del material genético, los factores espermáticos están implicados en procesos como la singamia nuclear, las divisiones embrionarias y la regulación epigenética, de modo que también es importante considerar los efectos potenciales de estas anomalías genéticas y epigenéticas no sólo sobre la infertilidad masculina sino también sobre los resultados de un tratamiento de reproducción (Garrido et al. 2008). Los últimos 25 años han supuesto un enorme avance en el desarrollo y aplicación de nuevas pruebas relacionadas con el perfil andrológico del varón. Las opciones de tratamiento para la infertilidad masculina incluyen un amplio catálogo de procedimientos urológicos, quirúrgicos y no quirúrgicos y de intervenciones médico-farmacológicas. La etiología de la infertilidad masculina se mantiene como un punto esencial de los estudios andrológicos y hasta que no se descifre, el resto es sólo una aproximación al problema.

#### **6.- Análisis de imagen. Aplicaciones en los programas de Reproducción asistida.**

La comprensión de la dinámica estructural de la maquinaria molecular y celular de los organismos vivos se ha convertido en uno de los principales objetivos de la investigación biológica en la era post-genómica. La relevancia económica y social de estos esfuerzos procede del hecho de que el conocimiento detallado de las relaciones espacio-temporales entre células en el contexto de unas funciones fisiológicas concretas puede emplearse en mejorar los resultados del tratamiento en cuestión; evidentemente, las secuencias de imágenes desempeñan un papel importante en la adquisición de este conocimiento. En las dos últimas décadas se han realizado enormes progresos en el desarrollo de herramientas informáticas asociadas a la microscopía y en la metodología de visualización de alta especificidad. Todos estos avances han conducido a un aumento explosivo en la adquisición de imágenes digitales para los estudios biológicos (Meijering et al. 2008).

Como se ha comentado previamente, la decisión acerca de qué embrión transferir se realiza de acuerdo a criterios morfológicos. Sin embargo, y a pesar de la gran cantidad de estudios publicados, no se ha alcanzado ningún consenso sobre cuál es el mejor sistema para describir la calidad embrionaria. Además, los sistemas actuales se basan fundamentalmente en el examen visual del embriólogo y por tanto están sujetos a cierto grado de variabilidad interobservador/intraobservador (Baxter Bendus et al. 2006). En estas circunstancias es inevitable que la decisión sobre qué embrión(es) es

seleccionado(s) para la transferencia se vea afectada con el correspondiente impacto directo sobre las probabilidades de éxito del ciclo.

Las técnicas de análisis de imagen añaden objetividad a los procesos de selección embrionaria, y en consecuencia, pueden mejorar los resultados de los tratamientos de Reproducción Asistida. Los sofisticados métodos informáticos son necesarios no sólo para aumentar la frecuencia de toma de imágenes sino para aportar un nivel de sensibilidad y objetividad que el observador humano no puede alcanzar; las herramientas actuales de análisis de imagen son cada vez más eficaces y robustas y generan resultados altamente reproducibles, los cuales son fundamentales a la hora de sostener la investigación biológica (Canaria and Lansford 2010). La valoración cuantitativa de los aspectos clave de la morfología embrionaria y el almacenamiento de los datos relacionados con estas determinaciones pueden usarse para mejorar nuestro conocimiento acerca del desarrollo embrionario temprano y conducir hacia sistemas de clasificación morfológica mucho más sofisticados. La nueva generación de sistemas que combinan incubador y microscopio ofrecen la posibilidad de describir las características morfológicas sin necesidad de sacar a los embriones de las condiciones óptimas de gas y temperatura que se encuentran dentro del incubador lo que reduce el estrés ambiental experimentado por el embrión y podría derivar en un mayor grado de competencia embrionaria.

El uso de la tecnología de análisis de imagen supone para el embriólogo el ahorro de una gran cantidad de tiempo y la disponibilidad de 24 horas de observación continua, mejora la eficacia de los ciclos de FIV, reduciendo los costes y aumentando la capacidad de los clínicos para la identificación del embrión con mejores perspectivas de viabilidad. Los avances en este campo científico pueden llegar a ser de vital importancia a la hora de implantar una política de transferencia de un único embrión y la consiguiente disminución en la proporción de gestaciones múltiples (Filho et al. 2010). Dada la cantidad de áreas de investigación abiertas en el procesamiento de imágenes el futuro es brillante; la comprensión de los mecanismos moleculares que permiten la vida es uno de los retos científicos más excitantes del siglo XXI y no parece muy arriesgado predecir que en la próxima década los datos de análisis de imagen asumirán el papel de los análisis de secuencias génicas como uno de los retos más importantes de la biología molecular y celular.

## **7.- Time-lapse y cinética de desarrollo embrionario.**

Una de las estrategias más desarrolladas en el establecimiento de nuevos marcadores de selección es la observación de la variabilidad en los tiempos de división; dada su facilidad de aplicación y su naturaleza no subjetiva, gran parte de la investigación reciente se centra en explorar su utilidad como marcadores de competencia embrionaria (Basile, N, Meseguer, M 2012).

Cummings (Cummins et al. 1986) es el primero en confirmar la eficacia de combinar una clasificación subjetiva de la morfología embrionaria con la tasa de desarrollo en cultivo para predecir un posible embarazo. En la búsqueda de nuevos marcadores para uso clínico, la relación entre la cinética de división embrionaria y la posterior tasa de desarrollo a blastocisto se convierte en una alternativa válida y en un método de aproximación temprana para la selección de embriones con mayor potencial de implantación.

Los mecanismos subyacentes al vínculo establecido entre primera división y desarrollo embrionario no se han descrito pero sí se han propuesto varias explicaciones como que la transición desde un ovocito fecundado hasta un embrión de 2-células depende de una secuencia altamente regulada de procesos celulares, la fidelidad en la replicación del DNA, el grado de madurez del ovocito y un conjunto de características intrínsecas a los gametos (Fenwick et al. 2002). Uno de los sucesos celulares más importantes es la mitosis que implica la división de una célula en dos células hijas; en un principio, los estudios sobre la mitosis se basaban en las observaciones realizadas al microscopio óptico que revelan la estructura de las células mitóticas y en particular la organización del huso mitótico, pero estas observaciones tienen un carácter marcadamente estático, por lo que dejan de apreciarse sucesos clave de la mitosis que sólo ocurren de forma transitoria. La incorporación de la tecnología de análisis de imagen permite fijar la duración de las divisiones celulares; las medidas directas de la división celular mediante time-lapse garantizan la confirmación de las observaciones críticas realizadas previamente (Rieder and Khodjakov 2003). Por último, el time-lapse resulta especialmente útil en Embriología para el estudio de la fragmentación, cuya aparición es común en el desarrollo embrionario temprano. En los ciclos de FIV resulta complicado distinguir entre fragmentación aguda o progresiva y la reabsorción de fragmentos si se evalúan los embriones una vez al día; es aquí donde destaca la importancia del análisis de imagen ya que los resultados de los distintos estudios realizados hasta ahora (Lemmen et al. 2008, Pribenszky et al. 2010) aportan nuevas

visiones de la morfodinámica de la fragmentación que demuestran que este fenómeno no es estacionario.

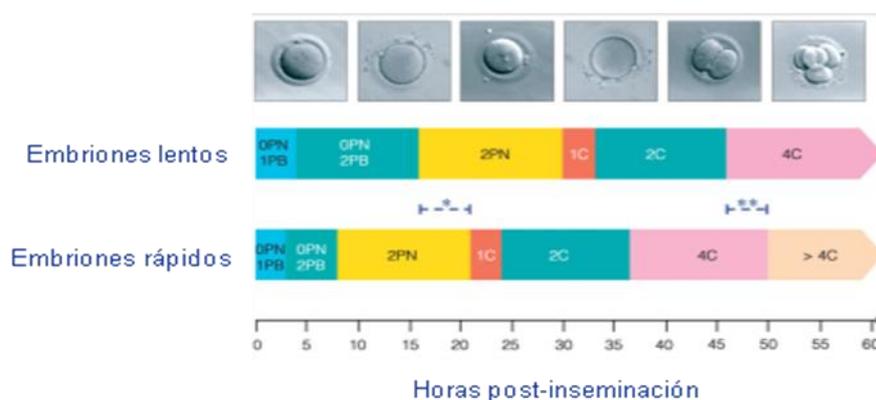
Se sabe que el tiempo transcurrido entre la fecundación y la primera división es un parámetro objetivo y fácil de determinar con cierto valor predictivo de la viabilidad embrionaria; a pesar de que la relación entre el estadio de desarrollo y número de células se conoce desde hace tiempo, la valoración de la división temprana y su importancia en los procedimientos de selección embrionaria es relativamente reciente. El fenómeno de la división temprana y su impacto sobre las tasas de gestación es estudiado por primera vez por Edwards (Edwards et al. 1984); a partir de este momento se publican numerosos estudios en los que el punto de partida es la idea de que la transferencia de embriones con división temprana mejora las tasas de gestación e implantación.

En un primer momento, se demuestra que la transferencia de embriones que habían completado su primera división 25 horas post-inseminación/microinyección (hpi) después de un FIV convencional, mejoraban significativamente las tasas de gestación e implantación con respecto a aquellos embriones que todavía no se habían dividido (Shoukir et al. 1997). Posteriormente, se obtienen resultados similares pero en este caso se transfieren embriones “división temprana” procedentes de ciclos de ICSI, donde los tiempos de fecundación están más definidos (Sakkas et al. 1998); ambos estudios demuestran la utilidad de la “división temprana” como indicador de la viabilidad embrionaria y como factor pronóstico de la gestación.

Sin embargo, la mayoría de estudios comparan los resultados de ciclos donde se transfiere al menos un embrión con división temprana con los datos de ciclos donde sólo se transfieren embriones “no división temprana” de modo que resulta bastante complicado saber qué embrión ha implantado. Para resolver esta cuestión, algunos grupos de investigación se centran en las transferencias puras, donde sólo se transfieren embriones de una sola clase (Salumets et al. 2003, Van Montfoort et al. 2004); estos trabajos demuestran claramente el aumento en las tasas de gestación e implantación a favor de los embriones con división temprana. A partir de los resultados que demuestran la asociación entre división temprana y tasas de gestación e implantación se intenta establecer la misma correlación entre esta variable temporal y las posibilidades de desarrollo a blastocisto (Fenwick et al. 2002).

Por lo tanto, podemos asumir que el estudio de la cinética de desarrollo ayuda a discriminar entre embriones de similares características potenciando las diferencias

existentes entre ellos. Sin embargo, por las propias particularidades derivadas de las condiciones de cultivo, el seguimiento del desarrollo embrionario es intermitente por lo que podemos acabar perdiendo precisión en los resultados relacionados con las divisiones embrionarias; la fijación arbitraria de los tiempos de observación del desarrollo embrionario puede derivar en cierta confusión a la hora de categorizar el estadio y la cronología del desarrollo. Con la introducción del time-lapse y del análisis digitalizado de las imágenes, no solo obtenemos una visión completa del desarrollo embrionario sino que podemos determinar con total precisión los tiempos de división embrionaria y cualquier fenómeno intracelular circundante a la fecundación.



**Figura 6. Comparativa de la cinética de desarrollo (Fancsovits, 2006)**

Los últimos trabajos relacionados con la cronología del desarrollo embrionario pretenden correlacionar los patrones de división con la expresión génica (Wong et al. 2010). La posibilidad de captar imágenes a tiempo real revela los defectos primarios y las consecuencias secundarias de los distintos fenotipos, al mismo tiempo que permiten una interpretación más precisa de la función de los genes identificados. Mediante una comparación cuidadosa de las características de la división celular con las listas emergentes de genes participantes en el ciclo celular, será posible predecir no sólo qué embriones tienen mayor potencial para derivar en una gestación sino también desarrollar terapias para embriones tempranos que equilibrarán las divisiones celulares con el contenido cromosómico favoreciendo la descendencia (Kiessling 2010).

Recientemente, y gracias al análisis de la cinética embrionaria mediante time-lapse, se ha podido establecer un patrón cronológico del desarrollo embrionario cuyo resultado puede aplicarse como marcador pronóstico del potencial de implantación. Combinando criterios morfológicos con criterios cinéticos, se ha descrito una

correlación entre el tiempo que invierte el embrión para alcanzar cada una de las variables de tiempo consideradas y su posterior potencial de implantación (Meseguer et al. 2011) identificándose un rango óptimo de tiempo para cada división embrionaria. Se observan importantes diferencias en la evolución temporal del desarrollo embrionario entre los embriones que implantan y los que no. Además, se revela que no sólo son importantes los puntos exactos de división celular, sino también el tiempo transcurrido entre los sucesivos ciclos celulares. Tomando la tasa de implantación como variable principal del trabajo, no sólo se demuestra la competencia del embrión para desarrollarse a blastocisto sino también de los acontecimientos posteriores como el “hatching” de modo que en última instancia, la integración de parámetros morfológicos con variables cinéticas nos ayuda a detectar los factores más tardíos del desarrollo embrionario que ayudan a predecir la competencia embrionaria.

Se aporta por primera vez información novedosa acerca de los parámetros morfocinéticos del desarrollo que determinan que un embrión implante o no. Con este trabajo se demuestra la incorporación del análisis de imagen a la rutina diaria de un laboratorio de Embriología. La descripción de rangos de tiempo óptimos asociados en combinación con unas categorías morfológicas concretas supone el primer intento de desarrollar un modelo de selección embrionaria incorporando la información derivada del uso de un sistema de análisis de imagen.

# **OBJETIVOS**

Los sistemas de análisis de imagen han supuesto un avance considerable en la comprensión de los procesos implicados en la fecundación y en el desarrollo embrionario temprano. La oportunidad de monitorizar los patrones dinámicos de desarrollo mediante la aplicación de esta tecnología aporta información adicional realmente útil a los criterios de selección embrionaria ya que permite vincular la incidencia de un suceso en un momento determinado con la capacidad de desarrollo y el posterior potencial de implantación.

Ante estas consideraciones, los objetivos de esta tesis son:

1.- Validar clínicamente un sistema de análisis de imagen en tratamientos de reproducción asistida mediante el análisis comparativo de resultados clínicos en un programa de donación de ovocitos entre el Embryoscope (sistema de time-lapse) y un incubador convencional.

2.- Examinar la influencia de la cinética embrionaria sobre el desarrollo a blastocisto y la posterior calidad morfológica del mismo en un programa de donación de ovocitos.

3.- Evaluar el impacto de la calidad seminal y de las técnicas de fecundación *in vitro* sobre la cinética de desarrollo embrionario en un modelo de donación de ovocitos.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

Este trabajo consta de tres partes perfectamente diferenciadas en las que se plantean distintos objetivos de estudio. Todos los análisis se realizan en embriones procedentes de ciclos de donación de ovocitos y en conjunto, se registra el desarrollo embrionario de 1900 embriones.

Al principio de esta sección se describirán los materiales y métodos comunes a todos los estudios realizados para luego pasar a referir con detalle las variables y grupos de estudio de cada uno de ellos.

## **1.- Donación de ovocitos.**

### **1.1.- Selección de las donantes.**

Las donantes deben tener una edad comprendida entre los 18-35 años; deben gozar de un buen estado psicofísico y carecer de antecedentes personales o familiares de enfermedades hereditarias, esquizofrenia, depresión, epilepsia, alcoholismo, etc.

Además, deben presentar serologías negativas para sífilis, toxoplasma, rubéola, gonorrea, *Chlamydia*, hepatitis B, hepatitis C y VIH determinados antes de iniciarse la estimulación; cariotipo normal; máxima similitud fenotípica e inmunológica (grupo sanguíneo y Rh) con la pareja receptora y su entorno familiar.

Todas las donantes mostraban ciclos menstruales de 23-24 días de duración, un índice de masa corporal (IMC) entre 18-28 Kg/m<sup>2</sup>, ausencia de tratamiento endocrino incluyendo la administración de gonadotropinas y/o algún tipo de anticonceptivo oral en los 3 meses previos al estudio, útero y ovarios ecográficamente normales y un recuento de folículos antrales de 6 folículos por ovario el primer día de la estimulación con gonadotropinas después de la desensibilización hipofisaria con el análogo de la GnRH.

Las donantes de ovocitos deberán firmar un consentimiento informado que les será entregado por el centro y en el que figuraran los fines y consecuencias del acto, así como los procedimientos y estudios a los que se verá sometida la donante.

#### **1.1.1.- Estimulación ovárica de las donantes.**

En los protocolos largos con agonistas se indujo la supresión hipofisaria con el agonista de la GnRH desde el día 21-22 del ciclo anterior; se administró 1 miligramo diario de acetato de leuprorelina (Procrin, Abbott, Madrid, España) por vía subcutánea. Esta dosis se redujo a la mitad en el momento en el que se inició la estimulación con gonadotropinas. Una vez que se ha comprobó la supresión hipofisaria se inició el

tratamiento con gonadotropinas en el segundo-tercer día de ciclo. La dosis inicial varió entre 150-300 UI de FSH recombinante (Gonal-F®; Serono, Madrid, España; Puregon®; MSD, Madrid, España) o urinaria (Fostipur®; Angelini, España) y/o de HMG (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, España; HMG-Lepori®, Angelini, España) durante 5 días en función de la edad, el índice de masa corporal y la respuesta obtenida en ciclos previos; tras el primer control ecográfico, se puede modificar la dosis en función de la respuesta ovárica. Una vez que se obtuvo una respuesta folicular adecuada y ecográficamente se detectaron 3 ó más folículos de 18 mm de diámetro, se indujo la ovulación con hCG (Ovitrelle®, 250 µg; Merck-Serono, Madrid, España).

Por otra parte, en los protocolos con antagonistas, el segundo-tercer día de ciclo, se inició tratamiento con gonadotropinas con una dosis inicial de FSH recombinante (Gonal-F®; Serono, Madrid, España; Puregon®; MSD, Madrid, España), FSH urinaria (Fostipur®; Angelini, España) y/o de HMG (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, España; HMG-Lepori®, Angelini, España ) que varió entre 150-300 UI; en el momento en el que ecográficamente se observó un folículo mayor de 14 mm de diámetro se introdujo el antagonista a dosis de 0.25 mg/día (Cetrotide®; Merck-Serono, Madrid, España; Orgalutran®; MSD, Barcelona, España). Por último, se procedió a desencadenar la ovulación con un agonista de la GnRH en una única dosis de 0.2 ml (Decapeptyl®; Ipsen Pharma, Barcelona, España) cuando se observa una respuesta folicular adecuada (3 ó más folículos de 18 mm de diámetro).

La punción ovárica se programó 36 horas después de la inducción de la ovulación y se realizó FIV o ICSI cuando se consideró necesario.

## **1.2-Receptoras.**

La edad de las pacientes oscila entre 32-45 años. Los criterios de exclusión en una receptora potencial de ovocitos abarcan patologías como la endometriosis, hidrosalpinx, obesidad (IMC>30), patologías uterinas (miomas, adenomiomas, endrocrinopatías, trombofilias, anomalías uterinas congénitas y/o adquiridas), abortos recurrentes y edad de la paciente superior a 45 años.

A las receptoras con función ovárica se les administra un análogo de la GnRH para suprimir la función hipofisaria. El día que la donante inicia el ciclo, la receptora comienza a tomar estradiol oral y posteriormente se recomienda la administración de progesterona micronizada por vía vaginal como soporte de fase lútea.

### **1.2.1-Preparación endometrial de las receptoras.**

En el caso de que las receptoras presenten función ovárica, se emplean agonistas/antagonistas de la GnRH con el fin de neutralizar la producción endógena de gonadotropinas y evitar su interferencia en los ciclos de donación de ovocitos.

Se administró un agonista de depósito (Decapeptyl® 3.75; Ipsen Pharma, Barcelona, España) en la mitad de la fase lútea del ciclo anterior; tras la menstruación se inició la administración de valerianato de estradiol (Progynova®; Schering España, Madrid, España) a dosis crecientes: 2 mg los primeros 8 días de tratamiento, 4 mg los siguientes 3 días y 6 mg desde aproximadamente el día 12 de ciclo hasta el momento de realizar el test de gestación. La inhibición hipofisaria también puede lograrse mediante la administración de un antagonista de la GnRH; durante el ciclo previo se administró un anticonceptivo, se realizó una ecografía para comprobar el reposo ovárico y se introdujo el antagonista desde el primer día de regla y durante 7 días por vía subcutánea (0.25 mg diarios de Cetrotide® (Merck-Serono, Madrid, España) junto con un suplemento de carácter estrogénico desde el tercer día de la menstruación (Evopad® 75, Janssen-Cilag, Madrid, España) a razón de dos parches cada tres días.

Para las receptoras sin función ovárica se aplicó el protocolo descrito anteriormente excepto el uso de análogos de la GnRH para la inhibición hipofisaria.

### **2.-Punción ovárica y recuperación de ovocitos.**

Se realizó aspiración folicular guiada ecográficamente en condiciones de asepsia entre 35-36 horas después de haber inducido la ovulación. Normalmente se emplea anestesia general para conseguir un estado de sedación en la que se utilizan los siguientes fármacos: propofol (2-3 mg/kg), atropina 0.5 mg, fentanilo 0.75 mg como analgésico intravenoso; se administran analgésicos intravenosos una vez que ha finalizado la punción.

Tras lavado vaginal con suero fisiológico, se anestesió a la paciente y mediante una aguja de punción ovárica 18G (Kitazato Medical, Tokio, Japón) se puncionaron los folículos uno a uno aspirando el contenido en tubos específicos para la recogida del líquido folicular (Falcon 2057, Becton Dickinson, Reino Unido).

El contenido del líquido folicular se trasladó al laboratorio de fecundación anexo al quirófano para la recuperación de los complejos cúmulo-corona-ovocito, los cuales fueron lavados en HEPES (Global, Canadá) y se cultivaron individualmente en gotas de

50-100  $\mu$ l en FERT (Global, Canadá) en unas condiciones de concentración de CO<sub>2</sub> y de temperaturas de 6.0% y 37.0 °C respectivamente durante aproximadamente 4 horas. Posteriormente, se decumularon los ovocitos en una solución de de hialuronidasa en proporción 1:1 con el medio de cultivo.

### **3.- Obtención y procesamiento de las muestras de semen.**

Obtención de la muestra por masturbación y análisis según criterios dictados por la Organización Mundial de la Salud.

La técnica adecuada para el posterior procesamiento del semen en un tratamiento de reproducción asistida depende de las características de la propia muestra. Para los ciclos de ICSI con muestras frescas, los espermatozoides móviles se recuperaron mediante la técnica de “swim up” mientras que para muestras congeladas, tanto para FIV como para ICSI, y para ciclos de FIV con muestras frescas se aplicó un protocolo de centrifugación en gradientes de densidad.

El “swim up” parte de la idea de que solo los espermatozoides móviles son capaces de ascender al sobrenadante (Harris et al. 1981), mientras que los gradientes de densidad se basan en las probabilidades que tienen los espermatozoides de atravesar unos gradientes del 90% y 45% para acceder al fondo del tubo de ensayo; esta última técnica, también actúa como filtro del plasma seminal, células redondas, detritus y espermatozoides de movilidad no progresiva o inmóviles (Gorus and Pipeleers 1981).

### **4.- Técnicas de fecundación *in vitro*.**

#### **4.1-Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).**

Se decumularon los ovocitos para valorar su estado de maduración y permitir una inyección posterior más precisa. La eliminación de las células de la corona y el cúmulo consta de un conjunto de métodos enzimáticos y mecánicos que incluyen la inmersión del ovocito en una solución 1:1 con hialuronidasa durante 20-30 segundos y la aspiración posterior del mismo a través de la pipeta.

La placa de microinyección contenía microgotas individuales para cada uno de los ovocitos a las que se le añadieron varias gotas de una suspensión de PVP (polivinil-pirrolidona) y por último, 1-3  $\mu$ l del capacitado espermático. El PVP disminuye la movilidad espermática facilitando su manipulación y captura, ayuda al control del fluido en la aguja de inyección y evita que los espermatozoides se queden pegados a la pipeta.

Para el proceso de microinyección se empleó un microscopio invertido con óptica Hoffman (Olympus) con pletina calefactada y un equipo de micromanipulación; con la pipeta de sujeción, se mantuvo fijo al ovocito mientras que con la pipeta de inyección se aspiraron espermatozoides morfológicamente normales que se inyectaron en el ovocito teniendo en cuenta la posición del corpúsculo polar para evitar dañar el huso meiótico (Albert et al. 2008)

#### **4.2.-Fecundación *in vitro* (FIV).**

Los ovocitos en cultivo y dispuestos en gotas individuales se co-incubaron con una dilución de espermatozoides ajustada a una concentración de 60000 espermatozoides/ml

#### **5.- Análisis de la fecundación y evaluación embrionaria.**

El análisis estándar incluyó la comprobación de la fecundación 16-18 horas después de la inseminación/microinyección (hpi), siendo el aspecto más importante la presencia de dos pronúcleos y dos corpúsculos polares.

Se realizó un seguimiento del desarrollo embrionario en día 2 y día 3 en el que se tuvo en cuenta el número de células, el porcentaje y tipo de fragmentación, la simetría embrionaria y la multinucleación. Según las características de cada embrión, se obtuvo el siguiente sistema de clasificación (Prados et al. 2008):

- **embriones óptimos:** embriones de 4-células simétricas con menos del 10% de fragmentación y no multinucleados en día 2; embriones de 7-8 células simétricas y menos del 10% fragmentación en día 3.

- **embriones sub-óptimos:** embriones de 2, 3 ó 5-células en día 2 y embriones de menos de 6-células o más de 9-células en día 3. Además, estos embriones suelen estar desorganizados o presentar cierta asimetría, incluyen defectos en la zona pelúcida, tienen 10-30% fragmentación y pequeñas vacuolas.

- **embriones anormales:** resumen de las características anteriores, embriones bloqueados, 6-células o más en día 2 y embriones de más de 12- células en día 3, fragmentación de tipo IV o superior al 35%, superficie embrionaria vacuolada, multinucleación en día 2, blastómeras degeneradas y/o con el citoplasma contraído y presencia de una célula dominante que supone más del 50% del tamaño total del embrión.

En día 5 se evaluó la morfología del blastocisto según las características de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TE). La masa celular interna se clasificó como tipo A cuando es compacta, con muchas células y muy bien definida; de tipo B si tiene varias células agrupadas y un aspecto deslavazado; de tipo C cuando tiene muy pocas células; y de tipo D si está degenerada o no existe. En cuanto al trofoectodermo, éste puede ser de tipo A si está completo y formado por muchas células; de tipo B si está incompleto y presenta alguna zona lineal; de tipo C si tiene pocas células; y de tipo D si presenta células degeneradas (Gardner et al. 2002)

## **6.- Transferencia embrionaria.**

Se trata del último paso en un ciclo de reproducción asistida. Suele realizarse vía vaginal y valora el día de desarrollo y cuantos embriones se van a transferir, dependiendo éste último de la edad de la paciente, de su historia clínica y de la calidad de la cohorte embrionaria.

La transferencia se llevó a cabo en condiciones de asepsia y es importante que el quirófano esté cerca del laboratorio de fecundación para garantizar unas buenas condiciones. Se depositaron los embriones a través de la vagina, canalizando el cérvix uterino con una cánula blanda Wallace (SIMS Portex Limited, Reino Unido) hasta llegar al tercio superior de la cavidad endometrial, se descargaron y se comprobó que no habían quedado retenidos en ella.

## **7.- Sistema de análisis de imagen. El Embryoscope.**

Se trata de un dispositivo que incluye una cámara CCD monocroma, un dispositivo Leica 20x con un objetivo de contraste de óptica Hoffmann LWD 0.40, iluminación de tipo LED de 635 nm con una exposición diaria a la luz inferior a los 50 segundos, hecho que garantiza un riesgo prácticamente nulo de foto-oxidación embrionaria.

La principal ventaja de este sistema de análisis de imagen es la combinación de unas condiciones de cultivo controladas y seguras con la monitorización continua del desarrollo embrionario. Con el Embryoscope (Unisense Fertilitech, Aarhus, Dinamarca) es posible captar imágenes de alta calidad cada 20 minutos en varios planos focales y permite la incubación simultánea de hasta 72 embriones distribuidos en 6 placas con una capacidad de 12 embriones/placa. Funciona como un incubador clásico pero con la

ventaja añadida de registrar en tiempo real un conjunto de parámetros fundamentales del desarrollo embrionario sin necesidad de manipular a los embriones ni alterar sus condiciones de cultivo

### **7.1.- Preparación placas del Embryoscope.**

El Embryoscope precisa de unas placas especiales denominadas Embryoslides<sup>TM</sup> cuyo diseño incluye 12 pocillos individualizados y numerados con una depresión central de 250  $\mu\text{m}$  o micropocillo donde se aloja el embrión y que coincide con la posición de la cámara del time-lapse. La numeración asignada a cada embrión facilitó la monitorización embrionaria y la manipulación fuera del incubador.

Al igual que en los incubadores convencionales, las placas para el Embryoscope se prepararon con un día de antelación para gasear y equilibrar correctamente los medios. Se aplicó el siguiente protocolo:

1.- lavado de la placa con 1.4 ml del mismo medio de cultivo que empleamos posteriormente para el cultivo embrionario. Es fundamental la eliminación de las burbujas que puedan formarse ya que no solo impiden que el embrión se aloje correctamente en el micropocillo central sino que también dificulta la toma de imágenes.

2.- eliminación del medio de la placa excepto la cantidad residual que queda en el micropocillo; posteriormente se llenaron con 25  $\mu\text{l}$  del mismo medio de cultivo.

3.- adición de 1.2 ml de aceite mineral para minimizar problemas de evaporación.

El medio de cultivo se cambia periódicamente en día 1, día 3 y día 5 de desarrollo.

### **7.2.- Software integrado en el Embryoscope: el EmbryoViewer.**

El soporte informático adjunto al Embryoscope ayuda al embriólogo en la selección de embriones de mejor calidad. En este punto, es importante tener en cuenta que el programa informático no realiza diagnósticos sino que únicamente registra todos los datos y variables derivados del Embryoscope.

Las imágenes se analizan en tiempo real; el EmbryoViewer ofrece un registro gráfico que refleja la cantidad de movimiento que se ha producido entre dos imágenes consecutivas de la filmación y que se denomina actividad blastomérica. Este parámetro

se genera de forma automática y señala los momentos en los que se observa movimiento durante el desarrollo embrionario y que normalmente coincide con las divisiones del embrión.

Además, cuenta con un conjunto de aplicaciones que permite el registro de datos para cada embrión, controla condiciones de cultivo relacionadas con el CO<sub>2</sub> y la temperatura y permite exportar los datos para un posterior análisis estadístico. El usuario puede acceder a una compleja base de datos donde han quedado registradas todas las anotaciones realizadas previamente y que pertenecen a campos tan diversos como las características morfológicas y el desarrollo embrionario, historia clínica de la paciente, estimulación ovárica empleada y resultados globales de los ciclos.

### 7.3 El Embryoscope en el laboratorio de FIV.

Con el objetivo de estudiar el desarrollo embrionario los embriones derivados de ICSI se introdujeron en el Embryoscope el mismo día de la fecundación (día 0) o el día después (día +1) en el caso de embriones procedentes de ciclos de FIV, y se mantuvieron en el dispositivo de análisis de imagen hasta la transferencia embrionaria (día 3 ó día 5) según el tipo de cultivo y la indicación del tratamiento.

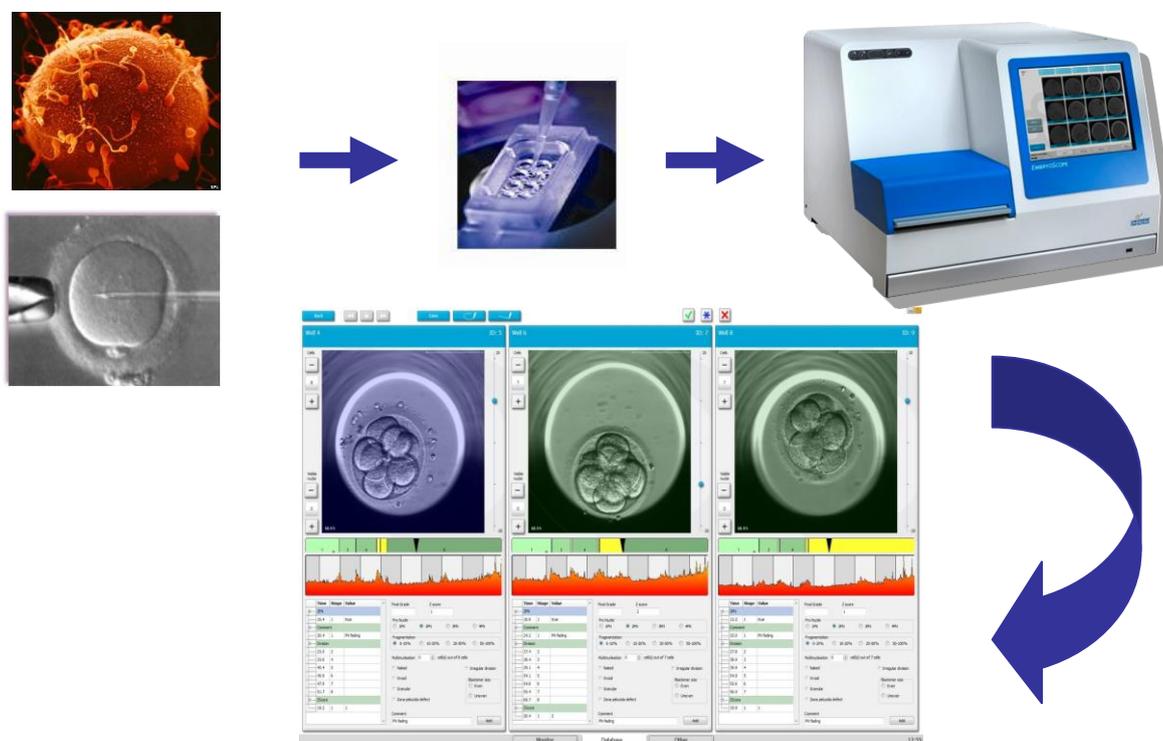


Figura 7. El Embryoscope en el laboratorio de FIV.

Las series de imágenes se analizaron en tiempo real con el EmbryoViewer, el cual ofreció una gráfica que reflejaba la cantidad de movimiento producido entre dos imágenes consecutivas de la filmación; este parámetro se denominó actividad blastomérica, se generó de forma automática e indicaba los puntos en los que se producía movimiento durante el desarrollo y que normalmente coincidía con las divisiones embrionarias.

#### 7.4. Variables de estudio en el sistema de análisis de imagen.

Las series de imágenes se analizaron automáticamente en tiempo real mediante el software incorporado en el Embryoscope.

- **actividad blastomérica**: representación gráfica que refleja la cantidad de movimiento entre dos imágenes consecutivas captadas por el sistema de time-lapse. Los picos registrados durante este periodo indican el momento de las divisiones celulares.

-**t0 (h)**: tiempo de microinyección.

-**dpn (h)**: desaparición de pronúcleos.

-**t2 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 2-células.

-**t3 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 3-células.

-**t4 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 4-células.

-**t5 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 5-células.

-**t6 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 6-células.

-**t7 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 7-células.

-**t8 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 8-células.

-**t9 (h)**: tiempo de la división hacia un embrión de 9-células.

-**M (h)**: tiempo de compactación: masa esférica maciza en la que no se distinguen los contornos celulares y que representa una fase intermedia entre el cigoto y el blastocisto.

-**B (h)**: tiempo de aparición de la cavidad blastocélica: en una masa esférica de células es posible distinguir una cavidad central llena de líquido.

-**BE (h)**: tiempo que se precisa para alcanzar la etapa de blastocisto expandido.

A partir de estos resultados se obtuvieron una serie de valores derivados relacionados con la duración de los ciclos celulares:

- **cc2 (h)** =  $(t_3-t_2)$ = duración del segundo ciclo celular; periodo de tiempo en el que observamos un embrión de 2-células.

- **cc3 (h)** =  $(t_5-t_3)$ = tiempo que tarda el embrión en la transición de 3-células a 5-células.

- **s2 (h)** =  $(t_4-t_3)$  = sincronía en la transición desde un embrión de 3-células a un embrión de 4-células.

- **s3 (h)** =  $(t_8-t_5)$ = tiempo que tarda el embrión en pasar de un estadio de 5-células a uno de 8-células.

- **(t4-t2) (h)**: tiempo medio de la segunda división embrionaria.

- **(t8-t4) (h)**: tiempo medio de la tercera división embrionaria.

Con el propósito de buscar marcadores cinéticos de desarrollo a blastocisto, se calculó el porcentaje de embriones incluidos en unos rangos de tiempo óptimos definidos previamente (Meseguer et al. 2011). Estos intervalos se definieron de la siguiente manera:  $t_2$ : 24.6-28.2 h;  $t_3$ : 35.2-40.5 h;  $t_5$ : 48.8-56.6 h  $s_2$ : <0.75 h;  $cc_2$ : <12h. Los embriones cuyos tiempos de división se encontraron dentro de estos intervalos tienen al menos un 10% más de probabilidades de implantar que aquellos embriones cuya cinética de desarrollo está fuera de rango. Se definieron como embriones óptimos a aquellos embriones cuyos tiempos de división embrionaria se encuentran dentro de estos rangos óptimos de tiempo y que tienen, al menos, un 10% más de potencial de implantación.

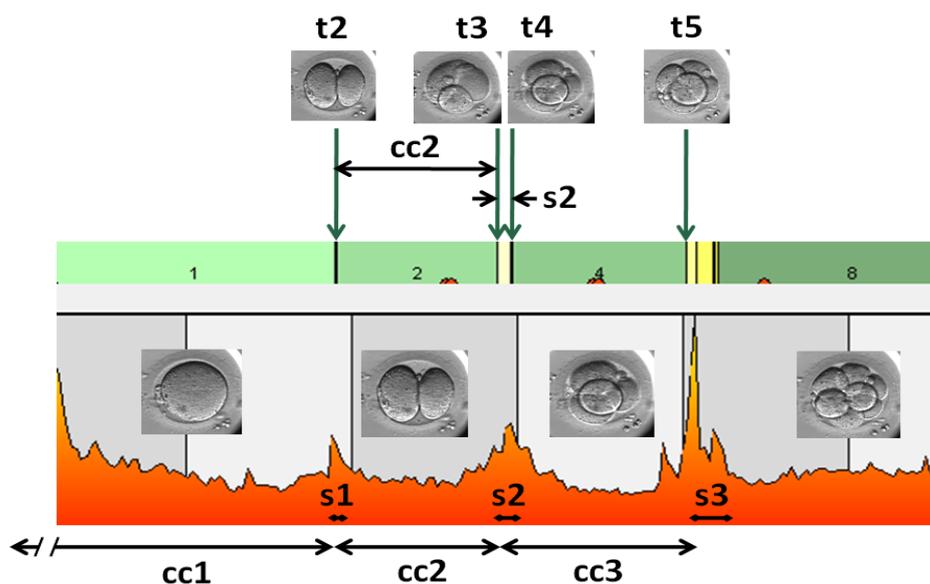


Figura 8. Intervalos de tiempo determinados mediante tecnología de time-lapse

### 7.5.- Categorías morfocinéticas.

La clasificación jerárquica propuesta por Meseguer comenzó con un examen morfológico de todos los embriones para descartar a aquéllos que claramente no son viables; estos embriones no se tuvieron en cuenta en el momento de la transferencia embrionaria y se descartaron (categoría F). En el siguiente paso, se excluyeron los embriones que cumplían con alguno de los siguientes criterios de exclusión: embriones asimétricos en el estadio de 2-células, división directa de cigoto a embrión de 3-células y multinucleación en 4-células (categoría E).

Las categorías posteriores siguieron una estricta jerarquía basada en las variables binarias de tiempo  $t_5$ ,  $s_2$  y  $cc_2$ . En primer lugar, si los valores de  $t_5$  estaban incluidos dentro del intervalo óptimo (48.8-56.6 horas), el embrión se clasificó como A o B; si el valor de  $t_5$  se localizaba fuera del rango óptimo, el embrión se definió como C o D.

Para el caso de  $s_2$ , si el tiempo de división estaba dentro del valor adecuado ( $\leq 0.76$  horas), el embrión era A o C dependiendo del valor de  $t_5$ ; de forma parecida, si el valor de  $s_2$  estaba fuera del rango óptimo, el embrión se clasificó como B o D según  $t_5$ . Finalmente, el embrión fue categorizado con un valor adicional positivo (+) si  $cc_2 \leq 11.9$  horas (A+/B+/C+/D+) o negativo (-) si  $cc_2 > 11.9$  horas (A-/B-/C-/D-).

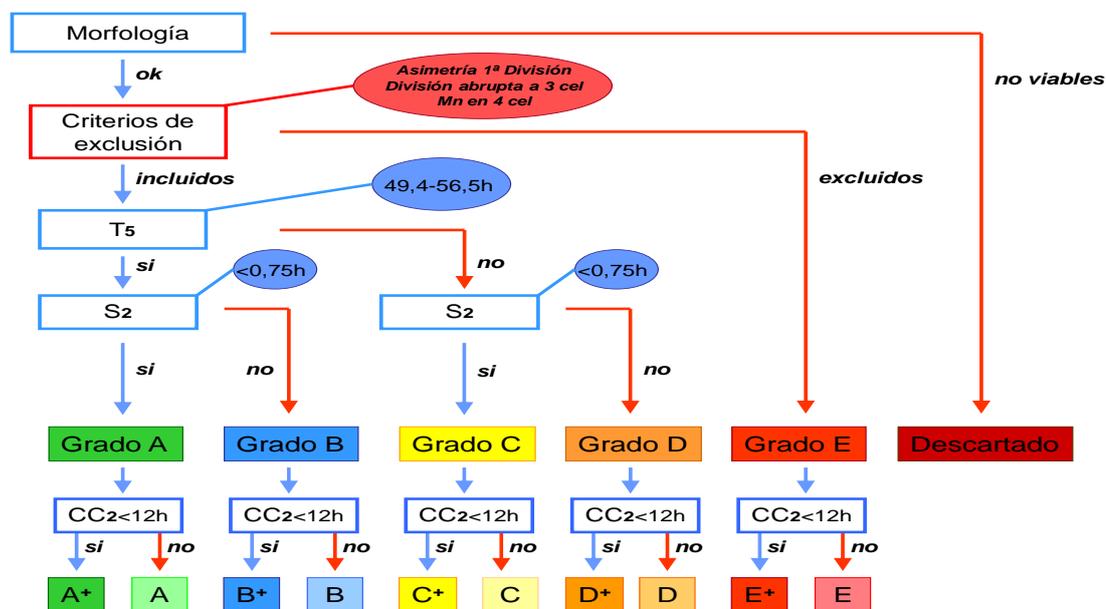


Figura 9. Criterios de clasificación embrionaria.

## 8.- Estudios

### 8.1.- Estudio de la validación clínica de un sistema de análisis de imagen en tratamientos de reproducción asistida.

Se analizaron 478 embriones procedentes de 60 parejas incluidas en un programa de donación de ovocitos. Los cigotos se distribuyeron aleatoria y proporcionalmente entre el Embryoscope (n= 238 cigotos) y el incubador convencional Heracell (n=240 cigotos).

Para garantizar que las condiciones de cultivo son comparables entre los dos tipos de incubador se comprobaron diariamente la temperatura y la concentración de CO<sub>2</sub> mediante sensores externos para confirmar que se encuentran dentro de los valores pre-fijados (6% CO<sub>2</sub>; 37.0 °C).

La transferencia embrionaria se realizó en día 3- día 5 de desarrollo dependiendo de la evolución embrionaria. Los criterios de selección embrionaria se basaron únicamente en la valoración morfológica en los mismos periodos de tiempo (44 y 68 horas después de la fecundación) en los dos grupos de estudio, de modo que la información adicional que pudiéramos obtener del sistema de análisis de imagen no se empleó para la selección embrionaria.

#### 8.1.1.-Variables de estudio.

**-Desarrollo embrionario en un sistema de cultivo convencional.** Evaluación íntegra del desarrollo embrionario en un incubador clásico

**-Desarrollo embrionario en un sistema de cultivo con un sistema integrado de análisis de imagen.** Análisis completo del desarrollo embrionario en un incubador con un sistema integrado de monitorización de la evolución embrionaria.

**-Calidad embrionaria en día 3:** análisis comparativo de la calidad embrionaria en día 3 de desarrollo entre los dos grupos de estudio según los criterios de evaluación definidos anteriormente.

**-Tasa de desarrollo a blastocisto:** análisis comparativo del porcentaje de embriones que alcanza el estadio de blastocisto entre los dos sistemas de cultivo analizados.

**-Tasa de viabilidad embrionaria:** análisis comparativo del porcentaje de embriones que han sido transferidos, congelados y/o descartados en cada uno de los sistemas de cultivo evaluados.

**-Transferencia día 3 vs día 5:** se comparó el porcentaje de transferencias embrionarias en cada uno de los días estudiados entre los dos tipos de incubador.

**-Tasa de gestación clínica:** se comparó la proporción de latidos positivos en relación al número total de ciclos con transferencia entre los dos grupos de estudio. Se calculó la tasa de gestación clínica para transferencias homogéneas del Embryoscope y del incubador Heracell y para transferencias mixtas en las que un embrión procede del Embryoscope y otro embrión del incubador convencional.

**-Tasa de implantación:** se comparó el número de sacos gestacionales en relación al total de embriones transferidos entre las dos variables de estudio. Para el cálculo de esta variable sólo se tuvieron en cuenta las transferencias puras en cada uno de los grupos de estudio.

### **8.1.2.- Análisis de datos**

Para calcular el tamaño de muestra necesario que confirme la ausencia de diferencias entre los dos grupos de estudio (no-inferioridad) se consideró la tasa de desarrollo a blastocisto como variable principal. Este cálculo se basó en la comparación de dos proporciones binomiales (porcentaje de blastocistos) que asumen la hipótesis de no-inferioridad entre el Embryoscope y el incubador convencional, la cual está basada en un límite pre-definido de no-inferioridad de 0.66 para la odds-ratio (OR) del Embryoscope versus incubador convencional (correspondiente a los límites de -9 a 10% en la diferencia en la escala de proporción para una tasa global de desarrollo a blastocisto del 50-60%). El criterio de no-inferioridad se basó en nuestros propios datos y las diferencias obtenidas se consideran clínicamente relevantes (Cobo et al. 2010).

Los resultados obtenidos en cada sistema de cultivo se compararon aplicando un test de Chi-cuadrado con un nivel de significación de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó mediante el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL).



**Figura 10. Distribución aleatoria de los embriones en cada tipo de incubador**

## **8.2. Examen de la influencia de la cinética embrionaria sobre las probabilidades de desarrollo a blastocisto y de sus características morfológicas**

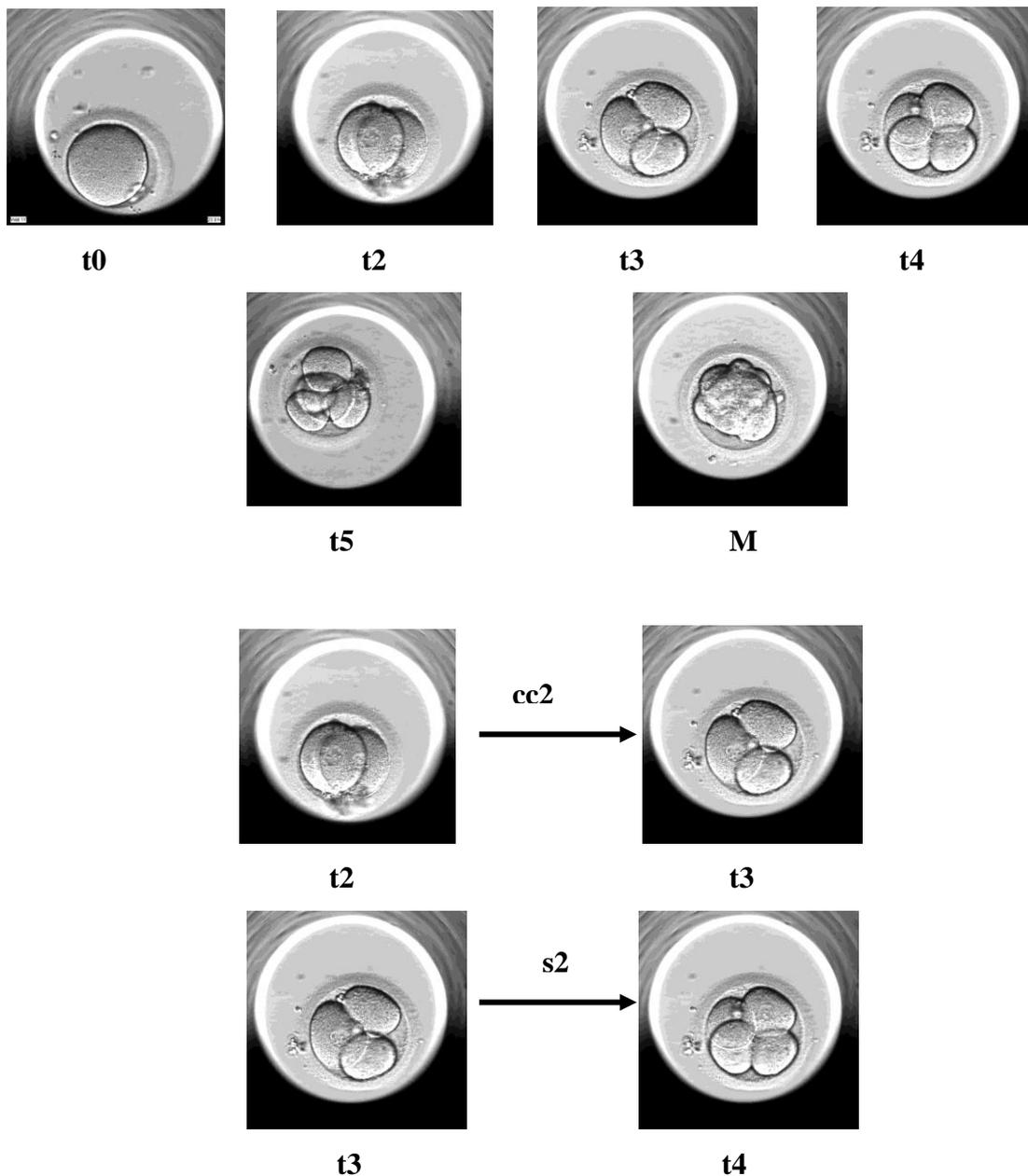
Se realizó un estudio retrospectivo de cohortes, en el que se microinyectaron 1301 ovocitos metafase II para 165 parejas incluidas en nuestro programa de donación de ovocitos. Se analizaron mediante tecnología time-lapse un total de 834 embriones, en el que se registraron todas las variables descritas anteriormente. Todas las receptoras evaluadas se programaron para una transferencia embrionaria en blastocisto en día 5 de desarrollo.

La morfología de los embriones en cultivo se evaluó a las 48-72 horas post-inseminación/microinyección teniendo en cuenta los criterios descritos en apartados anteriores. Los blastocistos se valoraron en día 5 (120 hpi) de acuerdo a la expansión del blastocisto y a las características de la masa celular interna (MCI) y del trofoectodermo (TE). Teniendo en cuenta este sistema de clasificación, se consideraron blastocistos óptimos o de buena calidad morfológica aquellos que están caracterizados por un trofoectodermo cohesivo con numerosas células ahusadas así como a una masa celular interna con un elevado grado de compactación.

### **8.2.1.- Variables de estudio.**

Se procedió a un análisis retrospectivo de las imágenes de cada embrión individualmente mediante el EmbryoViewer integrado en un ordenador externo; gracias a esta herramienta fue posible registrar las características morfológicas mencionadas anteriormente así como los tiempos exactos en los que transcurrieron las divisiones

celulares desde el momento de la fecundación. Se registraron las siguientes variables de tiempo:



Con los datos derivados del sistema de análisis de imagen se evaluó:

- **Cinética de desarrollo a blastocisto:** se realizó un análisis comparativo de la cinética de desarrollo embrionario entre aquellos embriones que fueron capaces de evolucionar hasta blastocisto y los embriones que vieron interrumpido su desarrollo.

-**Cinética de desarrollo a blastocisto óptimo:** se comparó la velocidad de desarrollo embrionario entre blastocistos cuyas características morfológicas fueron

consideradas de buen pronóstico y blastocistos definidos como de mala calidad morfológica.

Por último, se calculó la distribución embrionaria en cada una de las categorías propuestas del algoritmo tanto para blastocistos como para blastocistos óptimos.

### **8.2.2.- Análisis de los datos.**

Los resultados se analizaron retrospectivamente en función de si los embriones se desarrollaron o no a blastocisto en día 5. Para describir la distribución de probabilidades relacionada con la aparición del blastocisto, los resultados cinéticos se transformaron de variables continuas a variables categóricas, al dividirlos en grupos denominados cuartiles, los cuales dividen la serie estadística en cuatro grupos con igual cantidad de términos. Mediante este procedimiento, se evitaron los sesgos introducidos por los valores extremos, es decir, un sólo valor aberrante puede inflar su valor y aportar una impresión confusa de la variación que existe en el grueso de los datos. Una vez que se establecieron los cuartiles, se calculó tanto el porcentaje de embriones que se desarrollaron a blastocistos como la proporción de blastocistos de buena calidad con el objetivo de determinar la distribución temporal de cada uno de estos parámetros.

La selección embrionaria en el momento de la transferencia se realizó de acuerdo a criterios morfológicos en día 2, día 3 y día 5, de modo que los datos cinéticos no influyeron en este proceso de selección.

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

### **8.3. Análisis del impacto de la calidad seminal y de las técnicas de fecundación *in vitro* sobre la cinética de desarrollo embrionario en un modelo de donación de ovocitos.**

Se analizaron 1200 embriones procedentes de 179 parejas incluidas en el programa de donación de ovocitos. Se realizó FIV/ICSI siguiendo los procedimientos habituales de aplicación para cada ciclo considerado individualmente.

Se valoró la morfología embrionaria en día 2, día 3 y día 5 de desarrollo según los criterios definidos previamente.

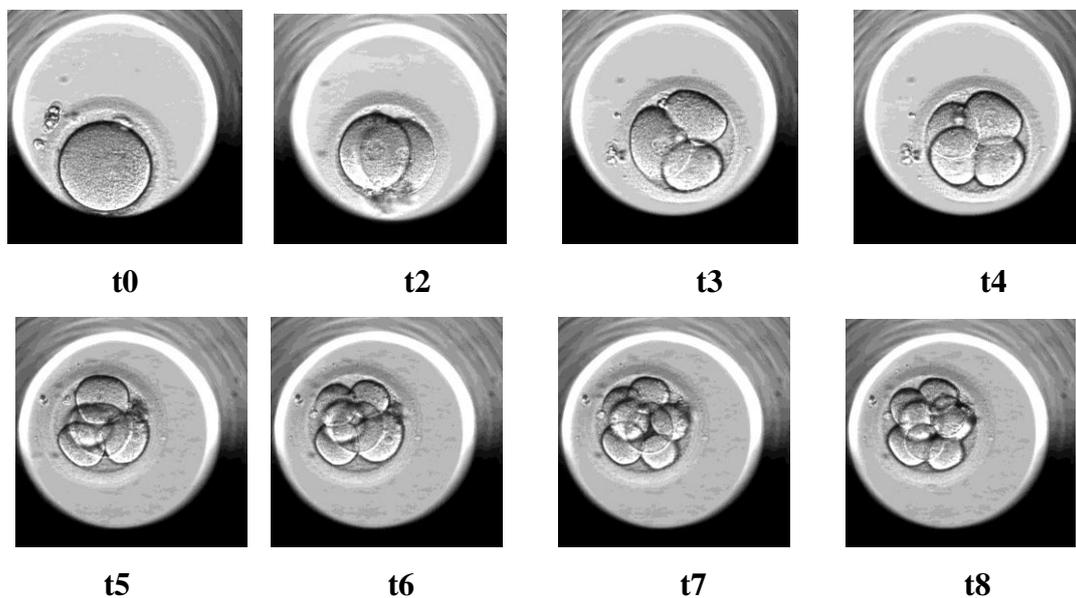
### 8.3.1. Calidad seminal y métodos de fecundación.

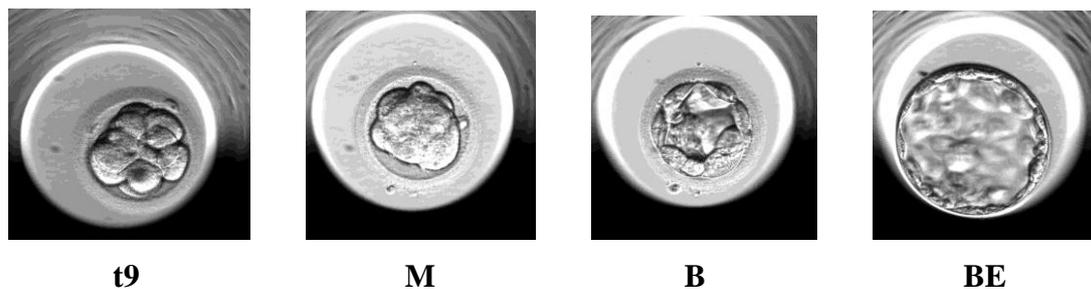
Las muestras de semen se clasificaron según los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud en 2009 en cuatro clases en función de la concentración y el porcentaje de formas con movilidad progresiva. En este punto sólo se analizaron ciclos de ICSI donde el factor espermático adquiere importancia

Concentración		Movilidad	
≥39 mill./eyaculado	<39 mill./eyaculado	≥32% espz. móviles	<32% espz. Móviles
<b>No oligozoospermico</b>	<b>Oligozoospermico</b>	<b>No astenozoospermico</b>	<b>Astenozoospermico</b>

### 8.3.2 Análisis de imagen

Mediante el sistema de análisis de imagen se determinaron las siguientes variables cinéticas:





Además, se calcularon todas las variables de tiempo relacionadas con la duración de los ciclos celulares:  $cc2$ ,  $s2$ ,  $cc3$ ,  $s3$ ,  $(t4-t2)$  y  $(t8-t4)$ , así como la distribución embrionaria en las categorías morfocinéticas descritas por el algoritmo de selección embrionaria.

En este estudio hay que destacar que la cinética de desarrollo embrionario en los ciclos de ICSI es relativa al tiempo de microinyección mientras que en los ciclos de FIV, se considera  $t0$  al tiempo de inseminación.

Con los tiempos de división embrionaria obtenidos del sistema de análisis de imagen, se calcularon las siguientes variables:

- **Cinética de desarrollo embrionario en función del método de fecundación:** análisis comparativo de la velocidad de desarrollo embrionario dependiendo de la técnica de fecundación empleada (FIV vs ICSI).

- **Cinética de desarrollo embrionario dependiendo de la concentración espermática:** se compara la tasa de desarrollo embrionario en función de si la muestra de semen es oligozoospermica/no oligozoospermica.

- **Cinética de desarrollo embrionario dependiendo del porcentaje de espermatozoides móviles:** se valora la influencia de la calidad seminal sobre la cinética embrionaria en función de si la muestra se define como astenoospermica/no astenoospermica.

### 8.3.3 Análisis de datos.

Los distintos parámetros de desarrollo se compararon mediante el programa SPSS tanto para el estudio de la influencia del método de fecundación como para el análisis de la relación entre calidad seminal y cinética embrionaria. Se aplicó un test de Chi-cuadrado para comparar proporciones y una T-Student para comparar medias, considerando la presencia de significación estadística cuando  $p < 0.05$ .

# **RESULTADOS**

## 1.- Estudio de la validación clínica de un sistema de análisis de imagen en tratamientos de reproducción asistida.

Se analizaron 478 embriones procedentes de 60 parejas incluidas en un programa de donación de ovocitos. Se donaron una media de 13.4 ovocitos/donante y se obtienen aproximadamente 8 embriones/receptora.

**1.1.-Calidad embrionaria en día 3 de desarrollo.** El análisis comparativo de la calidad embrionaria en día 3 de desarrollo entre los dos grupos de estudio mostró unos resultados similares tanto para el Embryoscope como para los embriones en cultivo en el incubador convencional  $p=0,941$  (Figura 11).

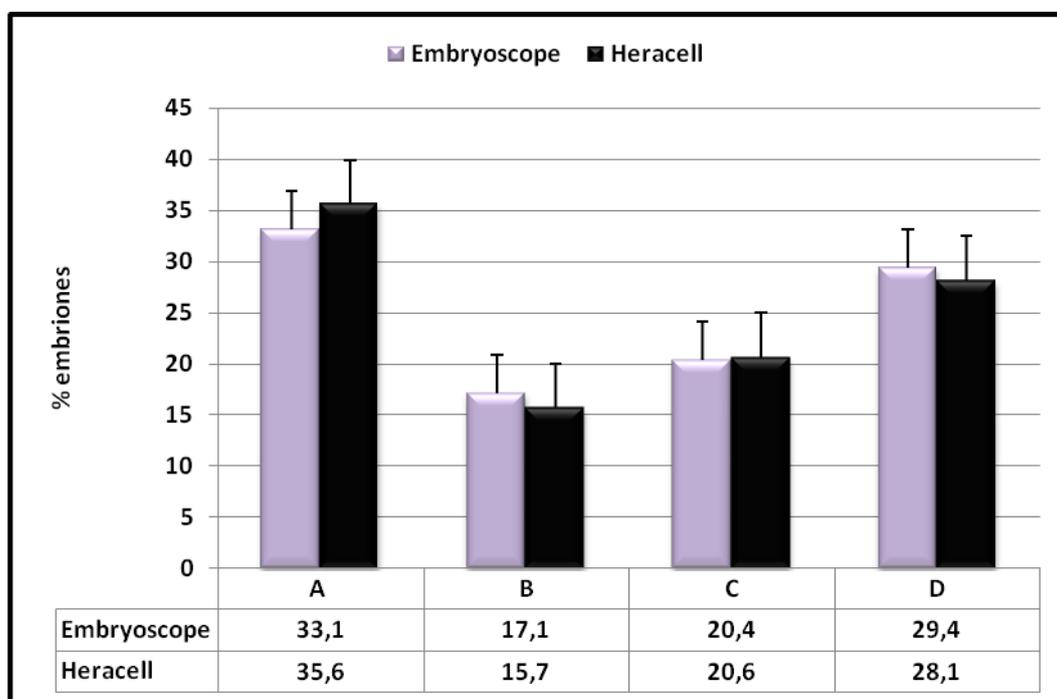


Figura 11. Calidad embrionaria en día 3.

**1.2.- Tasa de desarrollo a blastocisto y viabilidad embrionaria en día 5.** La tasa de desarrollo a blastocisto así como el porcentaje de embriones transferidos, congelados y/o descartados no varió significativamente entre los dos sistemas de cultivo  $p=0,875$  (Figura 12).

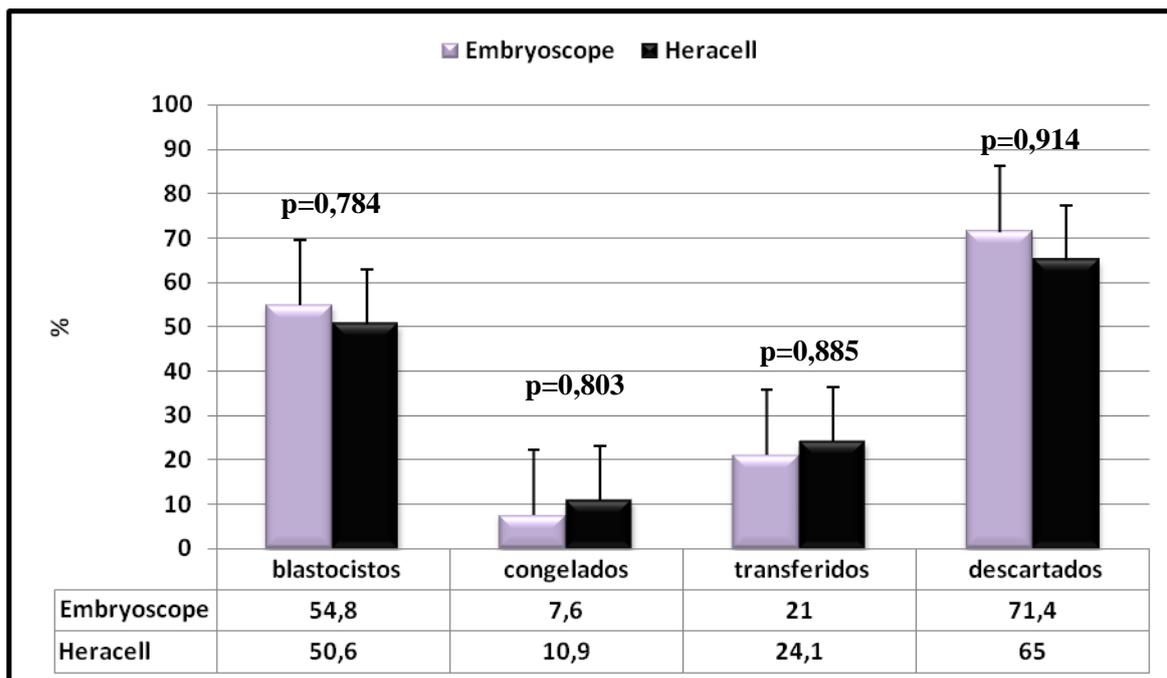


Figura 12. Tasa de desarrollo a blastocisto y viabilidad en día 5

La odd-ratio (OR) de desarrollo a blastocisto entre los dos tipos de incubador fue de 1,158 (IC 95% 0,739-1,689), con los intervalos de confianza por encima de los límites de la hipótesis de no-inferioridad, de modo que el tamaño de la muestra evaluada se consideró válido.

**1.3.-Transferencias embrionarias en día 3 y día 5.** Cuando se comparó el porcentaje de embriones transferidos en día 3 y/o día 5 de desarrollo para cada uno de los incubadores, no se obtuvieron diferencias significativas (Figura 13).

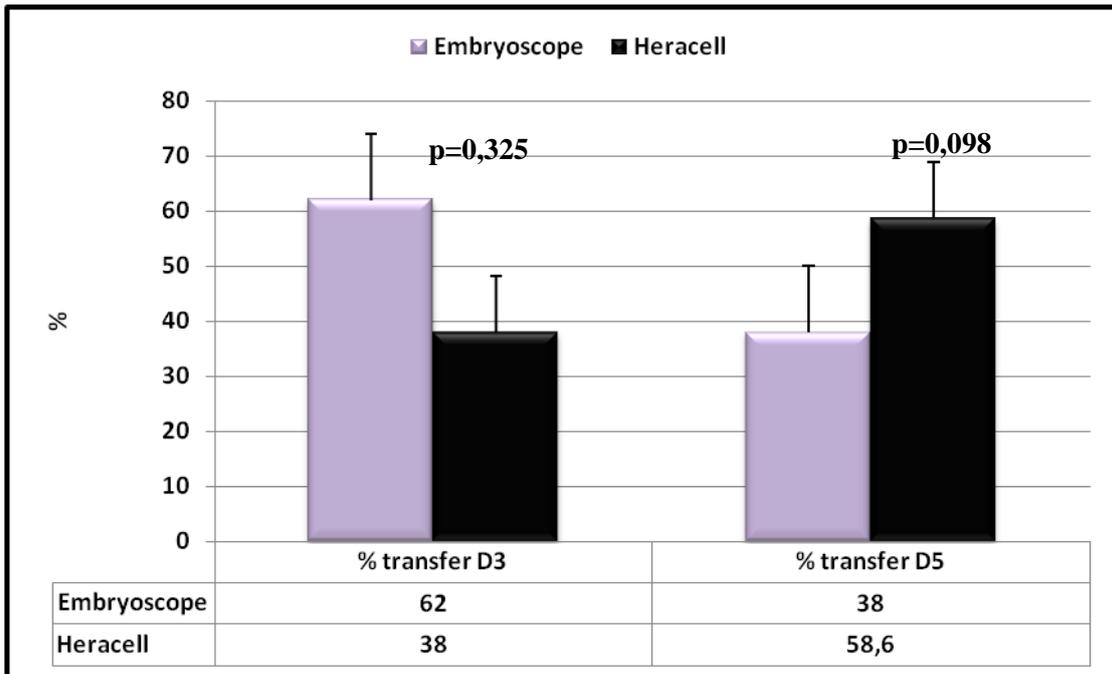


Figura 13. Porcentaje de transferencias embrionarias día 3 vs día 5 de desarrollo

**1.4.- Tasas de gestación clínica e implantación Embryoscope vs incubador convencional.** No se observaron diferencias significativas en cuanto a las tasas de gestación para las transferencias homogéneas tanto en el Embryoscope como en el incubador convencional y las transferencias mixtas (Figura 14). De acuerdo a las tasas de implantación, tampoco se registraron variaciones relevantes debido al reducido número de transferencias puras en cada uno de los sistemas de cultivo (Figura 15).

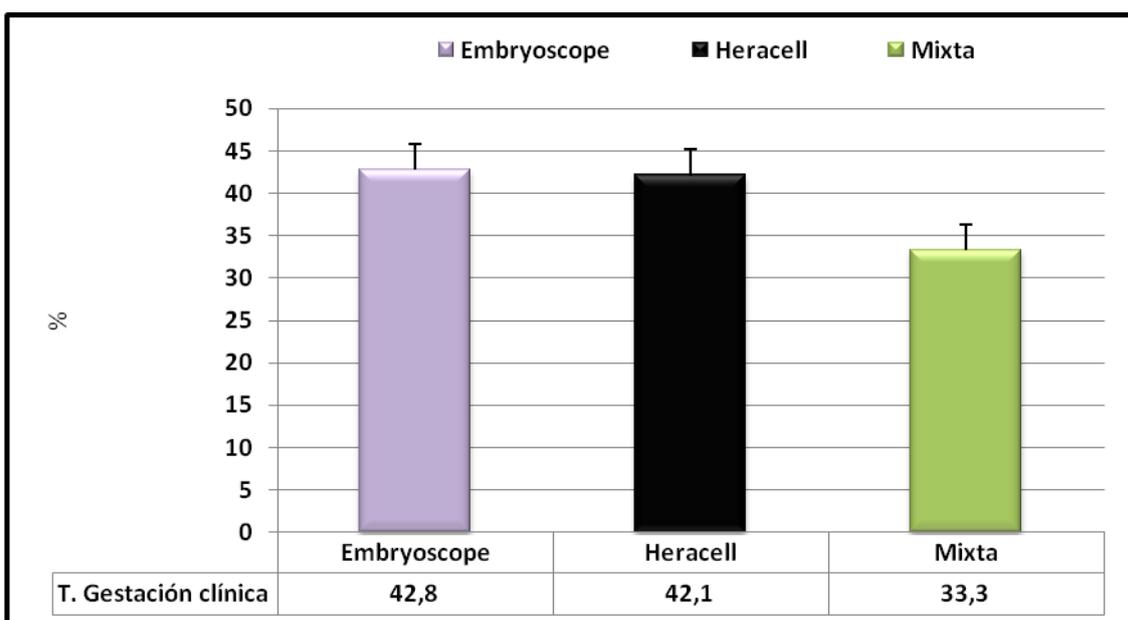


Figura 14. Tasa de gestación clínica dependiendo del tipo de incubador (p=0,399)

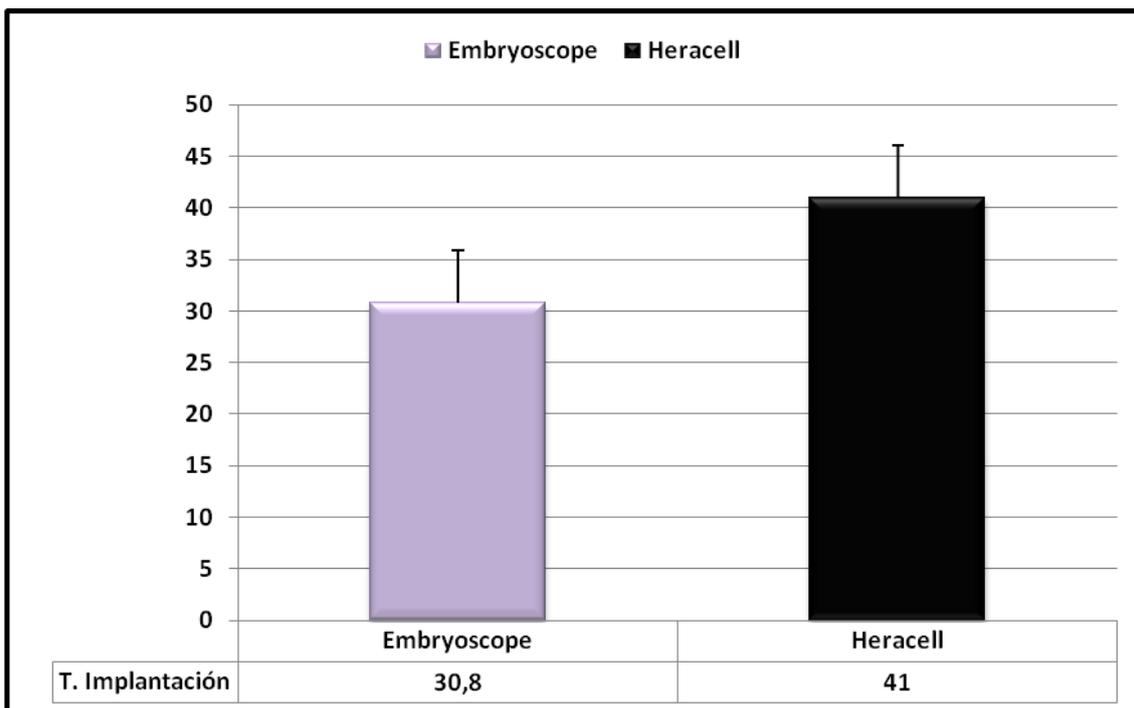


Figura 15. Tasa de implantación dependiendo del tipo de incubador ( $p=0,216$ ).

## 2.- Examen de la influencia de la cinética embrionaria sobre las probabilidades de desarrollo a blastocisto y de sus características morfológicas.

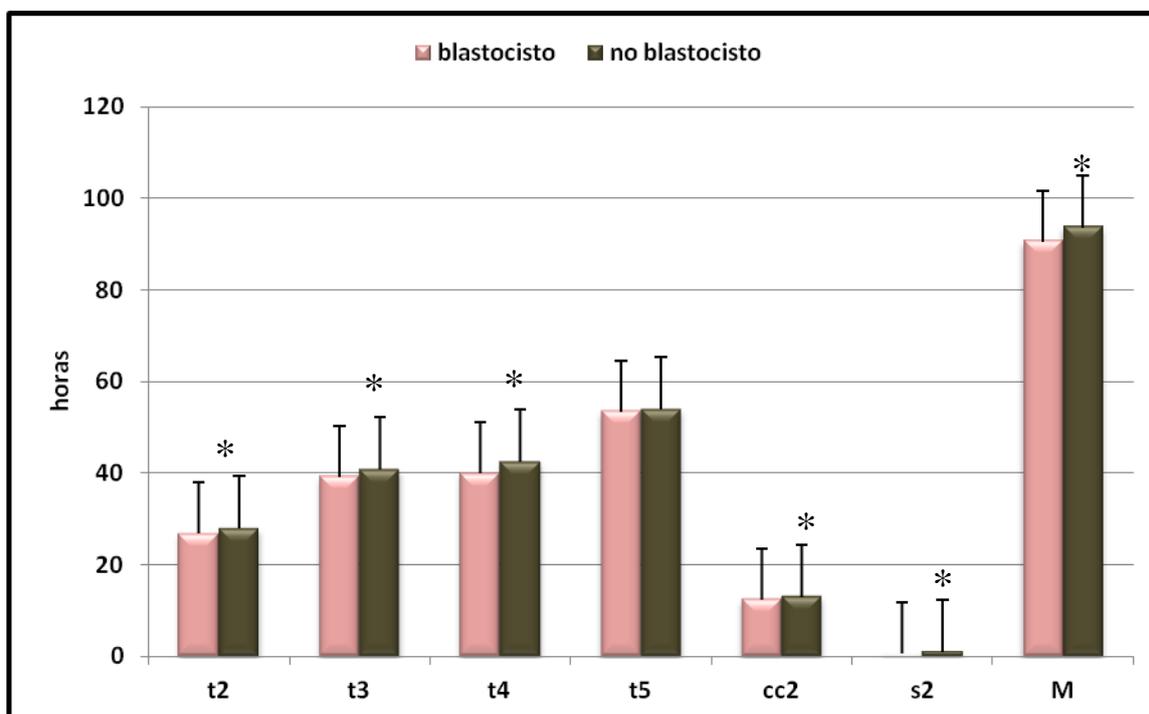
Se realizó un estudio retrospectivo de cohortes, en el que se microinyectaron 1301 ovocitos metafase II que se donaron a 165 parejas incluidas en nuestro programa de donación de ovocitos, con una media de 7,9 MII por paciente (IC95% 5,0-12,0). Fecundaron un total de 962 ovocitos (73,9%, IC 95% 71,6-76,3), de los que 834 fueron analizados desde un punto de vista cinético mediante un sistema time-lapse de análisis de imagen.

Todas las pacientes recibieron al menos un blastocisto en el momento de la transferencia embrionaria. Implantaron 136 embriones (saco gestacional con latido cardíaco positivo) de un total de 274 transferidos, lo que resulta en una tasa de implantación del 49,6% (IC 95% 43,7-55,6). Se obtuvo una tasa de gestación clínica por transferencia del 66,7% (IC 95% 59,5-73,9) ( $n=110/165$ ).

**2.1.-Cinética de desarrollo a blastocisto y blastocisto óptimo.** Las medias de las variables de tiempo tanto para los embriones que se desarrollan a blastocisto como para los que no, se presentan en la Tabla 1 con la presencia de diferencias significativas (\*  $p < 0,05$ ) entre las dos situaciones analizadas (Figura 16)

	<b>Blastocisto (n=552)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>No blastocisto (n=282)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>t2 (h)</b>	26,8	26,6-27,0	27,9	27,4-28,4	<b>&gt;0,001</b>
<b>t3 (h)</b>	39,2	38,8-39,6	40,8	40,0-40,8	<b>&gt;0,001</b>
<b>t4 (h)</b>	39,9	39,5-40,3	42,4	41,5-43,3	<b>&gt;0,001</b>
<b>t5 (h)</b>	53,5	52,8-54,2	53,9	52,4-55,4	0,525
<b>cc2 (h)</b>	12,4	12,1-12,7	13,0	12,4-13,6	<b>0,006</b>
<b>s2 (h)</b>	0,6	0,4-0,8	1,0	0,5-1,5	<b>0,031</b>
<b>M (h)</b>	90,6	90,0-90,6	93,7	92,1-95,3	<b>&gt;0,001</b>

**Tabla 1. Cinética de desarrollo embrionario vs tasa de de desarrollo a blastocisto**



**Figura 16. Cinética de desarrollo embrionario vs tasa de de desarrollo a blastocisto**

Teniendo en cuenta la clasificación morfológica de los blastocistos, aquéllos caracterizados por un trofoectodermo cohesivo de células finas y alargadas y una masa celular interna claramente compacta comenzaron a dividirse antes que los blastocistos que no cumplen con estas características (Tabla 2).

	<b>Blastocisto óptimo (n=152)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>No blastocisto óptimo (n=141)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>p</b>
<b>t2 (h)</b>	26,6	26,0-27,2	27,1	26,7-27,5	0,108
<b>t3 (h)</b>	39,2	38,6-39,8	40,0	39,2-40,8	0,121
<b>t4 (h)</b>	39,4	38,9-39,9	41,5	40,5-42,5	<b>0,001</b>
<b>t5 (h)</b>	48,7	48,2-49,2	50,2	48,8-50,6	<b>0,002</b>
<b>cc2 (h)</b>	12,7	12,4-13,0	12,7	12,2-13,2	0,945
<b>s2 (h)</b>	0,3	0,2-0,4	1,1	0,6-1,6	<b>0,006</b>
<b>M (h)</b>	89,9	88,5-91,3	92,4	91,1-93,7	<b>0,001</b>

Tabla 2. Cinética de desarrollo embrionario vs tasa de de desarrollo a blastocisto óptimo/no óptimo.

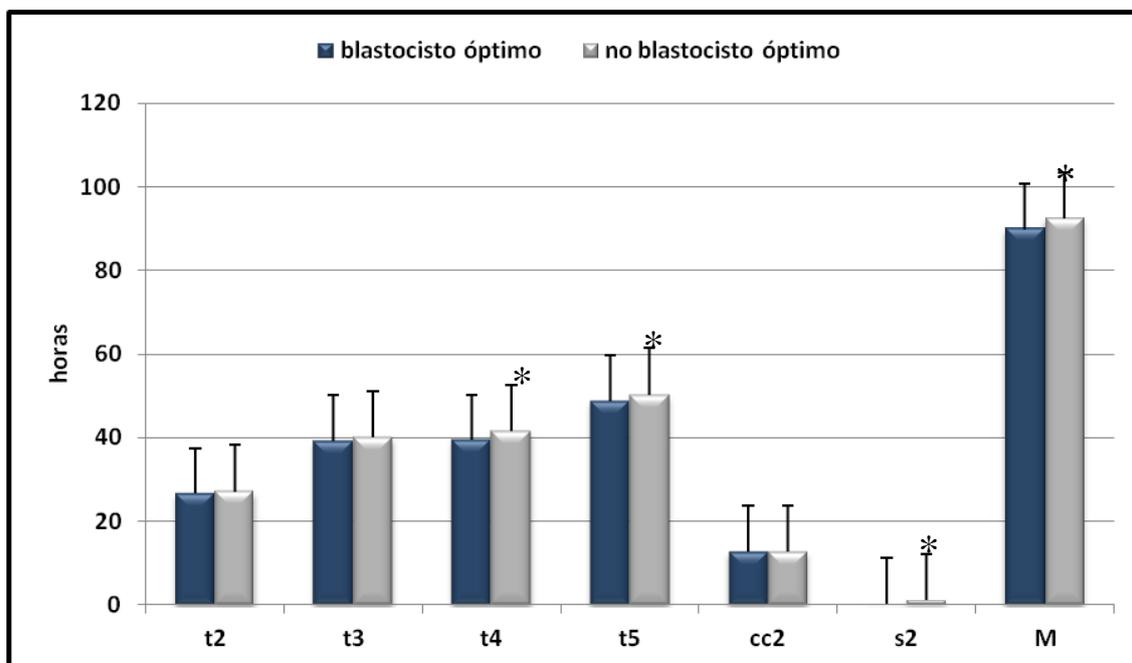
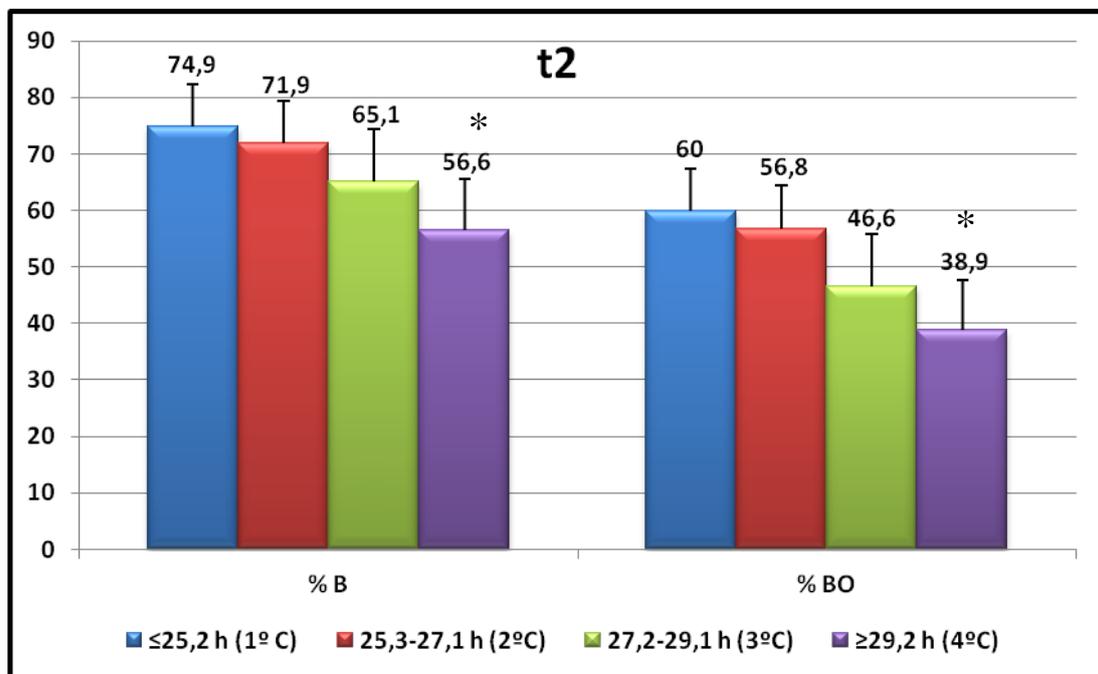


Figura 17. Cinética de desarrollo embrionario vs tasa de de desarrollo a blastocisto óptimo/no óptimo.

Al igual que ocurría en el caso anterior, también se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio (Figura 17).

En los blastocistos tempranos resultó complicado valorar las características de la MCI y del TE, de ahí las diferencias en cuanto a la cantidad de embriones analizados entre blastocistos en conjunto y blastocistos óptimos.

**2.2.- Distribución temporal de los blastocistos en los diferentes cuartiles de las variables de tiempo analizadas.** El análisis de cómo los blastocistos y los blastocistos de buena calidad se distribuyen en los distintos cuartiles mostró un mayor porcentaje de blastocistos y de blastocistos óptimos en los dos primeros cuartiles con respecto a los otros (Figura 18).



**Figura 18a. Distribucion de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,048$ ) en los cuartiles definidos para t2.**

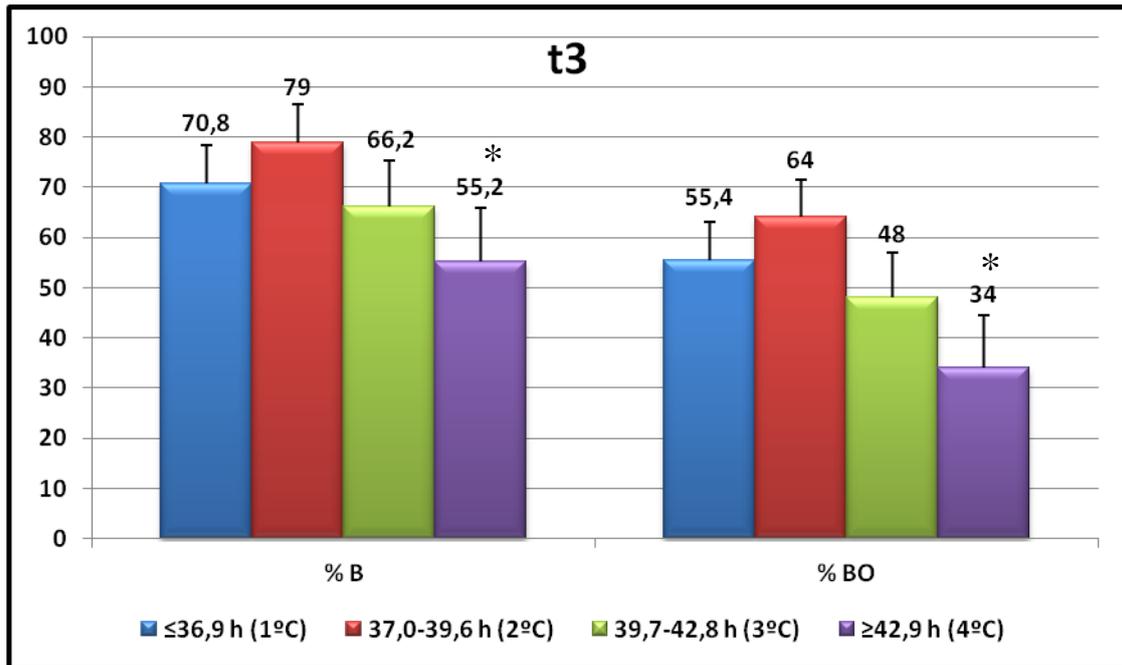


Figura 18b. Distribucion de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,05$ ) en los cuartiles definidos para t3

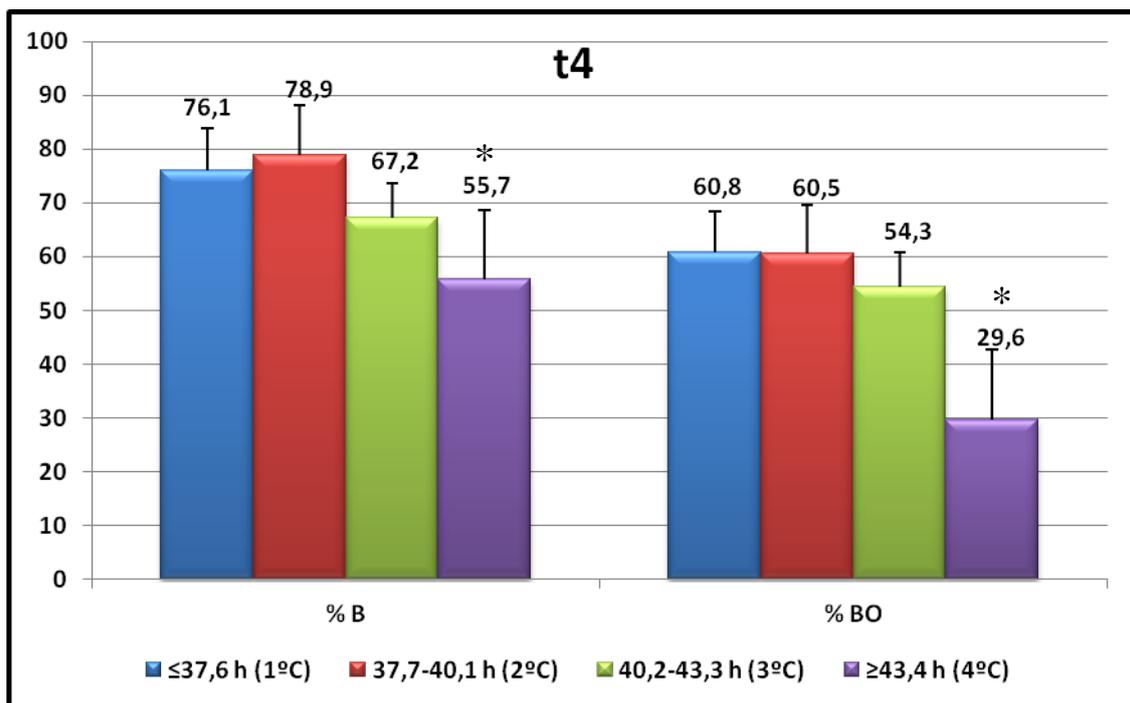


Figura 18c. Distribucion de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,001$ ) en los cuartiles definidos para t4.

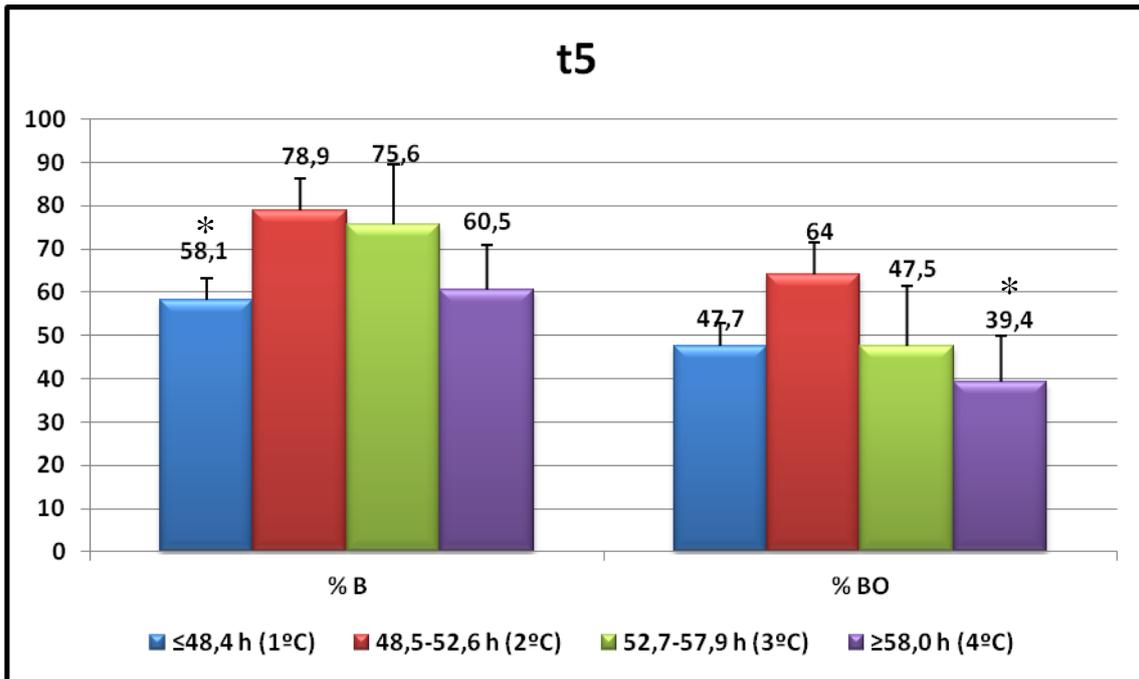


Figura 18d. Distribucion de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,017$ ) en los cuartiles definidos para t5.

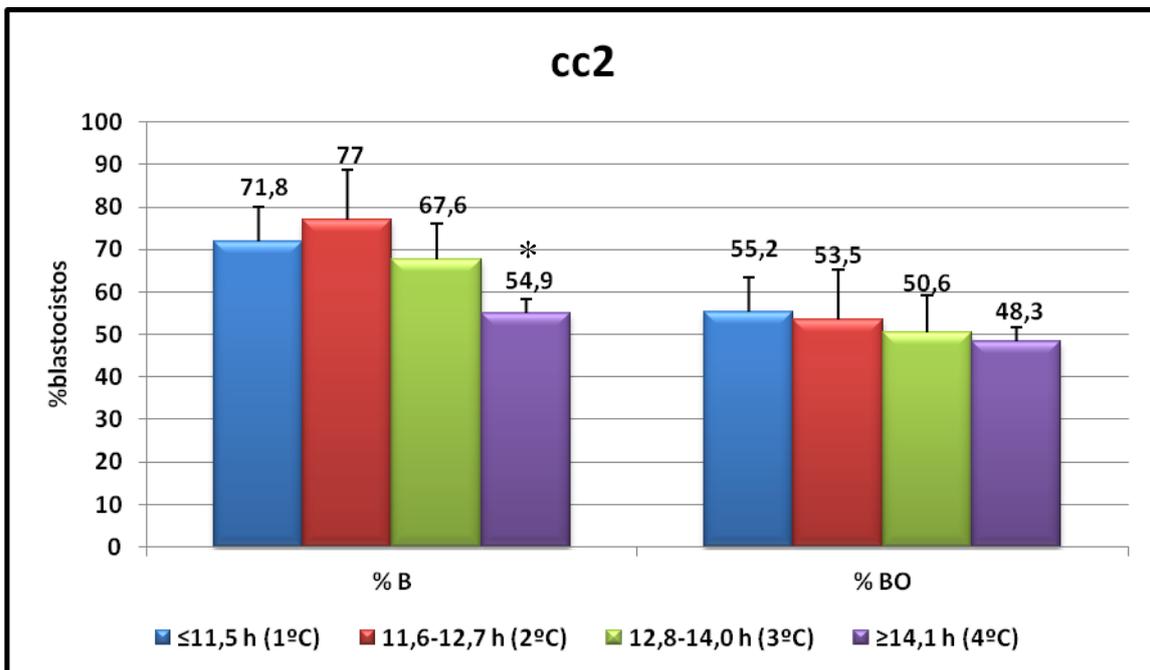


Figura 18e. Distribucion de blastocistos ( $p=0,01$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,865$ ) en los cuartiles definidos para cc2.

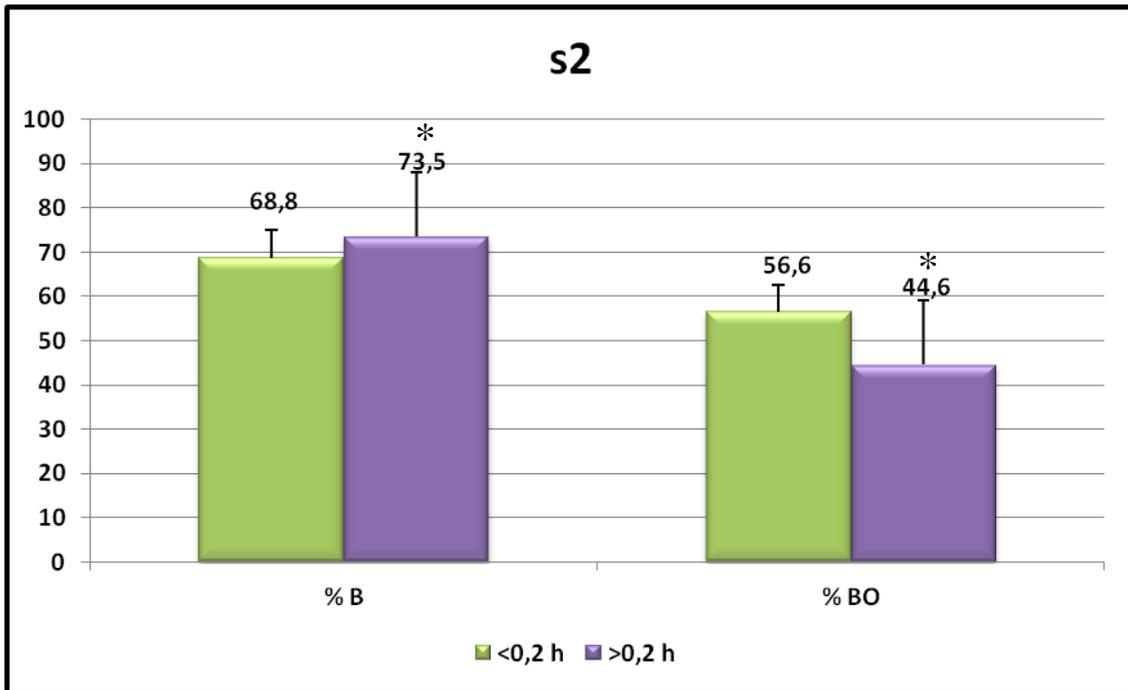


Figura 18f. Distribución de blastocistos ( $p=0,018$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,043$ ) en el percentil 50 definido para s2.

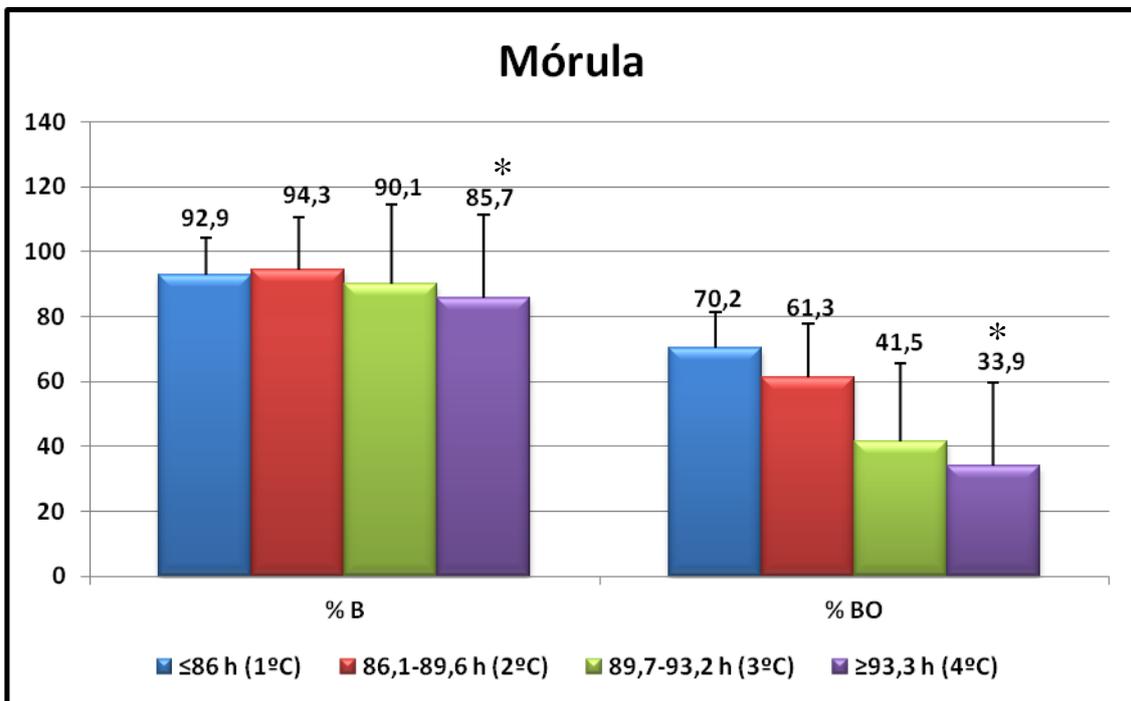
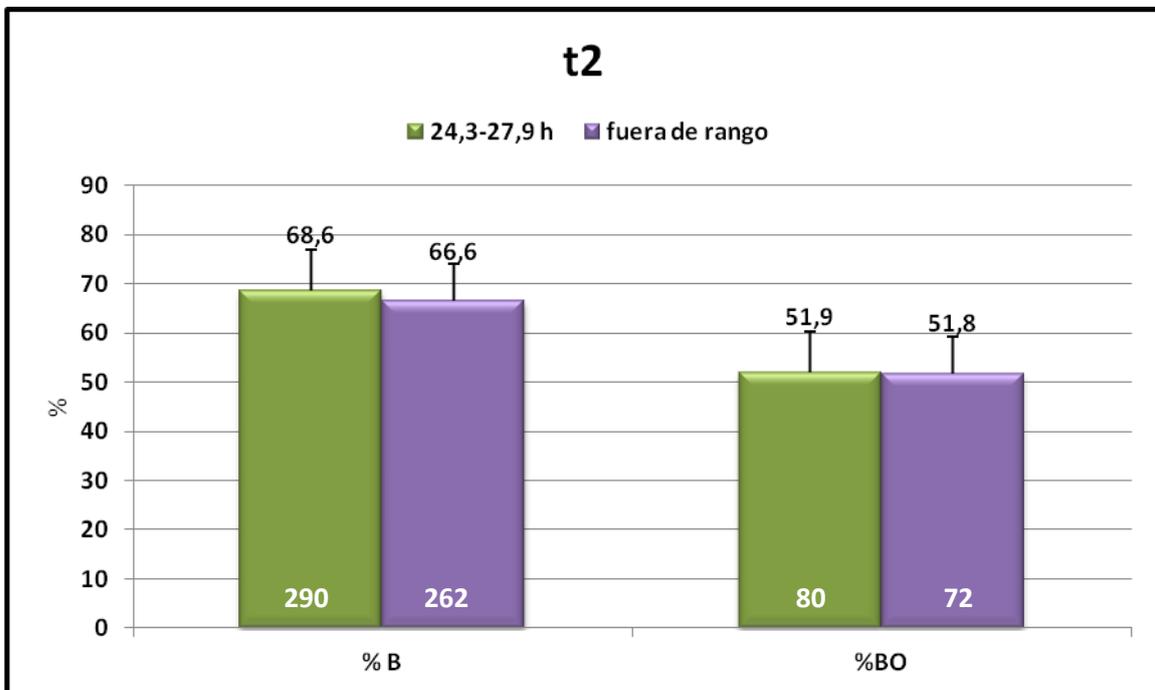


Figura 18g. Distribución de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p>0,001$ ) en los cuartiles definidos para Mórula.

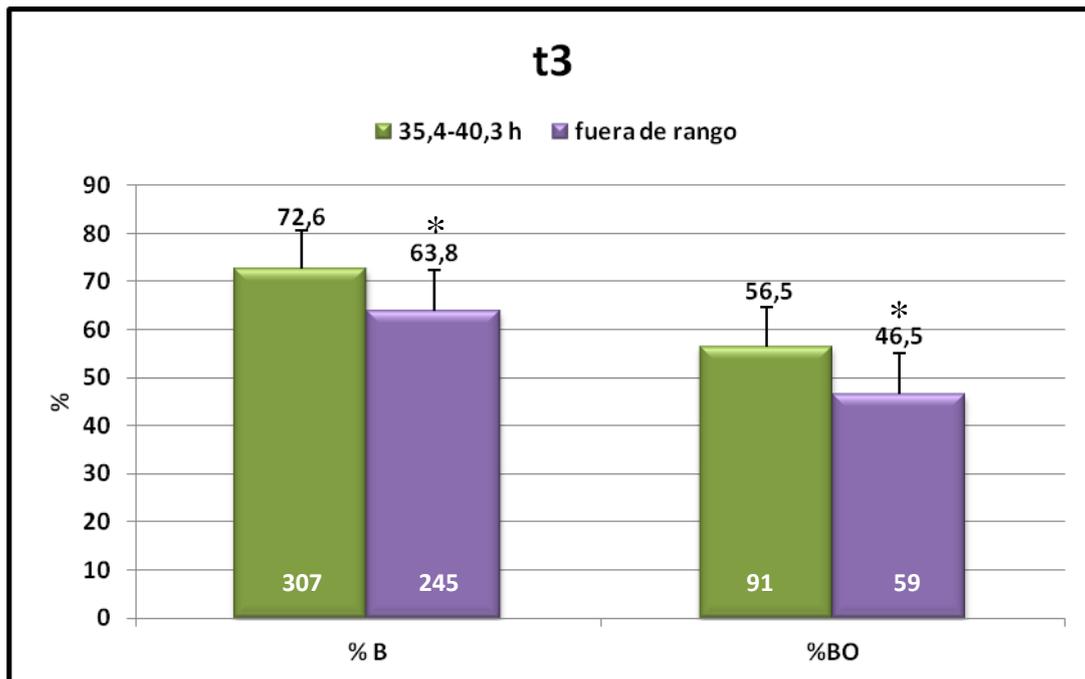
**2.3.- Intervalos óptimos de tiempo y proporción de blastocistos.** Para comprobar si estos rangos óptimos de tiempo, que se sabe que predicen un mayor

potencial de implantación embrionario, actúan también como marcadores de desarrollo a blastocisto y condicionan su calidad morfológica, se calculó la fracción de blastocistos y blastocistos óptimos dentro y fuera de cada uno de estos rangos de tiempo. Los valores en la base de los histogramas hacen referencia al número de blastocistos en cada intervalo de tiempo.

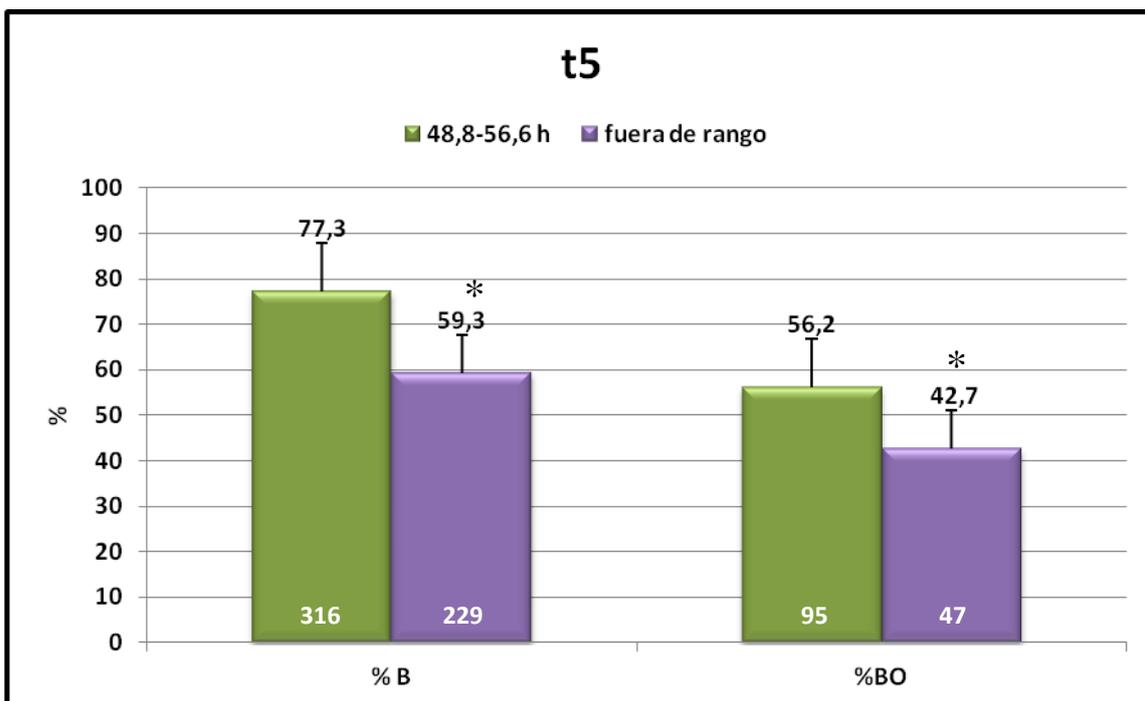
El porcentaje de blastocistos es mayor para todas las variables analizadas, alcanzándose relevancia estadística en casi todas las variables analizadas. Un embrión cuya cinética de desarrollo se enmarca dentro de estos intervalos de tiempo, tiene más probabilidades de evolucionar a blastocisto (Figura 19). Cuando se examinaron los aspectos morfológicos de estos blastocistos se registró una tendencia similar para casi todos los parámetros cinéticos evaluados.



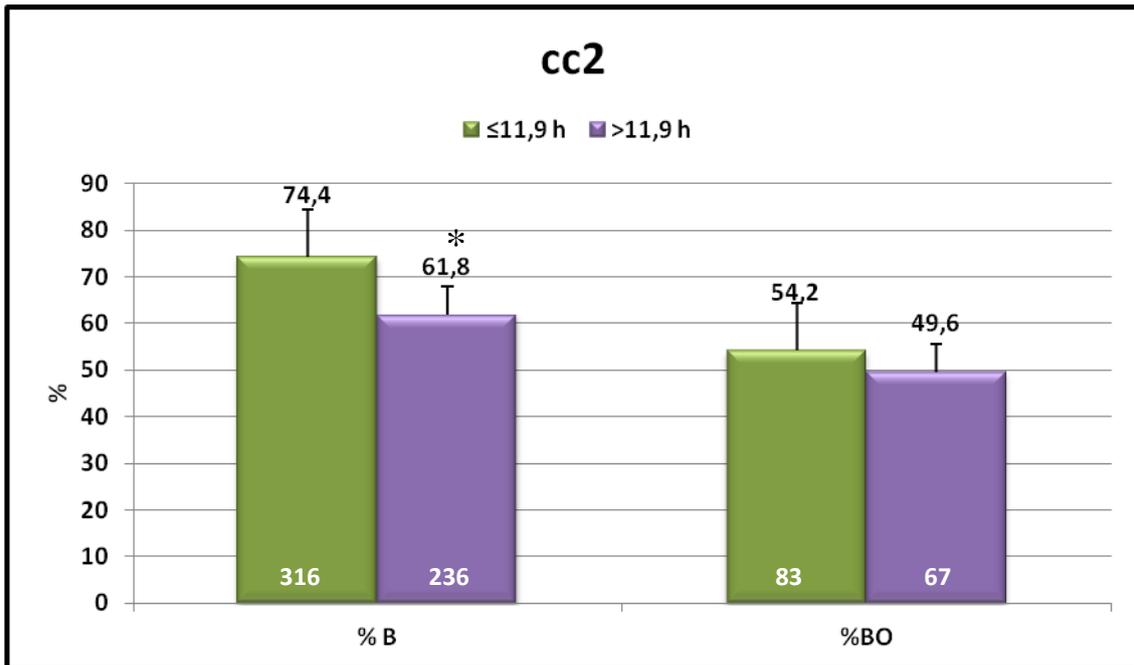
**Figura 19a. Porcentaje de blastocistos ( $p=0,740$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,980$ ) dentro y fuera del rango óptimo de t2.**



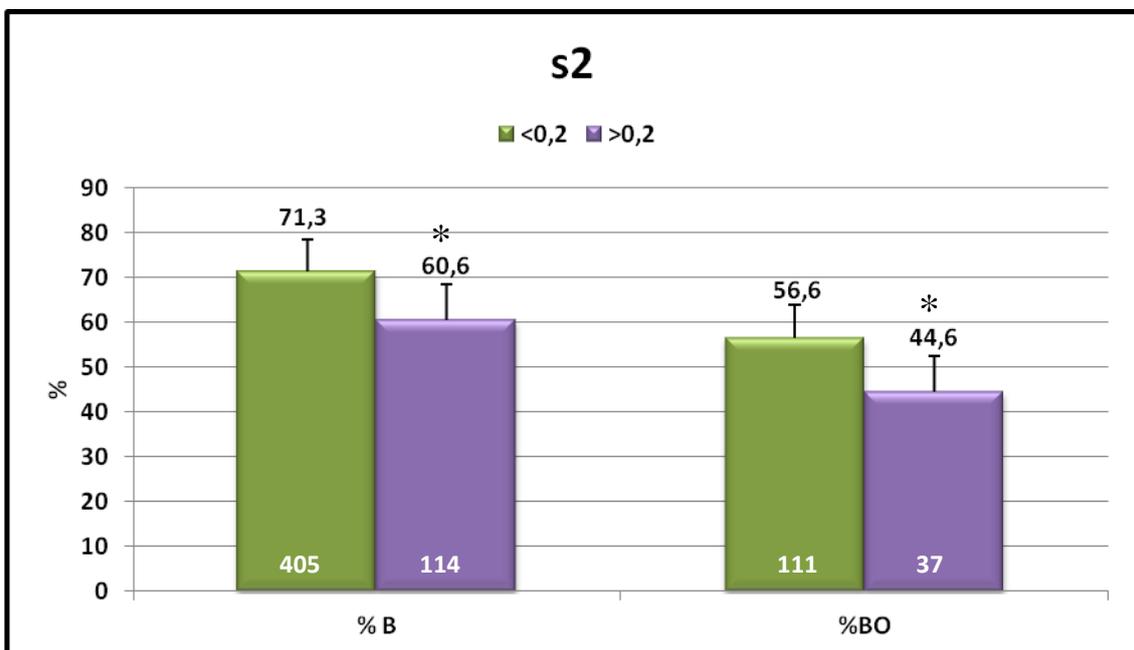
**Figura 19b.** Porcentaje de blastocistos ( $p=0,007$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,004$ ) dentro y fuera del rango optimo de t3.



**Figura 19c.** Porcentaje de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,028$ ) dentro y fuera del rango optimo de t5.



**Figura 19d. Porcentaje de blastocistos ( $p=0,003$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,253$ ) dentro y fuera del rango óptimo de cc2**



**Figura 19e. Porcentaje de blastocistos ( $p=0,018$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,043$ ) dentro y fuera del rango óptimo de s2.**

El hecho de que la cinética de desarrollo embrionario en día 3 esté incluida dentro de los intervalos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación aumenta las probabilidades de una evolución posterior hacia blastocisto; este

incremento de las posibilidades también se traduce en una clara mejoría en cuanto a las características morfológicas del propio blastocisto.

**2.4.- Categorías morfocinéticas y tasa de desarrollo a blastocisto.** Como se ha mencionado previamente, las correlaciones observadas entre los parámetros morfocinéticos y el potencial de implantación embrionario forma la base de un sistema de clasificación jerárquica propuesto para la selección embrionaria en el momento del transfer. Este modelo divide a los embriones en cinco categorías con un importante descenso en el potencial de implantación desde la clase A a la clase E.

En este caso, se excluyeron los embriones incluidos en la clase E ya que tienen muy pocas probabilidades de evolucionar hacia blastocisto. Cuando se analizaron las proporciones de embriones presentes en cada clase (de A a D), se observó una clara tendencia descendente desde aquellos embriones definidos como más viables (clase A) hasta aquellos embriones con pocas perspectivas de viabilidad (clase D). En la Figura 20 se muestra el porcentaje de blastocistos y de blastocistos óptimos para todas las categorías del algoritmo; en ambos casos es evidente que a medida que los embriones cumplen con las condiciones morfocinéticas que caracterizan a un embrión de clase A, aumenta la proporción de blastocistos.

Sin embargo, cuando se estudió separadamente el porcentaje de blastocistos y de blastocistos óptimos de acuerdo a la simetría en 2-células y a la presencia de una transición directa desde cigoto a embrión de 3-células (ambos factores considerados como criterios de exclusión), se detectó una fracción significativamente más alta no sólo de blastocistos sino también de blastocistos de buena calidad cuando la primera división es simétrica (Figura 21) y no existe una conversión directa de 1 a 3-células (Figura 22).

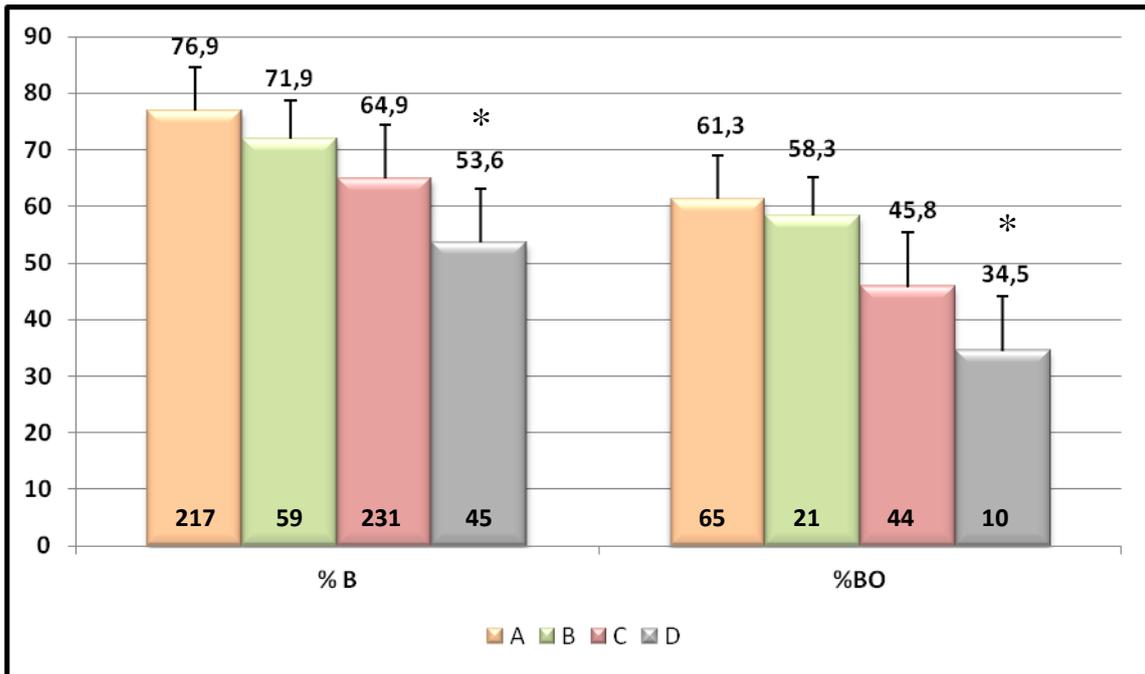


Figura 20. Distribución de blastocistos ( $p>0,001$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,047$ ) en las categorías descritas por el algoritmo.

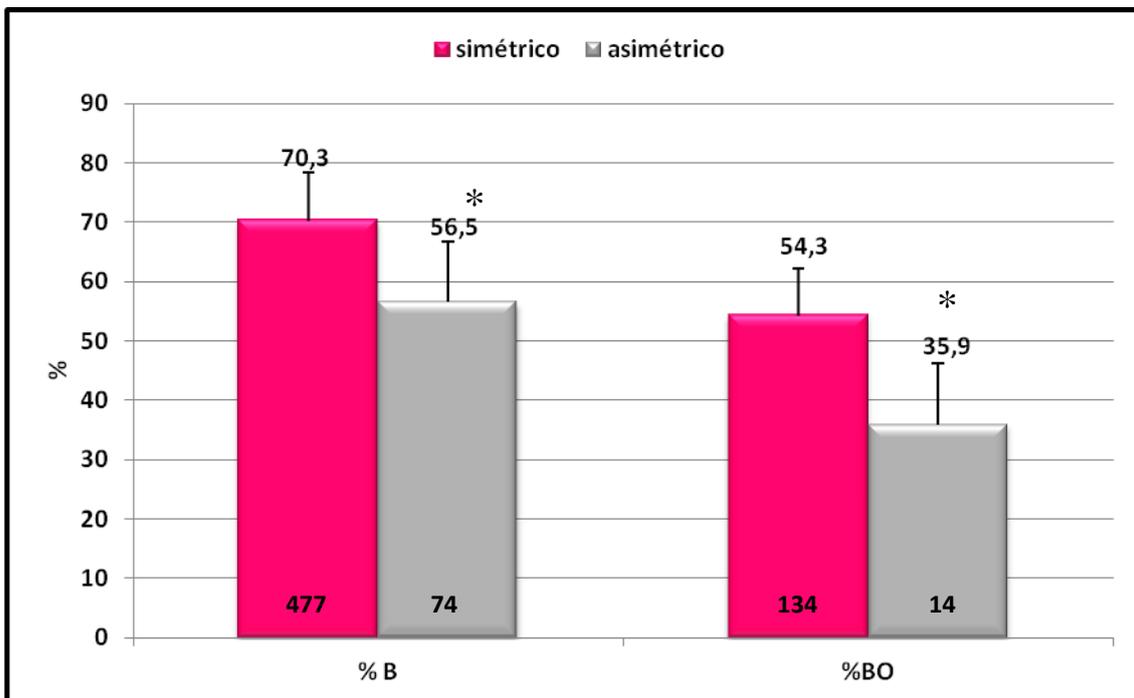
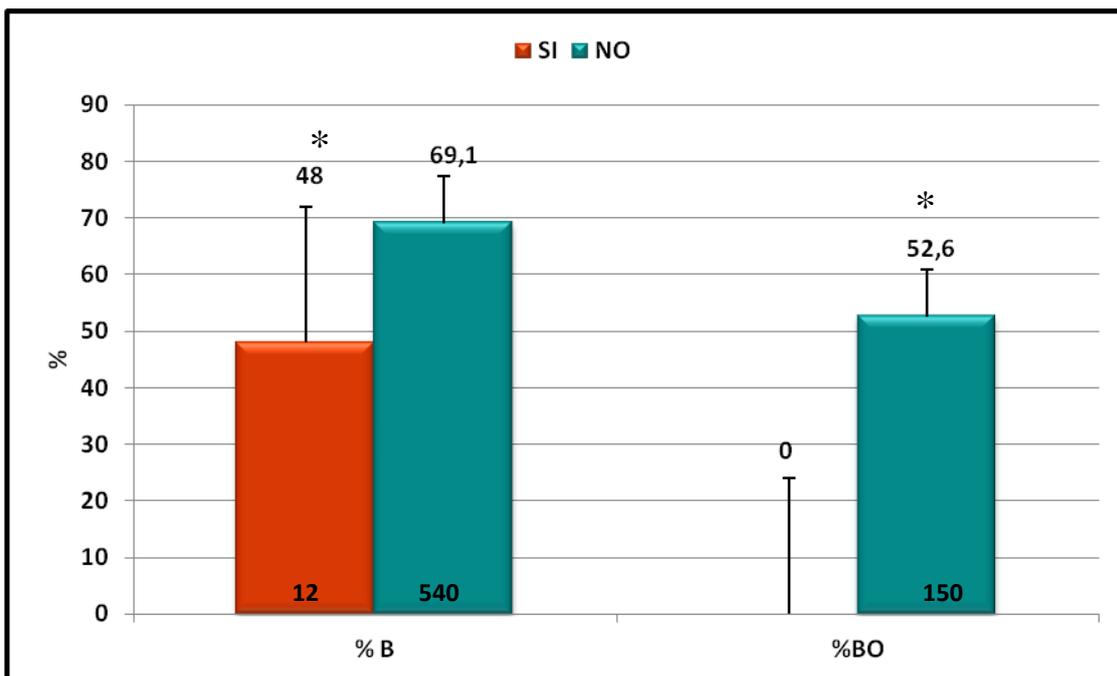


Figura 21. Porcentaje de embriones simétricos en blastocistos ( $p=0,007$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,033$ )



**Figura 22. Porcentaje de blastocistos ( $p=0,035$ ) y blastocistos óptimos ( $p=0,049$ ) de acuerdo a la presencia o no de una transición directa de 1 a 3-células**

### **3.- Análisis del impacto de la calidad seminal y de las técnicas de fecundación *in vitro* sobre la cinética de desarrollo embrionario en un modelo de donación de ovocitos.**

Se analizaron 1200 embriones procedentes de 179 parejas incluidas en el programa de donación de ovocitos. Se recuperaron un total de 2379 ovocitos, con una media de 13,4 por receptora; de este total, fecundaron 1637 y se evaluó el desarrollo embrionario de 1200 mediante un sistema de análisis de imagen.

Se transfirieron un total de 269 embriones, de los cuales 125 implantaron con éxito, lo que resultó en una tasa de implantación del 46,5% (IC95% 40,5-52,4). La tasa de gestación clínica por transferencia alcanzó un valor de 60,1% (95/158) (IC95% 52,5-67,8).

**3.1.- Cinética de desarrollo embrionario en función de la técnica de fecundación.** El análisis comparativo de los tiempos medios de las divisiones embrionarias en función del método de fecundación empleado en cada ciclo de

tratamiento mostró que los embriones derivados de ciclos de ICSI se dividían más rápidamente que los embriones derivados de ciclos de FIV (Tabla 3). Se observaron diferencias significativas (\*  $p < 0,05$ ) en algunas de las variables cinéticas evaluadas, adquiriendo especial relevancia las variaciones observadas en  $t_{pn}$  (h) o tiempo de desaparición de los pronúcleos considerado como factor precursor de la primera división embrionaria; en  $t_2$ , relacionadas con el tiempo empleado por el cigoto para completar la primera mitosis y en  $t_5$ , que es la variable con mayor poder de predicción del potencial de implantación en base a las características cinéticas del embrión (Figura 24).

	FIV (n=622)		ICSI (n=581)		p
	$\mu$	IC 95%	$\mu$	IC 95%	
<b>dpn (h)</b>	25,2	25,0-25,4	23,8	23,5-24,1	<b>0,000</b>
<b>t2 (h)</b>	28,5	27,2-27,8	27,0	26,7-29,3	<b>0,042</b>
<b>t3 (h)</b>	39,4	38,1-40,7	38,2	37,8-38,6	0,095
<b>t4 (h)</b>	41,0	40,5-41,5	40,3	39,8-40,8	0,09
<b>t5 (h)</b>	52,1	51,4-52,8	50,9	50,1-51,7	<b>0,016</b>
<b>t6 (h)</b>	54,5	53,9-55,1	53,7	53,0-54,4	0,110
<b>t7 (h)</b>	57,4	56,6-58,2	56,2	55,4-57,0	0,024
<b>t8 (h)</b>	59,4	58,7-60,1	59,1	58,3-59,9	0,499
<b>t9 (h)</b>	62,5	61,5-63,5	60,7	59,5-61,9	<b>0,022</b>
<b>cc2 (h)</b>	11,9	10,7-13,1	11,3	10,8-11,8	0,300
<b>cc3 (h)</b>	13,4	12,9-13,7	12,6	12,1-13,1	0,055
<b>s2 (h)</b>	2,2	1,8-2,6	2,1	1,7-2,5	0,858
<b>s3 (h)</b>	8,5	7,8-9,2	9,7	8,8-10,6	<b>0,032</b>
<b>t4-t2 (h)</b>	13,5	13,1-13,9	13,3	12,9-13,7	0,590
<b>t8-t4 (h)</b>	19,9	19,3-20,5	20,2	19,6-20,8	0,487
<b>embriones (D5)</b>	<b>FIV (n=362)</b>		<b>ICSI (n=288)</b>		
<b>M (h)</b>	91,0	90,0-92,0	91,1	89,9-92,3	0,939
<b>B (h)</b>	103,7	102,7-104,7	104,9	103,9-105,9	0,114
<b>BE (h)</b>	117,7	115,7-119,7	117,1	116,0-119,2	0,966

Tabla 3. Cinética de desarrollo embrionario en función del método de fecundación (t0=tiempo de fecundación)

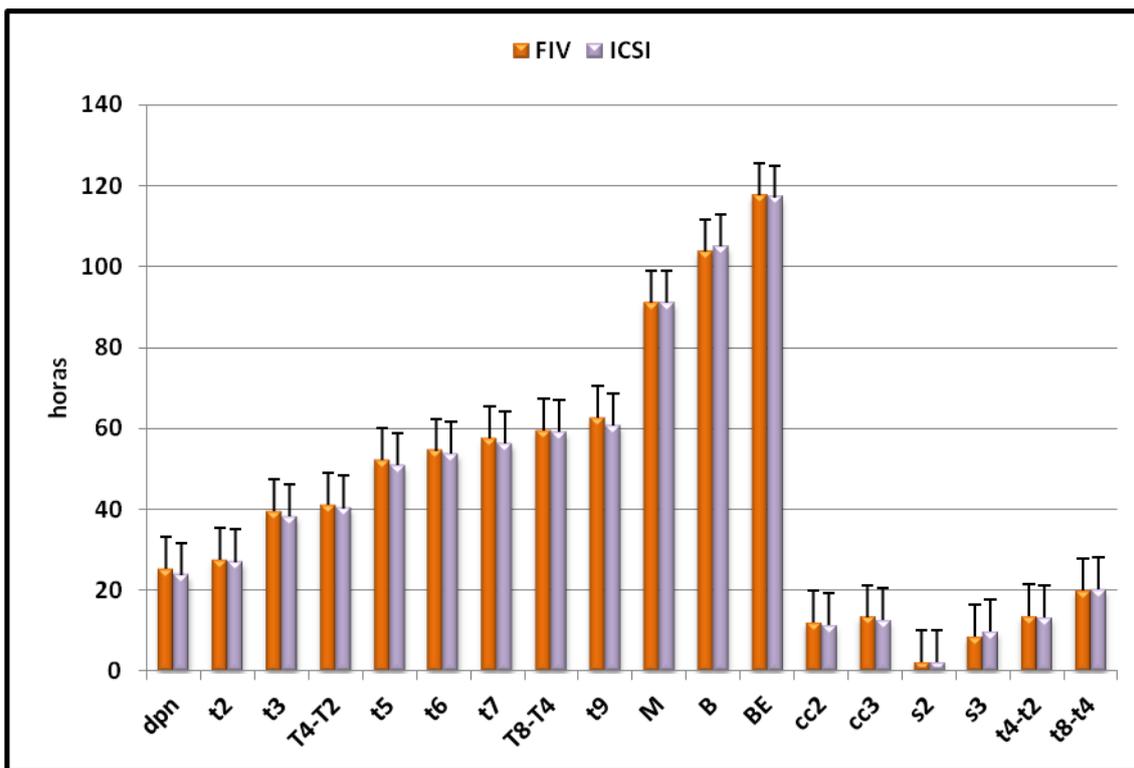


Figura 24. Cinética de desarrollo embrionario en función del método de fecundación.

Sin embargo, estas diferencias pueden no ser reales puesto que el tiempo que se ha fijado como  $t_0$  = tiempo de fecundación; en los ciclos de ICSI, ambos tiempos coinciden pero en los ciclos de FIV,  $t_0$  es una estimación del tiempo de fecundación puesto que no se tiene en cuenta el tiempo que necesita el espermatozoide para atravesar las cubiertas ovocitarias. Para confirmar que las diferencias cinéticas observadas se deben a las características intrínsecas de cada técnica y no a un retraso real de los embriones procedentes de ciclos de FIV, se estableció como tiempo de referencia la desaparición de los pronúcleos (dpn) previa a la primera división embrionaria; este parámetro es un suceso perfectamente medible en el Embryoscope en ambos grupos de estudio por lo que se eliminarían los posibles sesgos introducidos en el punto anterior (Tabla 4). En este caso, no se obtuvieron diferencias significativas para ninguna de las variables cinéticas analizadas (Figura 25).

	<b>FIV (n=622)</b>		<b>ICSI (n=581)</b>		<b>p</b>
	<b>μ</b>	<b>IC 95%</b>	<b>μ</b>	<b>IC 95%</b>	
<b>t2 (h)</b>	3,1	2,9-3,3	3,1	2,8-3,3	0,914
<b>t3 (h)</b>	14,8	14,2-15,4	14,1	13,5-14,7	0,775
<b>t4 (h)</b>	16,8	16,3-17,3	16,5	15,9-17,1	0,896
<b>t5 (h)</b>	28,4	27,6-29,2	27,4	26,5-28,3	0,632
<b>t6 (h)</b>	31,3	30,5-32,1	30,5	29,7-31,3	0,421
<b>t7 (h)</b>	34,0	33,2-34,8	33,2	32,4-34,0	0,753
<b>t8 (h)</b>	36,0	35,1-36,9	36,0	35,1-36,9	0,995
<b>t9 (h)</b>	45,3	44,3-47,0	43,7	42,0-45,4	0,578
<b>embriones (D5)</b>	<b>FIV (n=362)</b>		<b>ICSI (n=288)</b>		
<b>M (h)</b>	66,8	65,6-67,9	67,8	66,5-69,1	0,536
<b>B (h)</b>	79,2	77,9-80,5	80,3	79,9-81,7	0,844
<b>BE (h)</b>	93,7	91,3-96,1	94,7	91,4-98,0	0,697

**Tabla 4. Cinética de desarrollo embrionario en función del método de fecundación (t0=dpn)**

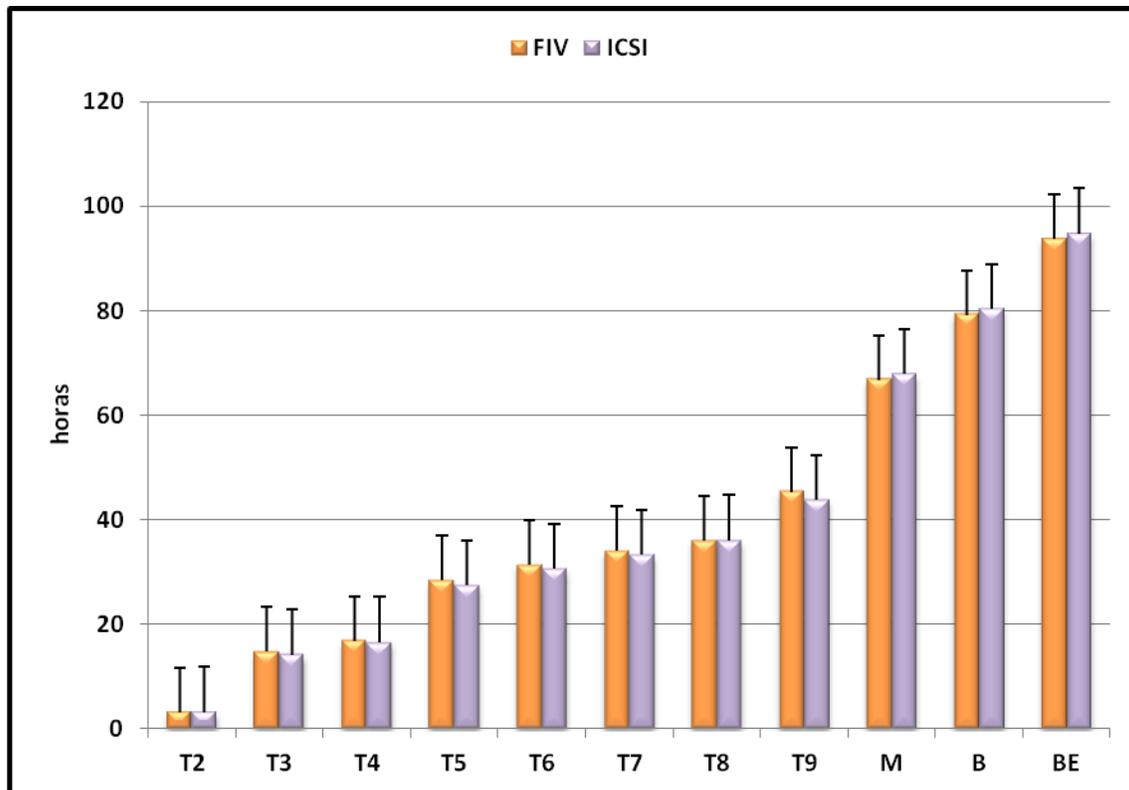


Figura 25. Cinética de desarrollo embrionario en función del método de fecundación (t0= dpn)

**3.2.- Intervalos óptimos de división y método de fecundación.** Cuando se comparó la proporción de embriones cuyos tiempos de división embrionaria se encuentran dentro de los considerados como tiempo óptimos de división y que están relacionados con un mayor potencial de implantación, no se registraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio. La técnica de fecundación empleada no influye sobre la calidad embrionaria ni sobre el posterior potencial de desarrollo (Figura 26). Los valores en la base de los histogramas hacen referencia al número de blastocistos en cada intervalo de tiempo.

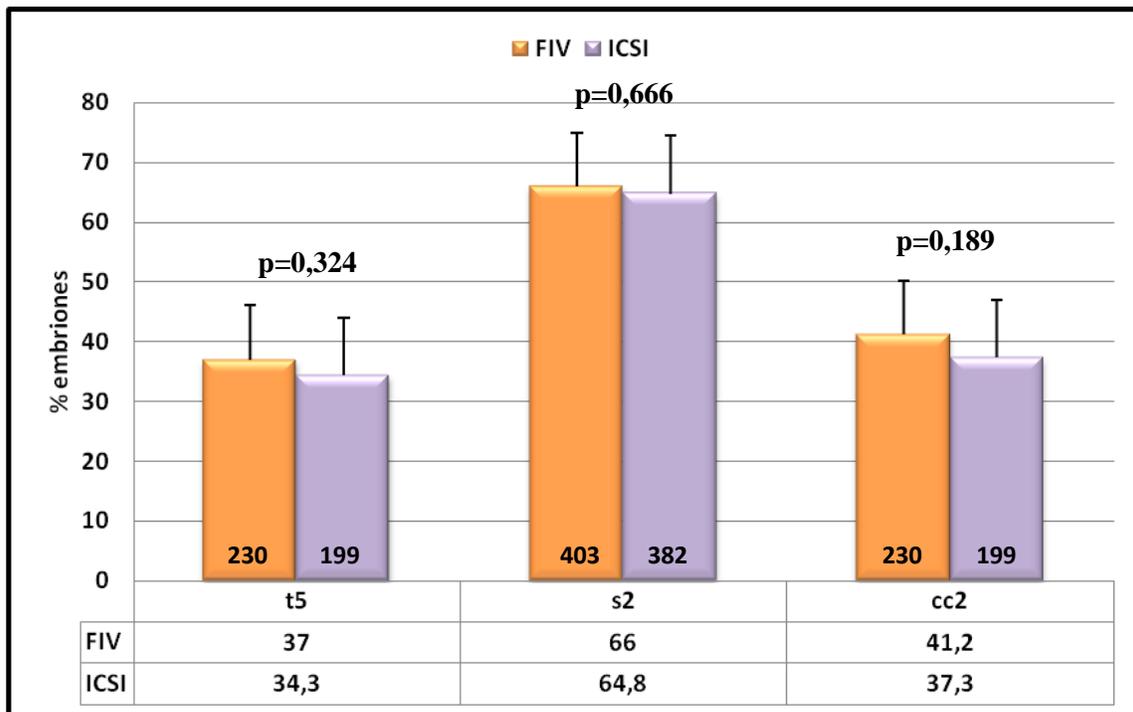
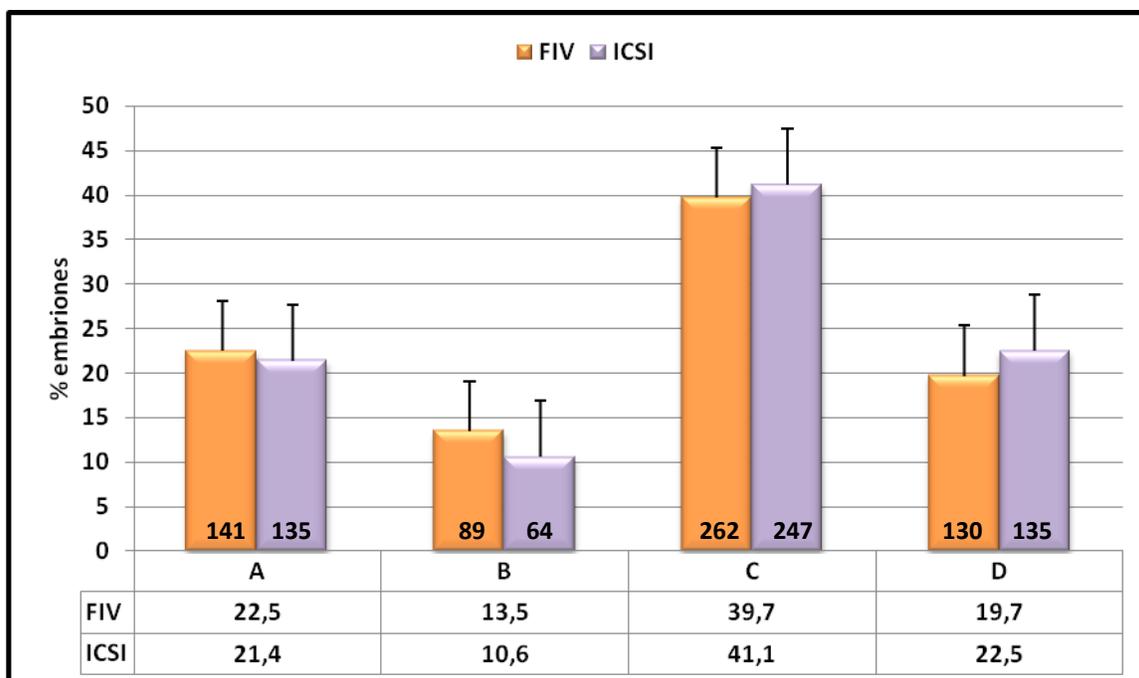


Figura 26. Tiempo óptimos de división y método de fecundación.

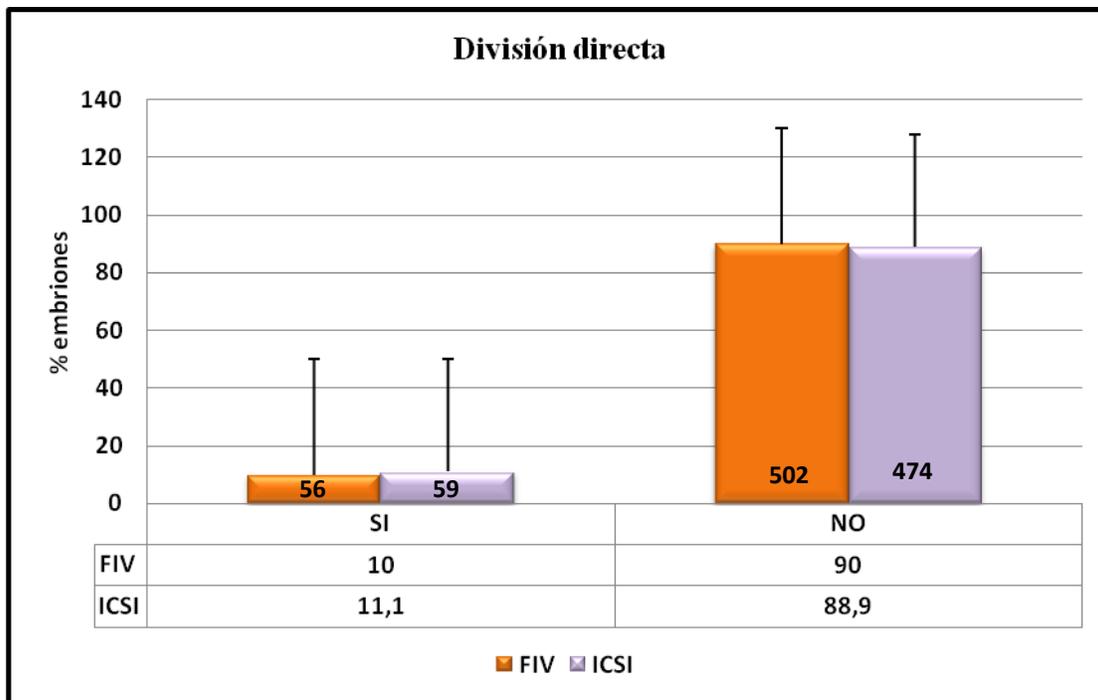
**3.3.- Categorías morfocinéticas y método de fecundación.** La clasificación embrionaria en base al cumplimiento de un conjunto de criterios morfocinéticos aporta información acerca de la idoneidad de los embriones potencialmente seleccionables para transferir.

Cuando se cotejó la fracción de embriones incluida en cada una de las categorías morfocinéticas del algoritmo dependiendo de si se ha realizado un FIV o un ICSI, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Figura 27)



**Figura 27. Distribución embrionaria en las categorías del algoritmo en función del método de fecundación ( $p=0,108$ ).**

Sin embargo, sí fue posible describir cierta tendencia a favor de los embriones de FIV en las categorías consideradas de mejor pronóstico, lo que indirectamente sugirió mejor calidad embrionaria y perspectivas evolutivas de los embriones derivados de ciclos de FIV; por el contrario, los embriones procedentes de tratamientos de ICSI eran ligeramente más numerosos en las clases que engloban a los embriones de peor pronóstico. Uno de los criterios de exclusión que clasifica directamente a los embriones como de clase D es la transición directa desde cigoto a embrión de 3-células y coincidiendo con las afirmaciones anteriores, se observó que la cantidad de embriones con esta característica es ligeramente mayor para los embriones derivados de ciclos de ICSI (Figura 28).



**Figura 28. Proporción de embriones con división directa a embrión de 3-células en función del método de fecundación ( $p=0,578$ )**

**3.4.- Cinética de desarrollo en función de la concentración de espermatozoides.** Cuando se compararon las medias de los tiempos de división embrionaria de cigotos fecundados con muestras de semen oligozoospermicas/no oligozoospermicas (Tabla 5; \*  $p<0,05$ ), se observó que las cohortes embrionarias derivadas de ciclos con semen no patológico se dividían antes que los cigotos obtenidos de la fecundación con una muestra de mala calidad seminal, apareciendo diferencias significativas en el tiempo que necesitaba el embrión para alcanzar el estadio de 3-células ( $t_3$ ) y en dos variables relacionadas con la duración de los ciclos celulares como son  $cc_2$  y  $s_3$  (Figura 29).

	Oligozoospermico (n=196)		No oligozoospermico (n=362)		p
	$\mu$	IC 95%	$\mu$	IC 95%	
<b>DPN (h)</b>	24,5	24,0-25,0	24,0	23,5-24,5	0,087
<b>t2 (h)</b>	27,3	26,7-27,9	26,8	26,5-27,1	0,148
<b>t3 (h)</b>	36,5	35,5-37,5	34,1	32,3-35,9	<b>0,014</b>
<b>t4 (h)</b>	40,5	39,5-41,5	39,9	39,2-40,6	0,304
<b>t5 (h)</b>	50,7	49,3-52,1	50,9	50,1-51,7	0,759
<b>t6 (h)</b>	54,5	53,2-55,8	53,4	52,5-54,3	0,167
<b>t7 (h)</b>	55,8	54,6-57,0	56,2	55,2-57,3	0,607
<b>t8 (h)</b>	59,1	58,0-60,2	58,0	57,0-59,0	0,140
<b>t9 (h)</b>	60,9	59,2-62,6	60,3	58,8-60,8	0,613
<b>cc2 (h)</b>	11,9	11,5-12,3	10,7	9,9-11,5	<b>0,003</b>
<b>cc3 (h)</b>	12,5	11,3-13,7	12,4	11,8-13,0	0,924
<b>s2 (h)</b>	2,1	1,5-2,7	1,5	1,1-1,9	0,092
<b>s3 (h)</b>	14,1	10,9-17,2	10,4	8,5-12,3	<b>0,045</b>
<b>t4-t2 (h)</b>	11,5	10,2-12,8	12,2	11,4-13,0	0,344
<b>t8-t4 (h)</b>	16,8	14,5-19,1	16,0	14,5-17,5	0,573
<b>embriones (D5)</b>	<b>Oligozoospermico (n=87)</b>		<b>No oligozoospermico (n=195)</b>		
<b>M (h)</b>	91,0	90,0-92,0	91,1	89,9-92,3	0,939
<b>B (h)</b>	103,7	102,7-104,7	104,9	103,9-105,9	0,114
<b>BE (h)</b>	117,7	115,7-119,7	117,1	116,0-119,2	0,966

Tabla 5. Cinética de desarrollo embrionario en función de la concentración espermática

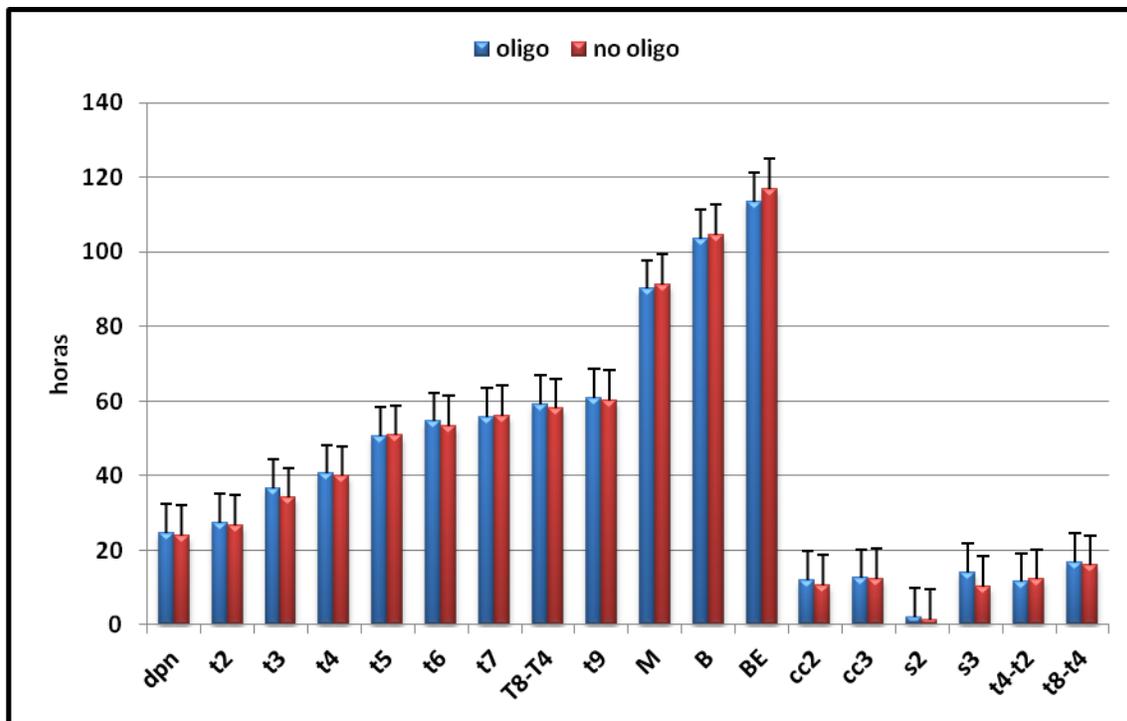


Figura 29. Cinética del desarrollo embrionario en función de la concentración espermática

**3.5.- Intervalos óptimos de división y concentración espermática.** Cuando se agruparon los embriones en los periodos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación, se obtuvieron diferencias significativas a favor de los embriones procedentes de ciclos con muestras no oligozoospermicas en s2. La concentración de espermatozoides sí afecta a la calidad embrionaria desde un punto de vista cinético y del potencial de implantación (Figura 30). Los valores en la base de los histogramas hacen referencia al número de blastocistos en cada intervalo de tiempo.

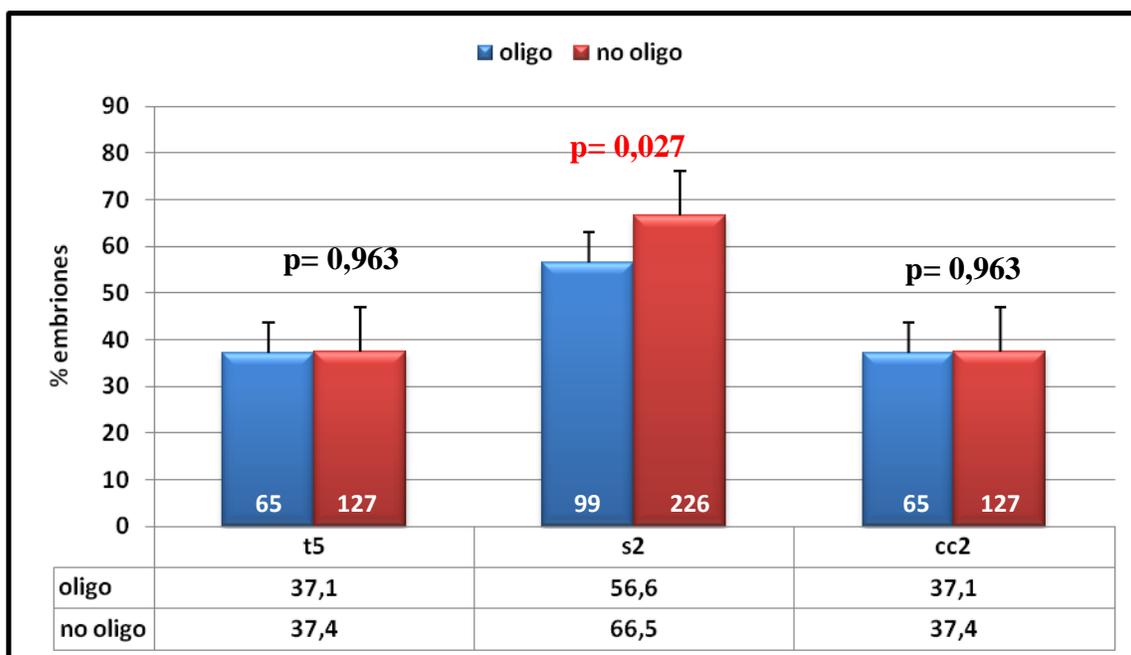


Figura 30. Tiempos óptimos de división y concentración espermática.

**3.6.- Categorías morfocinéticas y concentración espermática.** La combinación de variables morfológicas y cinéticas permite el desarrollo de un algoritmo que aporta información adicional a los criterios de selección embrionaria.

El análisis comparativo de la distribución embrionaria en las distintas clases que componen el algoritmo indicó la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos de estudio; sin embargo, sí fue posible describir una tendencia positiva a favor de las muestras consideradas como no patológicas (Figura 31), ya que los embriones derivados de estos ciclo de tratamientos son más numerosos en las clases descritas como de buen pronóstico evolutivo. Por el contrario, en los ciclos en los que se trabajó con una muestra de mala calidad seminal, la tendencia se invierte, es decir, los embriones son más numerosos en las categorías que incluyen las características morfocinéticas con peores auspicios de desarrollo (Figura 32).

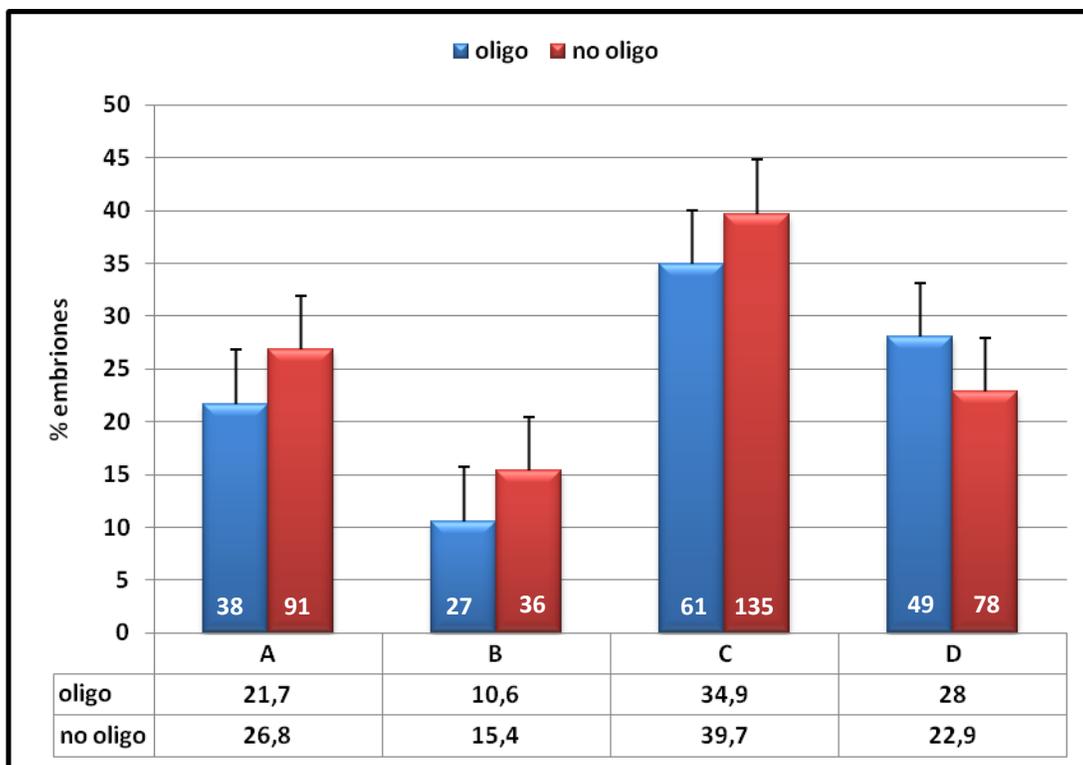


Figura 31. Categorías morfocinéticas y concentración espermática ( $p=0,151$ ).

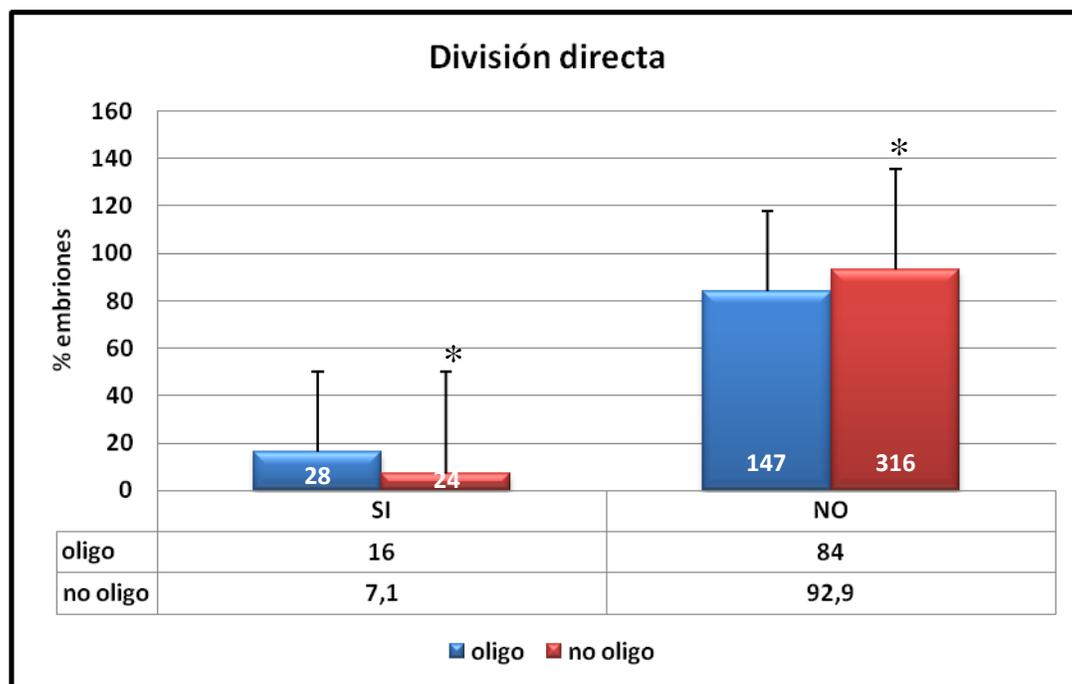


Figura 32. Proporción de embriones con división directa a embrión de 3-células en función de la concentración espermática ( $p=0,001$ )

En este caso, se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos de estudio cuando se compara la proporción de embriones que presentan una transición directa desde cigoto hasta embrión de 3-células y que está considerada como criterio de exclusión en los procesos de selección embrionaria en el momento de la transferencia.

**3.7.- Cinética de desarrollo embrionario en función de la movilidad espermática.** Las medias de los tiempo de división embrionaria correspondientes al desarrollo de cigotos derivados bien de ciclos con muestras astenozoospermicas bien de tratamiento con muestras no astenozoospermicas se muestra en la Tabla 6 (\*  $p < 0,05$ ). El examen comparativo de la cinética de desarrollo embrionario entre ambos grupos de estudio no mostró diferencias significativas, excepto en el tiempo de la primera mitosis ( $t_2$ ) y en el tiempo que necesita el embrión para alcanzar el estadio de 9-células (Figura 33).

	Astenozoospermico (n=338)		No astenozoospermico (n=220)		p
	$\mu$	IC 95%	$\mu$	IC 95%	
<b>dpn (h)</b>	24,3	23,9-24,7	23,9	23,5-24,3	0,171
<b>t2 (h)</b>	27,2	26,9-27,5	26,6	26,1-27,1	<b>0,047</b>
<b>t3 (h)</b>	35,9	34,7-37,1	35,4	33,9-37,0	0,607
<b>t4 (h)</b>	40,5	39,8-41,2	39,5	38,6-40,4	0,056
<b>t5 (h)</b>	50,9	49,9-51,9	50,7	49,7-51,7	0,797
<b>t6 (h)</b>	54,0	53,0-55,0	53,4	52,4-54,4	0,446
<b>t7 (h)</b>	56,4	55,3-57,5	55,6	54,5-56,7	0,322
<b>t8 (h)</b>	58,7	57,7-59,7	58,4	57,6-59,2	0,284
<b>t9 (h)</b>	59,2	57,7-60,7	62,0	60,2-63,8	<b>0,021</b>
<b>cc2 (h)</b>	11,4	10,9-11,9	11,5	11,0-12,0	0,792
<b>cc3 (h)</b>	12,3	11,5-13,1	12,6	11,7-13,5	0,643
<b>s2 (h)</b>	1,8	1,4-2,2	1,6	1,1-2,1	0,513
<b>s3 (h)</b>	11,4	9,3-13,5	12,1	9,3-14,9	0,702
<b>t4-t2 (h)</b>	12,1	11,1-13,1	11,8	10,7-12,9	0,791
<b>t8-t4 (h)</b>	16,1	14,5-17,7	16,6	14,5-18,7	0,710
<b>embriones (D5)</b>	<b>Astenozoospermico (n=162)</b>		<b>No astenozoospermico (n=120)</b>		
<b>M (h)</b>	91,8	90,5-93,1	89,8	88,1-91,4	0,056
<b>B (h)</b>	104,7	103,5-106,0	103,8	102,3-105,3	0,343
<b>BE (h)</b>	117,8	114,0-121,6	114,3	108,8-119,9	0,343

Tabla 6. Cinética del desarrollo embrionario en función de la movilidad espermática

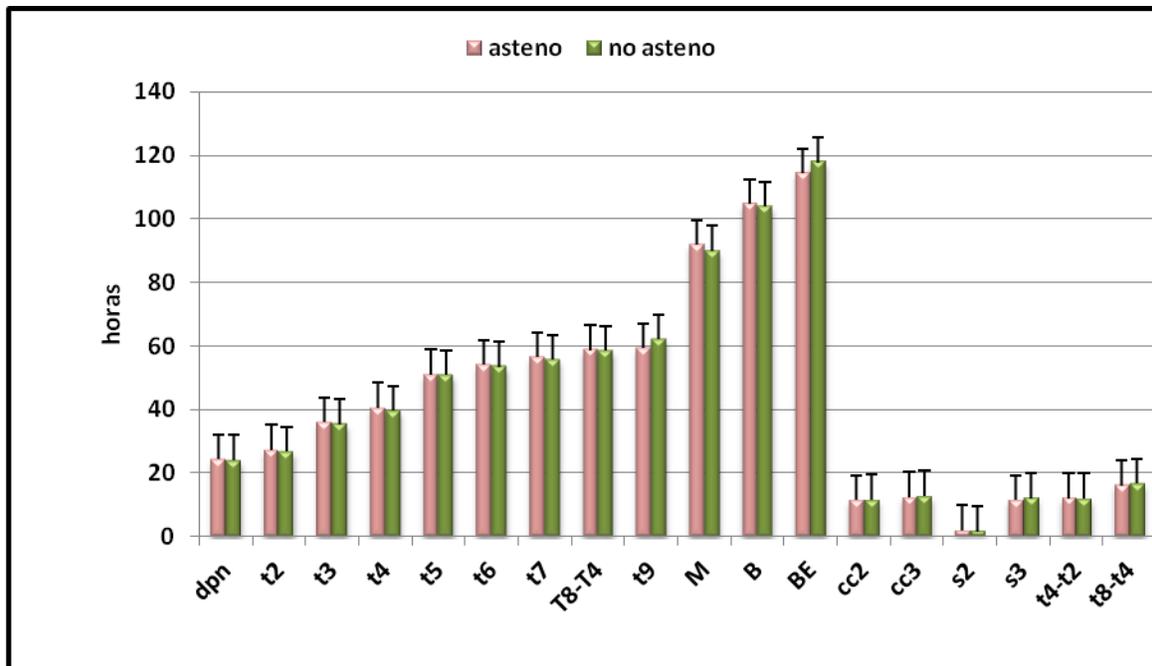


Figura 33.- Cinética de desarrollo embrionario en función de la movilidad espermática

**3.8.- Intervalos óptimos de división y movilidad espermática.** Cuando se examinó el contingente de embriones en cada uno de los tiempos óptimos de división, se detectaron diferencias significativas en los tres parámetros cinéticos evaluados, t5, s2 y cc2 (Figura 34); los embriones derivados de ciclos en los que se trabajó con muestras seminales con una fracción adecuada de espermatozoides móviles presentaban una calidad embrionaria significativamente mejor que los embriones derivados de ciclos en los que se trabajó con muestras astenozoospermicas, lo que se tradujo en mayores perspectivas de desarrollo y de potencial de implantación.

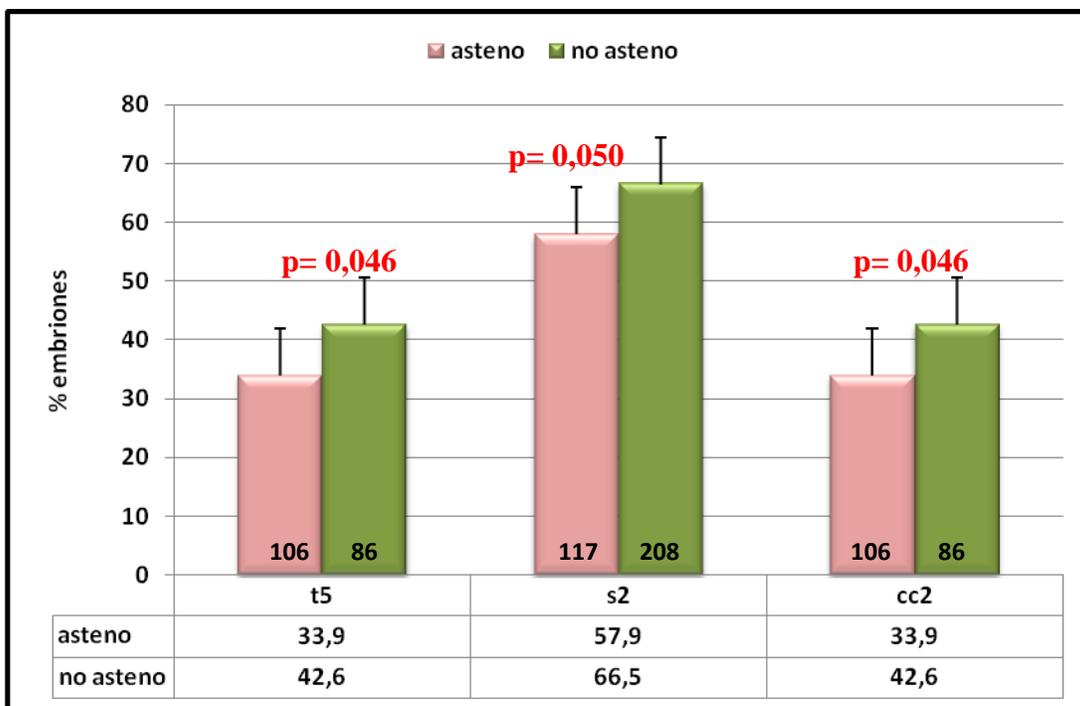


Figura 34. Tiempo óptimos de división y movilidad espermática.

**3.9.- Categorías morfocinéticas y movilidad espermática.** Cuando se analizó el porcentaje de embriones en división en cada una de las categorías morfocinéticas definidas por el algoritmo, se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estudio (Figura 35). La proporción de embriones con mejores características morfocinéticas era mayor entre las muestras con mayor presencia de espermatozoides móviles, lo que indicó la importancia de la calidad seminal en la determinación de la calidad embrionaria. Estos resultados se confirmaron cuando se comparó la distribución embrionaria en uno de los criterios de exclusión; en este caso, las muestras patológicas astenozoospermicas resultaron en embriones con mayor tendencia a presentar una transición directa desde cigoto hasta un embrión de 3-células (Figura 36).

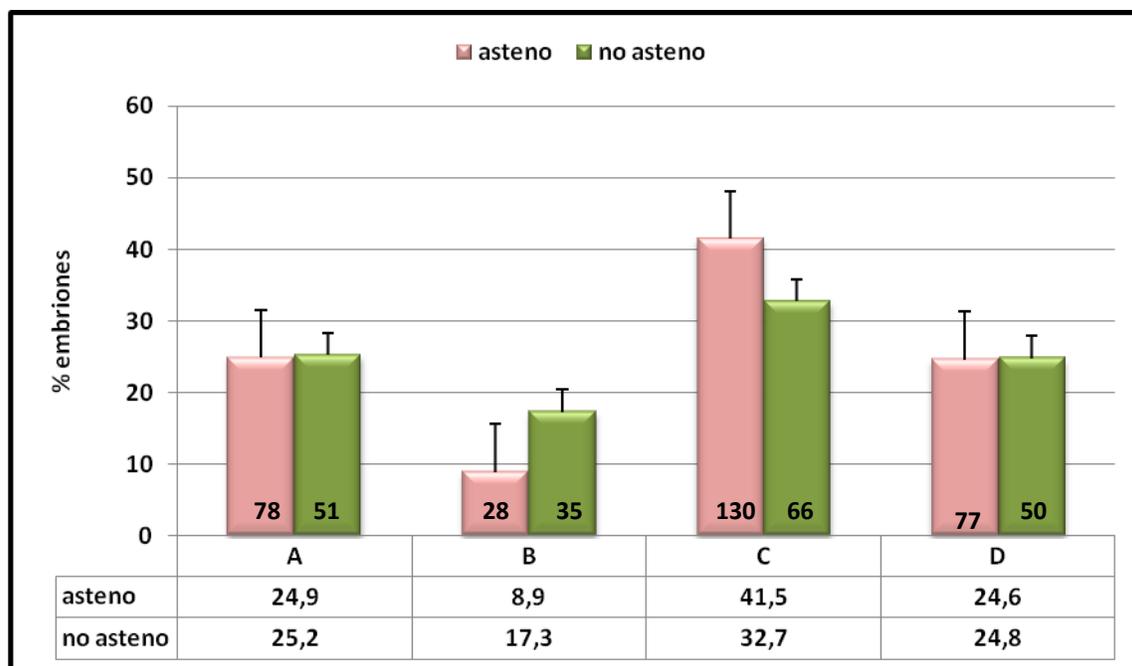


Figura 35. Categorías morfocinéticas y movilidad espermática ( $p=0,024$ )

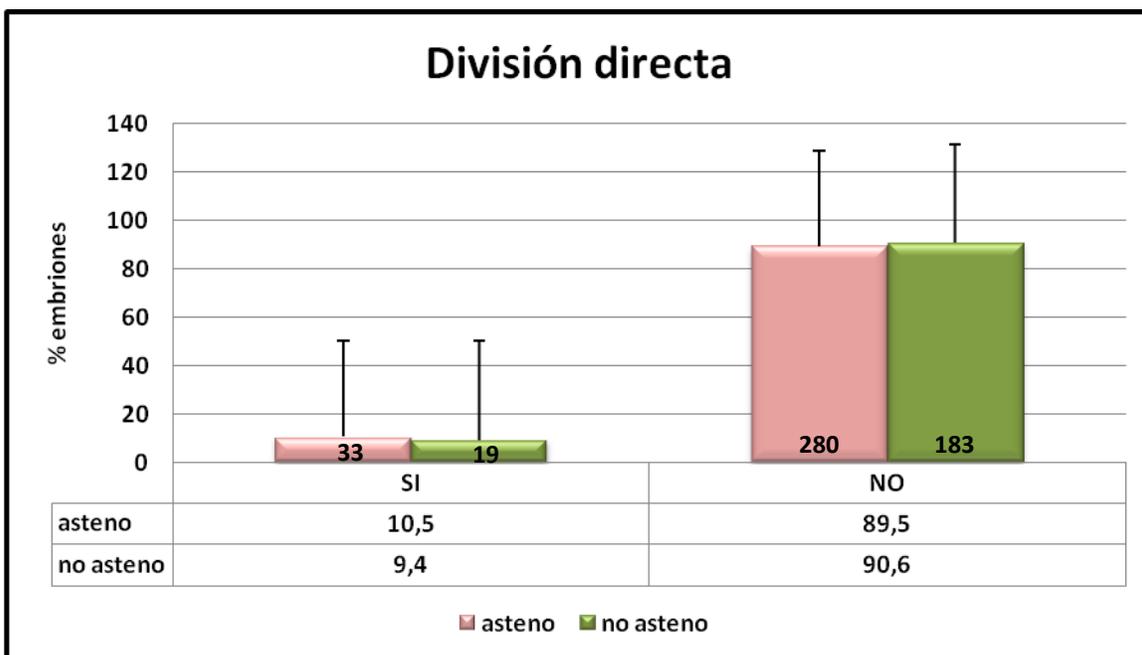


Figura 36. Proporción de embriones con división directa a embrión de 3-células en función de la concentración espermática ( $p=0,676$ )

# **DISCUSIÓN**

Con más de cuatro millones de recién nacidos vivos, la fecundación *in vitro* (FIV) se ha convertido en una alternativa ampliamente utilizada por parejas que no pueden tener hijos. De hecho, para algunas es su única opción.

Han transcurrido más de tres décadas desde que se logró el primer embarazo a término mediante esta técnica (Steptoe and Edwards 1978) pero a día de hoy, desafortunadamente, el porcentaje de nacidos vivos se mantiene en tasas relativamente pobres debido fundamentalmente a la baja probabilidad de que un embrión transferido individualmente al útero materno acabe engendrando un bebé. Teniendo en cuenta estas razones, los centros de reproducción asistida transfieren normalmente más de un embrión por ciclo con la esperanza de aumentar las posibilidades de éxito. Mientras esta estrategia ha ayudado a mantener las tasas de gestación en niveles aceptables, también ha supuesto un aumento significativo en la proporción de embarazos múltiples con las complicaciones que éstos conllevan tanto para la madre como para el feto en desarrollo. Estas gestaciones de riesgo pueden prevenirse fácilmente si se transfieren menos embriones al útero materno en cada ciclo; sin embargo, restringir la cifra de embriones transferidos resulta contraproducente en cuanto a las posibilidades que tiene la pareja de conseguir una gestación en un ciclo en concreto. La razón que explica esta disminución en las perspectivas de éxito es que los embriones generados mediante técnicas de reproducción asistida son extremadamente variables en términos de su capacidad para derivar en una gestación viable; en los casos en los que se aplica una política de transferencia única (*single embryo transfer*, SET), es esencial que el embrión elegido para transferir sea el que presente un mayor potencial evolutivo.

La tecnología derivada de las técnicas de fecundación *in vitro* permite la observación de las primeras etapas de la fecundación y el desarrollo embrionario en cigotos humanos. Sin embargo, los problemas derivados de la manipulación embrionaria han limitado la frecuencia de las observaciones al microscopio fuera de unas condiciones de cultivo controladas y seguras, de modo que el conocimiento relacionado con las tasas de crecimiento embrionario y los cambios morfológicos se deducen a partir de la descripción de las características anatómicas de los embriones en unos momentos muy concretos de su desarrollo. Estas “imágenes fijas” de procesos tan activos como el crecimiento y el desarrollo embrionario reducen necesariamente la información

disponible para el observador de modo que sucesos breves y/o transitorios pueden pasar inadvertidos (Payne et al. 1997). Además, la mayoría de esquemas que se emplean para la evaluación de la calidad embrionaria se basan en representaciones morfológicas obtenidas en los laboratorios de Embriología y aunque se han publicado una gran cantidad de estudios respecto a este tema, no se ha llegado a ningún consenso en relación a cuál es el método más seguro y fiable de estimación de la calidad embrionaria. La clasificación embrionaria basada únicamente en criterios cualitativos es muy subjetiva y puede considerarse como una de razón de peso a la hora de justificar la varianza interobservadores introducida por estos métodos. A la vista de estas consideraciones, los investigadores han centrado gran parte de sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas estrategias que mejoren las oportunidades de conseguir una gestación mediante la selección de los mejores embriones desde el punto de vista de su calidad y competencia evolutiva.

La tecnología de análisis de imagen podría considerarse una opción válida a la hora de superar la subjetividad de los criterios actuales de selección embrionaria en el caso de aportar una valoración cuantitativa de los aspectos clave del desarrollo embrionario. Las técnicas que implican la grabación del desarrollo embrionario son cada vez más fáciles de usar y conforme su utilidad se ha hecho evidente, la tecnología ha mejorado. Actualmente, el registro del desarrollo embrionario se realiza digitalmente con imágenes tomadas en intervalos específicos de tiempo mediante un software especializado instalado en el ordenador; la adquisición de imágenes digitales en combinación con herramientas informáticas especializadas en el procesamiento de las mismas permite la edición, el registro y la visualización de la secuencia cronológica (concepto definido con el termino anglosajón de *time-lapse*) que define el desarrollo embrionario (Ezin and Fraser 2008). Las técnicas *time-lapse* de análisis de imagen registran el desarrollo embrionario en el tiempo; el ensamblaje y alineación de estas imágenes en una secuencia animada revela características sorprendentes de la dinámica intracelular que de otro modo no hubieran podido ser observadas.

El *time-lapse* se aplicó por primera vez al estudio de embriones de mamíferos en 1924 (Lewis and Gregory 1929). Se trabajó con blastocistos de conejo y se observó que los blastocistos maduros son capaces de contraerse y expandirse periódicamente;

posteriormente, se describieron estos mismos sucesos en los blastocistos de otros mamíferos, incluyendo a los embriones humanos. Gracias al empleo de esta tecnología se realizaron otros descubrimientos como la importancia de las divisiones celulares en el curso del desarrollo embrionario, la duración de los ciclos celulares, cuáles son las etapas críticas del desarrollo preimplantatorio, etc. La posibilidad de combinar unas condiciones de cultivo controladas y seguras con una tecnología de análisis de imagen es un hecho de especial importancia en relación a la posibilidad de obtener una gran cantidad de información acerca del desarrollo individual de los embriones junto con la estimación directa de su calidad (Karnaukhov et al. 2009).

Los sistemas de análisis de imagen minimizan las perturbaciones del medio de cultivo al integrar la incubación y la valoración embrionaria en un único dispositivo, al mismo tiempo que suponen un gran avance en la comprensión de los acontecimientos circunscritos a la fecundación y las primeras etapas del desarrollo embrionario. La oportunidad de monitorizar los patrones dinámicos de desarrollo aporta a los embriólogos información adicional a los criterios de selección y contribuye al establecimiento de ciertos vínculos entre la ocurrencia de un fenómeno en un determinado momento y el posterior potencial evolutivo del embrión (Yamagata et al. 2009). En esencia, la microcinematografía ofrece una posibilidad única de estudiar el desarrollo embrionario mediante métodos no invasivos. Con estos nuevos dispositivos que combinan incubador y microscopio es posible realizar un seguimiento continuo del desarrollo embrionario mediante la adquisición de imágenes digitales de alta resolución, cuyo almacenamiento permite detectar y comprobar retrospectivamente la aparición de sucesos críticos relacionados con el desarrollo embrionario. De acuerdo a estas consideraciones, uno de los primeros objetivos definidos fue validar su uso clínico.

Previamente, se ha mencionado que la selección embrionaria en función de criterios morfológicos no siempre se asocia a elevadas tasas de gestación e implantación; este hecho conduce a la necesidad de considerar nuevos criterios para el reconocimiento e identificación de los embriones con mejor pronóstico reproductivo. El análisis de imagen mediante time-lapse aporta una gran cantidad de información relacionada con el crecimiento y evolución embrionaria en comparación con las prácticas convencionales de observación intermitente, ya que permite el examen morfológico del embrión sin

necesidad de sacarlo de las condiciones óptimas de gas y temperatura del incubador; de esta manera, se reduce el estrés ambiental experimentado por el embrión lo que puede conducir a una mejoría de la calidad embrionaria y en consecuencia, de las tasas de gestación.

Cuando se comparó el desarrollo embrionario entre dos sistemas de cultivo, un incubador con un sistema de time-lapse integrado (Embryoscope, Unisense Fertilitech, Aarhus, Denmark) y un incubador convencional se demostró que los embriones sujetos a la monitorización de su desarrollo no se ven afectados por las condiciones continuas de observación asociadas al Embryoscope, por lo que se pudo concluir que esta nueva tecnología abre nuevas rutas de conocimiento relacionadas con la morfología y la evolución embrionaria. En este punto es importante destacar que los embriones cultivados en estas condiciones quedan periódicamente expuestos a la luz en el momento de la toma de imágenes y que la exposición embrionaria a la luz supone un estrés adicional que puede acabar afectando al desarrollo embrionario (Nakahara et al. 2010).

A pesar del riesgo que implican estas condiciones de cultivo, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudios. La tasa de desarrollo a blastocisto y el porcentaje de viabilidad embrionario fue similar entre ambos sistemas de cultivo, tanto si se valoró la procedencia embrionaria (time-lapse vs incubador convencional) como si se tuvo en cuenta el día de la transferencia (día 3 vs día 5). De acuerdo a los resultados gestacionales, tampoco se observaron diferencias relevantes confirmándose la eficacia de este nuevo protocolo de actuación tanto en investigación básica como en clínica. La validación de un sistema de cultivo con un dispositivo integrado de análisis de imagen conduce al diseño de nuevos experimentos cuyo propósito es definir nuevos parámetros de selección embrionaria que mejoren los resultados de un tratamiento de reproducción asistida.

Este diseño experimental está estrechamente relacionado con publicaciones recientes (Wong et al. 2010) que evalúan la vigencia de la tecnología de time-lapse. Descartando las diferencias metodológicas entre este trabajo y los resultados del presente estudio, en ambos casos se pone de relevancia la utilidad del time-lapse como herramienta de investigación. En un futuro se espera que la aplicación de estas innovaciones tecnológicas promueva el desarrollo de nuevos métodos no invasivos de

valoración de la calidad embrionaria. Las técnicas de análisis de imagen son útiles no sólo para explicar los cambios morfológicos que ocurren en los embriones humanos sino que también ayudan a evaluar la importancia fisiológica de los mismos durante las primeras etapas del desarrollo. La incorporación de esta tecnología a la práctica habitual de los laboratorios de Embriología supone una magnífica oportunidad de observar la actividad celular y el desarrollo embrionario de una manera coherente e ininterrumpida, hecho que no sería posible si el análisis de la evolución embrionaria se realizara en tiempo real. Con estos resultados, es posible afirmar que los sistemas de análisis de imagen, y en este caso el Embryoscope, aportan unas condiciones de cultivo que no afectan de ninguna manera al desarrollo embrionario desde el punto de vista de la calidad morfológica, tasas de desarrollo a blastocisto y viabilidad de los mismos, entendida como la posibilidad que tiene un embrión de ser transferido y/o congelado.

La selección fiable de embriones competentes para la transferencia es un factor clave para el éxito de un tratamiento de fecundación *in vitro* (FIV). Sin embargo, las características de un “embrión óptimo” y las cuestiones relacionadas sobre cómo identificar a los embriones con mayor potencial de implantación son objeto de un intenso debate.

La prolongación del cultivo *in vitro* y la transferencia de blastocistos han surgido como procedimientos eficaces en el progreso experimentado por las técnicas de reproducción asistida, lo que permite la selección embrionaria en etapas más avanzadas del desarrollo, donde los embriones supervivientes tienen más probabilidades de converger en un buen resultado. Desde el primer nacimiento obtenido mediante FIV en 1978, decidir cuándo y en qué etapa del desarrollo hay que transferir al embrión ha supuesto un problema (Sills and Palermo 2010). La transferencia prematura del embrión en división al útero materno puede contribuir en parte a las relativamente bajas tasas de implantación asociadas al FIV; por el contrario, posponer la transferencia hasta el estadio de blastocisto supone doblar las tasas de implantación en comparación con la transferencia de embriones en etapas más tempranas del desarrollo (Graham et al. 2000, Scholtes and Zeilmaker 2006). Sin embargo, prolongar el cultivo puede conducir a la cancelación de ciclos en los que no hay blastocistos apropiados para transferir. La ventaja global del cultivo de blastocistos considerado como una forma de aumentar la tasa de

bebé en casa se mantiene como un asunto bastante controvertido (Blake, D.A, Proctor, M and Johnson, N.P 2004). Pueden considerarse dos argumentos que expliquen los mejores resultados obtenidos con la transferencia de blastocistos; en primer lugar, realizar la transferencia en día 5 de desarrollo refleja un contexto más fisiológico ya que representa la etapa del desarrollo en la que el embrión llega al útero materno en un ciclo no estimulado (Gardner 1998) y en segundo lugar, la dilatación del periodo de cultivo hasta el día 5-6 post-fecundación, después de la activación del genoma embrionario, ayuda a seleccionar a los embriones con mayor probabilidad de supervivencia en útero.

Se ha sugerido que el cultivo embrionario hasta blastocisto podría resultar útil a la hora de seleccionar a los embriones más competentes, ya que aquéllos que presentan un desarrollo anormal no suelen progresar hasta este estadio; por lo tanto, evaluar la capacidad del cigoto para evolucionar *in vitro* hasta blastocisto puede considerarse equivalente a un proceso de selección natural de los embriones, aunque la simple capacidad del cigoto para desarrollarse a blastocisto no refleja necesariamente la habilidad del embrión para implantar y desarrollarse satisfactoriamente hasta un recién nacido vivo. El aumento en las tasas de implantación asociado a la transferencia de blastocistos también se ha visto que mejora las tasas de gestación con respecto a los embriones en etapas anteriores del desarrollo (Gardner et al. 1998, Milki et al. 2000).

La estimación de la calidad embrionaria previa a la transferencia es notoriamente subjetiva, con aspectos como la nucleación, el número de células, la fragmentación y la simetría celular actuando como las variables morfológicas más usadas durante los procesos de selección embrionaria. Una posible alternativa se basa en la correlación entre la competencia embrionaria y la tasa de división (Gonzales et al. 1995, McKiernan and Bavister 1994); el desarrollo embrionario incluye una secuencia dinámica de acontecimientos en los que la morfología embrionaria varía significativamente en un intervalo de pocas horas (Lemmen et al. 2008). Las prácticas habituales de evaluación embrionaria, que constan de un número limitado de observaciones, pueden no detectar variaciones sutiles entre distintos embriones, como es el caso de la progresión desde una división embrionaria hasta la siguiente. En comparación con los métodos tradicionales de valoración morfológica, que presentan un carácter marcadamente estático, el concepto de progresión embrionaria refleja los cambios dinámicos del embrión (crecimiento y

desarrollo) a lo largo del tiempo; hablar de progresión implica obtener toda la información procedente de observaciones seriadas mientras que el examen morfológico supone “echar un vistazo” al embrión en intervalos muy concretos de tiempo, hecho que alcanza su máxima importancia el día de la transferencia embrionaria (Rehman et al. 2007).

El tiempo de la primera división zigótica se ha aplicado con éxito como marcador de calidad embrionaria en ciclos de FIV para la identificación de los embriones de mejor calidad (Sakkas et al. 1998, Shoukir et al. 1997). Los estudios con modelos animales revelan la existencia de una conexión entre el tiempo que se necesita para completar el primer ciclo celular y el potencial de desarrollo embrionario (Lonergan et al. 1999); la teoría de que esta asociación también puede establecerse en humanos procede del hecho de que las mujeres con embriones “división temprana” en su cohorte embrionaria tienen mejores tasas de gestación e implantación que aquellas mujeres que carecen de ellos (Lundin et al. 2001, Sakkas et al. 1998). Este hallazgo se corrobora posteriormente cuando se encuentra que los blastocistos derivados de embriones con división temprana son morfológicamente de mejor calidad que los que proceden de embriones que comienzan a dividirse más tarde (Fenwick et al. 2002, McLaren and Bowman 1973, Salumets et al. 2003). Este hecho se atribuye específicamente a las diferencias en el tiempo de la primera división más que a las variaciones en el ritmo de progresión en los siguientes ciclos celulares. Por lo tanto, la velocidad de desarrollo embrionario parece estar correlacionada con la capacidad para evolucionar hasta blastocisto y con la calidad resultante del mismo.

El objetivo principal de un ciclo de FIV es la transferencia de un único embrión mediante el uso de tecnologías seguras que culminen en el nacimiento de un bebé sano. La monitorización del desarrollo embrionario mediante un sistema time-lapse de análisis de imagen aporta la información necesaria para obtener una visión global de los parámetros cinéticos que caracterizan el desarrollo el embrionario. Los estudios recientes con time-lapse correlacionan variables morfocinéticas como la reaparición de los pronúcleos después de la primera división celular y/o la sincronía del segundo y tercer ciclo celular con el potencial de implantación del embrión (Lemmen et al. 2008); posteriormente, se observa que el desarrollo embrionario hasta blastocisto en humanos

está estrechamente relacionado con un conjunto de parámetros clave del desarrollo embrionario temprano como la duración de la primera citoquinesis y el intervalo de tiempo entre las sucesivas divisiones que comprenden las primeras etapas del desarrollo (Wong et al. 2010); este estudio concluye que es posible predecir con un alto grado de fiabilidad la progresión embrionaria hasta blastocisto en función de los tiempos de los primeros ciclos celulares. Sin embargo, ninguno de estos embriones se transfirió, por lo que no se demuestra si los embriones con la cinética de desarrollo propuesta tenían mejores tasas de implantación que los embriones que no seguían esta cronología determinada.

La búsqueda de factores pronóstico del potencial de desarrollo embrionario se considera como uno de los campos más prometedores para mejorar el rendimiento y la eficacia de un tratamiento de fecundación *in vitro* mediante la identificación de los mejores embriones para transferir (Scott et al. 2000). Uno de estos factores incluye a la cinética del desarrollo embrionario temprano hasta el estadio de blastocisto, la cual puede registrarse mediante una tecnología automática y no invasiva, que unida a un software informático potente puede generar datos consistentes y objetivos que eviten las limitaciones inherentes a las valoraciones subjetivas de la morfología en periodos discretos de tiempo.

En el actual estudio, tras realizar el seguimiento de un amplio conjunto de embriones (n=834) con un sistema time-lapse de análisis de imagen, se observan diferencias significativas en los patrones temporales de desarrollo entre los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto y los que no. Los datos indican que los embriones que comienzan a dividirse antes tienen una probabilidad significativamente más alta de continuar con su desarrollo hasta día 5 en comparación con los embriones que se dividen más lentamente; se demuestra que la capacidad embrionaria de crecimiento hasta blastocisto está vinculada a la cinética del desarrollo embrionario temprano por lo que es posible afirmar que la tasa de desarrollo a blastocisto está asociada a una secuencia altamente regulada de procesos celulares que se inician en el mismo momento de la fecundación.

Wong et al. (2010), mediante un análisis de time-lapse de 100 cigotos descongelados, correlacionó imágenes de time-lapse y datos moleculares a lo largo del

desarrollo embrionario hasta blastocisto. Los resultados de este trabajo difieren de los obtenidos por Wong et al. (2010), quienes fueron capaces de predecir la posibilidad de desarrollo a blastocisto desde un embrión en división con un alto grado de especificidad y sensibilidad basado en tres parámetros morfocinéticos: 1) la duración del segundo ciclo celular, es decir, el tiempo que el embrión se encuentra en 2-células, cc2; 2) la sincronía entre el segundo y tercer ciclo celular, o el tiempo que permanece el embrión en tres-células, s2; y 3) la duración de la citoquinesis que genera dos células hijas. En el trabajo que se está discutiendo, se encuentran diferencias significativas en cc2 y s2 entre los embriones que evolucionan hasta blastocisto y los que no; sin embargo, para cc2 no se aprecian variaciones relevantes en cuanto a las características morfológicas de los blastocistos. Sin embargo, previamente sí se habían detectado diferencias significativas en estos parámetros (cc2 y s2) entre los embriones que implantan y los que no (Meseguer et al. 2011); ambos parámetros se incluyeron en el modelo jerárquico propuesto.

En el presente trabajo se encuentran diferencias significativas en cuanto a sincronía, s2, entre los blastocistos de buena calidad y los que no se caracterizan por unas buenas condiciones morfológicas. El sistema de time-lapse toma imágenes cada 20 minutos y no fue posible determinar la duración exacta de la citoquinesis, por lo que no se pudo establecer una comparación directa entre los resultados de este estudio y los obtenidos por Wong et al. (2010). Según los dos criterios que se pudieron evaluar, cc2 y s2, y basándose en la estimación de la duración de la citoquinesis, resulta controvertido afirmar que es posible predecir el desarrollo a blastocisto según los criterios propuestos por Wong teniendo en cuenta que la base de datos de este trabajo es considerablemente mayor (n=834) que el conjunto de embriones estudiados por Wong y sus colaboradores (n=100). Una posible razón que explique la discrepancia entre los resultados puede deberse a las diferencias en el origen embrionario, embriones frescos usados en la práctica clínica vs embriones congelados donados a la ciencia, o a contrastes en cuanto a medios de cultivo, protocolos de estimulación, ...

Puesto que la morfología del blastocisto tiene un profundo impacto en el potencial de implantación (Gardner et al. 2002) se valoran una serie de aspectos morfológicos de los blastocistos en términos de las características de la masa celular interna y del trofoectodermo; los datos obtenidos muestran que la cinética del desarrollo embrionario

está relacionada no sólo con la tasa de formación del blastocisto sino también con su propia morfología. Estos embriones manifiestan cierta tendencia hacia un inicio precoz de las divisiones celulares y una mayor sincronía entre ellas, que los lleva a confluir en un blastocisto de buena calidad, definido por la presencia de una masa celular interna compacta y un trofoectodermo cohesivo. Desafortunadamente Wong et al (2010) no tiene en cuenta las características morfológicas de los blastocistos por lo que se no puede realizar una comparación directa con sus resultados.

Para los pacientes sometidos a un tratamiento de reproducción asistida, el cultivo *in vitro* de blastocistos supone un conjunto de ventajas potenciales respecto a la transferencia normalizada de embriones en división, ya que la prolongación del periodo de cultivo facilita la identificación de los blastocistos más adecuados y se considera una forma de mejorar las tasas de implantación y los resultados clínicos (Sills and Palermo 2010). Las valoraciones morfológicas tradicionales se basan en breves observaciones de los embriones en uno o varios momentos del desarrollo, que adquieren su máxima importancia el día de la transferencia. Se desconoce qué es lo que ocurre entre estos periodos de observación, ya que el número de observaciones se limita al mínimo para reducir el estrés embrionario fuera del incubador, así como los riesgos asociados a una manipulación excesiva. Estas restricciones son superadas por los sistemas de análisis de imagen que aportan información valiosa acerca de los cambios dinámicos de los embriones en división. La adquisición de información de carácter morfocinético acerca de los detalles del desarrollo embrionario temprano puede ayudar en un futuro a la selección embrionaria en el momento de la transferencia, sin necesidad de prolongar el cultivo hasta blastocisto como propone Wong (2010). Una clara ventaja de transferir los embriones en día 3 de desarrollo es que se acorta la exposición del embrión a las condiciones artificiales del cultivo *in vitro* donde la incidencia de cambios en el “imprinting” puede causar problemas de índole epigenética.

El cultivo de blastocistos aporta información adicional durante los procesos de selección embrionaria y la combinación de las evaluaciones morfocinéticas con gradientes morfológicos del blastocisto puede resultar ventajosa además de ampliar el periodo para la realización de cualquier tipo de análisis genético si fuera necesario. Dado que la progresión embrionaria hasta blastocisto no es sinónimo de normalidad

cromosómica, la mayoría de embriones que interrumpen su desarrollo durante el cultivo prolongado se caracterizan por presentar múltiples aneuploidías (Jones et al. 1998) por lo tanto, ampliar el tiempo de cultivo hasta día 5 promueve el desarrollo de embriones euploides hasta blastocisto además de permitir el reconocimiento de aquellos embriones con el potencial suficiente para continuar creciendo bajo el control del propio genoma embrionario. En este trabajo, cuando se evalúa la distribución tanto de los blastocistos como de los blastocistos de buena calidad en los cuartiles definidos para cada variable cinética se identifica un “intervalo óptimo”, por lo que es factible proponer la existencia de una relación entre la capacidad de desarrollo hasta día 5 y la duración de las divisiones celulares. Estos resultados coinciden con los de otros estudios que demuestran el enlace entre cinética de desarrollo y la posibilidad que tiene un embrión de progresar hasta blastocisto (Arav et al. 2008, Fenwick et al. 2002, Gonzales et al. 1995).

En el trabajo publicado por Meseguer et al. (Meseguer et al. 2011) se investigan las relaciones entre un conjunto de parámetros morfocinéticos que caracterizan el desarrollo embrionario y el posterior potencial de implantación embrionaria en día 3. Los embriones se seleccionaron de ciclos de tratamiento donde el número de sacos gestacionales coincidía con el número de embriones transferidos así como de ciclos donde todos los embriones transferidos no implantaron, Los autores encontraron un conjunto de diferencias embrionarias entre los embriones que implantaron y los que no, y proponen un modelo de selección jerárquica basado en 1) criterios primarios: tiempo de división hasta un embrión de 5-células,  $t_5$ ; 2) criterios secundarios: sincronía en la transición de un embrión de 2 a 4-células,  $s_2$ ; y 3) criterios terciarios: duración del segundo ciclo celular,  $cc_2$ . Mediante la aplicación de este modelo de selección, se pretendió conocer si este sistema también ayuda a predecir la aparición del blastocisto, ya que todos los embriones que implantan deben alcanzar esta etapa del desarrollo. Sin embargo, el proceso de implantación embrionario incluye otros aspectos como el estado de receptividad endometrial por lo que es posible que los parámetros morfocinéticos que predicen el desarrollo a blastocisto no sean los mismos que los que predicen la implantación. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que una amplia fracción de embriones cuyas primeras divisiones tienen lugar en los rangos óptimos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación, alcanzan el estadio de blastocisto,

particularmente para t3, t5, cc2 y s2. Sin embargo, cuando se inspecciona el nivel morfológico, aparecen diferencias significativas en t5, lo cual coincide con las anotaciones previas realizadas por Meseguer et al. (2011) que define a t5 como el mejor indicador del potencial de implantación. Se concluye que los embriones que se dividen entre 48.8-56.6 horas, no sólo tienen más probabilidades de implantar sino también mayor porcentaje de desarrollo a blastocisto y a un blastocisto de buena morfología.

Se necesitan más estudios que desentrañen los mecanismos subyacentes a la unión entre cinética del desarrollo embrionario temprano y formación del blastocisto. Una de las hipótesis planteadas es que la transición desde un ovocito fecundado a un embrión de 2-células reside en una secuencia ordenada y altamente regulada de las etapas que componen el ciclo celular y que se inician con una elevación transitoria de las concentraciones intracelulares de calcio inducidas por la entrada del espermatozoide (Kline and Kline 1992). Se han publicado estudios que demuestran que estas variaciones en los niveles de calcio influyen sobre el tiempo de formación de los pronúcleos, los cuales marcan la entrada a la fase G1 del ciclo celular (Vitullo and Ozil 1992), la capacidad de desarrollo a blastocisto (Ozil 1990) y el potencial de implantación (Ozil and Huneau 2001); siguiendo estos mismos argumentos, también se sabe que la transición entre las etapas G2 y M del ciclo celular depende de la actividad relacionada con el calcio adquirida durante la activación ovocitaria y la fecundación. Teniendo en cuenta estos trabajos, se puede pensar que la asincronía en el tiempo de la primera división embrionaria y la variabilidad en cuanto a la capacidad de desarrollo a blastocisto se deben a diferencias en la señal inductora de las variaciones de calcio y/o en la respuesta del ovocito a este estímulo. El hecho de que los ovocitos adquieran su capacidad de respuesta a las variaciones de los niveles de calcio durante su proceso de maduración indica que el grado de madurez ovocitaria puede ser importante a la hora de determinar el inicio de las divisiones embrionarias y su posterior potencial de implantación (Herbert et al. 1997).

Una posible alternativa a esta hipótesis reside en la fidelidad de replicación del material genético. La duración de la fase S del ciclo celular influye sobre la formación del blastocisto de modo que cuanto más se prolonga esta fase de síntesis del DNA, mayor es la probabilidad de que el embrión evolucione a blastocisto (Comizzoli et al. 2000). Sin embargo, la regulación en el tiempo necesario para entrar en la fase S difiere entre

especies, pudiendo estar regulada por factores maternos en ratón y por factores paternos en el caso de embriones ovinos. Es posible que los embriones con una fase S más corta estén predispuestos a sufrir errores en la replicación del DNA, lo cual resulta incompatible con un desarrollo normal a blastocisto e impondría cierto retraso en la progresión a través de las fases G2 y M del primer ciclo celular (Nigg 2001)

El concepto que define a la división temprana como un buen indicador de la competencia embrionaria está ampliamente extendido (Lundin, 2001), hecho que se confirma con estos resultados, ya que se observa una mayor proporción de blastocistos y de blastocistos de buena calidad derivados de embriones que se dividen más rápido. De todas maneras, no se asume que estos embriones presenten necesariamente mejores perspectivas de viabilidad (Van Blerkom 1997) ya que no hay que descartar la influencia de otros factores que también son importantes para la implantación; por ejemplo, se ha observado que los embriones cuya primera división se produce en los cuartiles intermedios mejoran los resultados de implantación, apoyando la idea de que existe una ventana de implantación para todas las divisiones embrionarias (Meseguer et al. 2011).

Se compara la tasa de desarrollo a blastocisto y la calidad morfológica de los mismos de acuerdo a sus características morfocinéticas. Ambas variables de estudio eran más altas para embriones que en día 3 estaban incluidos en la clase A del modelo de selección embrionaria, y descendían gradualmente hacia la clase D, caracterizada por la menor presencia de blastocistos y de peor calidad. Existe una asociación evidente entre la tasa de desarrollo a blastocisto y el sistema de cribaje morfocinético que determina la implantación.

Por último, se obtienen mejores resultados para embriones simétricos con una transición normal desde cigoto hasta embrión de 2-células. Los embriones con un inicio temprano de las divisiones embrionarias forman una población heterogénea que depende de la calidad de la primera división mitótica. Ciray (Ciray et al. 2006) se centra en día 3 de desarrollo. La división celular y la simetría representan dos aspectos distintos pero indicativos de la concentración y distribución de los productos nucleares y citoplásmicos. Un embrión con una elevada concentración de componentes intracelulares se espera que se divida pronto y simétricamente; sin embargo, si la distribución no es homogénea entre las dos células hijas, el posterior desarrollo embrionario y la implantación se ven

comprometidos. Como resultado, un embrión asimétrico tiene menos potencial de implantación que uno simétrico.

En resumen, los resultados obtenidos indican que un seguimiento continuado del desarrollo embrionario es clínicamente viable gracias a la incorporación de nueva tecnología diseñada y certificada para su uso clínico, por lo que se recomienda proyectar estudios prospectivos para valorar si el time-lapse en combinación con el cultivo prolongado mejora las tasas de recién nacido en casa. Como uno de los principales objetivos de las técnicas de reproducción asistida es instaurar una política de transferencia de un solo embrión (*single embryo transfer*, SET) para reducir la cantidad de gestaciones múltiples, el posible uso de este modelo en la selección de los blastocistos más adecuados para transferir ayudaría en el propósito de conseguir este objetivo sin necesidad de reducir sustancialmente las tasas de éxito. El empleo de los datos derivados de los sistemas de análisis de imagen puede constituir en un futuro una alternativa de estimación de la competencia embrionaria segura, fiable y no invasiva; esta nueva tecnología supone una nueva y potente herramienta para visualizar la actividad celular y la embriogénesis de una forma ininterrumpida y coherente, que de otra forma no sería posible para un análisis en tiempo real.

Las técnicas de fecundación *in vitro* y la posterior transferencia embrionaria se han aplicado rutinariamente en los tratamientos de infertilidad durante más de 20 años, con un incremento considerable de la eficacia desde los primeros ciclos. Como resultado de unos protocolos de estimulación más efectivos, se obtienen más ovocitos por ciclo y con la introducción de las técnicas de micromanipulación mejoran los porcentajes de fecundación en los casos de infertilidad andrológica severa; además, las mejoras en las condiciones de cultivo embrionario eleva la fracción de embriones de buena calidad.

Como resultado de los avances introducidos en el área de la medicina reproductiva, las tasas de gestación por ciclo estimulado se encuentran alrededor del 30% (Andersen et al. 2005); estos resultados se logran con la transferencia de más de un embrión lo que significa una cantidad considerable de gestaciones múltiples vinculadas a la aparición de complicaciones materno-fetales. La única manera de reducir estas gestaciones de riesgo es transferir menos embriones pero de mejor calidad por lo que la

determinación de la competencia embrionaria y posterior selección de los embriones de mejor calidad es uno de los retos más importantes de los tratamientos de infertilidad.

Transferir embriones más rápidos y con mayor número de células deriva en mejores tasas de gestación e implantación (Edwards et al. 1984). La viabilidad embrionaria puede predecirse en base a aspectos morfológicos por lo que se diseñan esquemas de clasificación embrionaria que se aplican habitualmente en los laboratorios de Embriología. La selección embrionaria basada en los resultados de la valoración morfológica adquiere especial importancia el día de la transferencia; sin embargo, conocer los datos morfológicos de periodo anteriores del desarrollo aporta información útil que puede utilizarse en el proceso de selección. El tiempo transcurrido entre la fecundación y la primera división embrionaria es un parámetro objetivo y fácil de evaluar que ayuda a predecir la competencia embrionaria. A pesar de que la secuencia de las divisiones embrionarias está perfectamente establecida desde hace muchos años, el examen del tiempo invertido por el embrión en estas divisiones y su importancia en los procesos de selección embrionaria es relativamente reciente.

La fecundación en condiciones de cultivo *in vitro* puede conseguirse mediante FIV convencional y/o mediante ICSI. Durante el FIV, los ovocitos se incuban con una concentración adecuada de espermatozoides móviles durante 16-18 horas, mientras que en el ICSI, los ovocitos se tratan enzimáticamente para eliminar las células del cúmulo y se inyecta un solo espermatozoide en el citoplasma ovocitario; en ambos casos, se indica fecundación normal con la presencia de dos pronúcleos en el citoplasma ovocitario y la extrusión del segundo corpúsculo polar al espacio perivitelino. Durante un FIV convencional, la fecundación transcurre por una ruta muy parecida a la vía natural mientras que en el ICSI se omiten varios pasos de la interacción entre los dos gametos. Tras la penetración del espermatozoide se intensifica el metabolismo ovocitario, se completa la segunda división meiótica y se extruye el segundo corpúsculo polar, hecho que marca la entrada del cigoto en la fase G1 del ciclo celular (Fancsovits P, Takacs FZ, Tothne GZ, Papp Z Urbancsek J 2006); se han descrito diferencias de hasta 12 horas entre los embriones más rápidos y los más lentos.

La cinética de desarrollo embrionario puede estar influida por el método de fecundación, las condiciones de cultivo *in vitro* o por las propias características de los

gametos, las cuales también pueden ser responsables de las diferencias en la duración del primer ciclo celular. El método de fecundación afecta al tiempo transcurrido entre la fecundación y el inicio de las divisiones embrionarias; el espermatozoide precisa de varias horas para atravesar las cubiertas ovocitarias en un FIV convencional, mientras que en un ICSI se sortean varias etapas de la interacción espermatozoide-ovocito. Consecuentemente, los cigotos derivados de ciclos de ICSI inician antes su desarrollo embrionario que los cigotos derivados de ciclos de FIV.

De acuerdo con otros estudios (Lemmen et al. 2008, Plachot 2000), los resultados de este trabajo muestran que la desaparición de los pronúcleos y la primera división en los embriones derivados de ICSI es significativamente más rápida que en los embriones procedentes de tratamientos de FIV. Las diferencias cinéticas observadas pueden reflejar simplemente el tiempo transcurrido desde la inseminación hasta la fecundación en un ciclo de FIV convencional; estas variaciones se mantienen constantes pero pierden significación estadística en los estadios más avanzados de desarrollo debido a la amplia variabilidad en los tiempos de formación de estructuras como la mórula, el blastocisto y/o el blastocisto expandido. Estas diferencias también ponen de manifiesto la importancia de desarrollar métodos de observación más individualizados a la hora de valorar la cinética de las primeras divisiones embrionarias; contar con una secuencia cronológica determinada de observación embrionaria ajustada a cada técnica de fecundación es esencial para poder comparar en igualdad de condiciones a ambos tipos de embriones.

Al contrario de lo que ocurre en un ICSI, en un FIV convencional no se puede determinar con exactitud el momento de la fecundación, por lo que las diferencias observadas pueden no ser reales ya que el tiempo de referencia que se fija como punto de partida para comenzar a registrar las divisiones embrionarias es el mismo para ambos grupos de estudio ( $t_0$ = tiempo de fecundación). En los ciclos de ICSI, este valor es real mientras que en un FIV se trabaja con un valor aproximado, puesto que no se tiene en cuenta el tiempo que el espermatozoide tarda en atravesar las células del cúmulo, la zona pelúcida y la membrana del ovocito hasta acceder al citoplasma ovocitario. Para confirmar que el retraso observado en los embriones de FIV se debe a las características inherentes de la técnica y no a cuestiones relacionadas con la calidad embrionaria, se establece como tiempo de referencia un suceso perfectamente registrable en ambos

grupos de estudio como es el caso de la desaparición de los pronúcleos anterior a la primera división embrionaria ( $t_0 = \text{dpn}$ ). En este caso, desaparecen las diferencias significativas observadas anteriormente en relación al inicio de las divisiones embrionarias por lo que es posible concluir que el método de fecundación afecta a la cinética de desarrollo embrionario como consecuencia de las características intrínsecas a cada una de ellos. Con estos resultados también se confirma la necesidad de ajustar la secuencia cronológica de desarrollo embrionario a cada procedimiento en concreto. Como se ha comentado previamente, los métodos actuales de examen embrionario son estáticos por lo que pre-fijar los momentos de observación puede ser contraproducente a la hora de categorizar el estadio y la cronología del desarrollo embrionario. Este problema desaparece con el uso de los sistemas de análisis de imagen que eliminan los riesgos relacionados con la introducción de posibles sesgos debido a las posibilidades que comprenden en cuanto a seguimiento y monitorización integral del desarrollo embrionario.

Desde su introducción en 1992 (Palermo et al. 1992), el ICSI se ha convertido en una técnica cada vez más popular en los centros de reproducción asistida, siendo sus indicaciones principales la infertilidad por factor masculino severo y unas tasas de fecundación bajas en ciclos previos de FIV convencional. Sin embargo, las elevadas tasas de éxito conseguidas con el ICSI han conducido al planteamiento de si se debe practicar en todos los tratamientos de reproducción (Hall et al. 1995, Oehninger et al. 1996). Al mismo tiempo, la ausencia de selección natural y la omisión de la mayoría de las etapas conocidas de la fecundación han conducido a una serie de problemas en cuanto a la calidad embrionaria y los resultados clínicos. La evaluación segura y fiable del potencial de implantación embrionario se convierte en una cuestión crucial cuando se trata de mejorar las tasas de gestación y reducir las complicaciones derivadas de los embarazos múltiples, por lo que la calidad embrionaria se convierte en el factor dominante a la hora de predecir las probabilidades de éxito de un tratamiento de reproducción. Cuando se compara la calidad de los embriones derivados bien de ciclos de ICSI bien de ciclos de FIV, se pueden dar tres situaciones:

1.- que los embriones procedentes de ciclos de FIV sean de mejor calidad que los embriones derivados de ciclos de ICSI (Bar-Hava et al. 1997, Frattarelli et al. 2000, Hsu et al. 1999, Yoeli et al. 2008).

2.- que la calidad embrionaria sea comparable entre ambos grupos de estudio (Ruiz et al. 1997, Staessen et al. 1999, Verheyen et al. 1999).

3.- la calidad embrionaria obtenida en los ciclos de ICSI es superior a la de los ciclos de FIV (Khamsi et al. 2001, Yang et al. 1996).

Los fallos de fecundación son un fenómeno muy conocido en los ciclos de FIV y con el propósito de evitarlos se recomienda la práctica conjunta de FIV-ICSI en la cohorte embrionaria. Sin embargo, la microinyección espermática presenta algunas desventajas entre las que destacan un mayor coste económico, dificultades técnicas y agresión ovocitaria. Además, mientras que en un FIV todavía se da una selección natural del espermatozoide incluso desde una muestra seminal de menor cantidad y calidad, en el ICSI esta selección no existe sino que se trata de una “fecundación forzada” con un espermatozoide que posiblemente no hubiera logrado la fecundación por vía natural.

Debido al carácter invasivo del ICSI surgen cuestiones relacionadas con la seguridad de la técnica. Por un lado, hay estudios que no indican un aumento significativo de las anomalías congénitas en los niños nacidos después de un ICSI en comparación con los ciclos de FIV y que coincide con el rango observado en la población general (Bonduelle et al. 2002, Tarlatzis 1996), mientras que otros autores revelan que la descendencia de un tratamiento de ICSI podría tener un exceso de defectos congénitos (Wennerholm et al. 2000) y de anomalías cromosómicas (Bonduelle et al. 1998). El hecho de que los errores cromosómicos *de novo* sean ligeramente mayores en los casos de ICSI se debe probablemente a las características del varón infértil más que al propio procedimiento técnico. Otros daños potenciales del ICSI incluyen la posible microinyección de un espermatozoide anormal que pueda afectar al ovocito y al posterior desarrollo embrionario, no se puede evitar la introducción de una mínima cantidad de medio que puede contener componentes nocivos para el ovocito y la inyección traumática puede generar daño físico a las estructuras del citoplasma; además, no hay que olvidar que los ovocitos están expuestos la hialuronidasa durante el proceso de decumulación, a unas condiciones de iluminación intensa, a fluctuaciones de la temperatura y que están

sujetos a la creación de una brecha artificial en la zona pelúcida y la membrana ovocitaria. Teniendo en cuenta estos riesgos, puede postularse que los cigotos procedentes de ciclos de ICSI tengan mayor incidencia de daño celular con el consiguiente empeoramiento del desarrollo embrionario en comparación con los tratamientos en los que se aplica un FIV convencional, lo que también explicaría el menor porcentaje de desarrollo a blastocisto observado en los casos de ICSI (Dumoulin et al. 2000).

En cuanto a los trabajos que abogan por una mejor calidad embrionaria en los ciclos de ICSI, los argumentos en detrimento del FIV se basan en la incubación de los gametos con una concentración excesiva de espermatozoides en casos de teratozoospermia moderada o severa pero con un porcentaje adecuado de formas móviles (Oehninger et al. 1996). Estos hallazgos sugieren la presencia de factores “tóxicos” que son liberados por espermatozoides anormales y/o disfuncionales causando daño al embrión temprano el cual ve disminuida su calidad morfológica en comparación con los embriones de ICSI (Hall et al. 1995). Los espermatozoides humanos producen especies reactivas de oxígeno como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ); estas moléculas se sintetizan en el acrosoma del espermatozoide (Aitken and Clarkson 1987) el cual es una estructura fundamental para la fecundación del ovocito tanto *in vivo* como *in vitro*. Las especies reactivas de oxígeno son tóxicas para el espermatozoide por lo que se las considera responsables del daño embrionario observado durante el periodo de cultivo en un FIV clásico; además, tanto el espermatozoide como las células de la granulosa pueden experimentar una serie de cambios metabólicos que en última instancia alteran la fisiología del ovocito/zigoto (Yang et al. 1996).

Cuando se valora la calidad embrionaria desde un punto de vista cinético, los resultados de este trabajo muestran que los embriones derivados de ciclos de FIV son ligeramente más numerosos en cada uno de los intervalos de tiempo que predicen un mayor potencial de implantación, aunque estas diferencias no alcanzan significación estadística. La ventaja cinética adquirida por los embriones derivados de ciclos de ICSI, y que es significativa en t5 considerado el parámetro con mayor fuerza predictiva, no se traduce en una clara mejora de la calidad embrionaria, lo cual coincide con los estudios mencionados anteriormente que sugieren un deterioro de la evolución embrionaria en los

casos donde se aplica un ICSI. A pesar de que los embriones de FIV inician más tarde sus divisiones embrionarias condicionados por la propia técnica, el menor daño potencial causado al ovocito “corrige” de alguna manera el retraso inicial, por lo que cuando se valora la “calidad” de la cinética de desarrollo embrionario, las diferencias anteriores han desaparecido y los resultados se han igualado, incluso favoreciendo ligeramente a los embriones derivados de ciclos de FIV convencional. Con estos datos, también es posible descartar el hipotético efecto perjudicial de una concentración espermática excesiva durante la co-incubación de los gametos durante la fecundación *in vitro*; el intento por reproducir lo más fielmente posible la secuencia de etapas que caracterizan a la fecundación por vía natural, se refleja en un desarrollo embrionario óptimo que en última instancia aumenta las perspectivas evolutivas, y en consecuencia, las probabilidades de éxito del ciclo en cuestión.

Desde que está universalmente aceptado que el éxito de un tratamiento de reproducción asistida depende de la calidad embrionaria, una cuestión por resolver es si la disrupción mecánica del citoplasma ovocitario afecta negativamente a la morfología embrionaria. La distribución embrionaria en cada una de las categorías definidas por el algoritmo diseñado por Meseguer (Meseguer et al. 2011) se continúa con la misma línea argumental expuesta hasta ahora. La integración de parámetros morfológicos y cinéticos en un modelo que intenta optimizar los criterios de selección embrionaria favorece a los embriones derivados de ciclos de FIV, aunque de nuevo sin llegar a lograr significación estadística. Se observa que en la categoría que incluye a los criterios de exclusión, y por tanto, de peor pronóstico reproductivo, los embriones de ICSI son ligeramente más abundantes, lo cual es representativo de los riesgos inherentes a la técnica, relacionados con la inyección de un espermatozoide anormal y del daño infligido al ovocito durante la microinyección; estos embriones tienen más probabilidades de ser asimétricos, multinucleados y de dividirse directamente de cigoto a embrión de 3-células. Por el contrario, los embriones obtenidos mediante FIV convencional, no solo ven beneficiada su cinética de desarrollo embrionario sino también sus características morfológicas lo que conduce teóricamente a mejores resultados de gestación e implantación.

En resumen, es posible concluir que las diferencias metodológicas que caracterizan a cada técnica son las responsables de las diferencias cinéticas observadas

durante el desarrollo embrionario, aunque posteriormente éstas no se traduzcan en diferencias cualitativas en cuanto a calidad embrionaria y potencial de implantación.

El conocimiento de la estructura de los espermatozoides data del siglo XVII cuando Van Leeuwenhoek comunicó por primera vez la existencia de numerosos *animacula* en el fluido seminal de animales y humanos. En su descripción morfológica, reprodujo con precisión los principales componentes de los espermatozoides y documentó una amplia heterogeneidad de los mismos, y que más allá de la fiabilidad de sus observaciones, constituyó el primer documento acerca de la teratozoospermia. Los trabajos de investigación desarrollados durante los siglos XVIII y XIX establecieron el origen testicular y el papel fundamental de los espermatozoides en la fecundación. En el siglo XX, la introducción de nuevas técnicas morfológicas, bioquímicas y moleculares, junto con los avances en medicina reproductiva permitieron la caracterización de varias anomalías espermáticas en los varones infértiles; pronto se observó que había una cantidad limitada de espermatozoides anormales, inmóviles y/o muertos en los eyaculados de varones fértiles y que este porcentaje aumentaba patológicamente en situaciones de infertilidad.

A partir de estas observaciones se desarrollan conceptos como teratozoospermia, astenozoospermia y necrozoospermia para definir alteraciones que afectan negativamente a los pronósticos de fertilidad bien en condiciones naturales bien mediante el uso de técnicas de reproducción asistida. En todas estas circunstancias, la calidad individual de un espermatozoide fecundante en un ciclo de FIV convencional no puede establecerse con fiabilidad, pero la introducción del ICSI permitió la evaluación de la movilidad y la morfología de todos los espermatozoides microinyectados. Ante este panorama, algunos andrólogos destacaron la necesidad de diseñar herramientas diagnósticas para las patologías espermáticas, mientras que otros investigadores abogaron por su uso sin darle mucha importancia al diagnóstico. La publicación reciente de una serie de trabajos ha puesto de manifiesto la presencia de un componente genético y la idea de que dependiendo de la naturaleza de la patología espermática, los resultados de los ciclos de FIV/ICSI varían considerablemente (Chemes and Rawe 2003).

La calidad seminal no sólo afecta a los resultados de la fecundación, sino también al posterior desarrollo embrionario. En humanos, estos efectos paternos influyen sobre la

velocidad de desarrollo embrionario y la morfología, la tasa de desarrollo *in vitro* a blastocisto y sobre las tasas de implantación después de la transferencia embrionaria tanto en ciclos de FIV como de ICSI (Janny and Menezo 1994, Menezo et al. 1999, Meseguer et al. 2006, Meseguer et al. 2008, Parinaud et al. 1993), por lo que las contribuciones espermáticas a la embriogénesis van más allá de aportar el 50% del material genético. La infertilidad por factor masculino es responsable de aproximadamente el 50% de los casos de FIV y la amplia mayoría de los diagnósticos la definen como idiopática; sin embargo, es importante considerar los efectos potenciales de las anomalías genéticas y epigenéticas no sólo sobre la infertilidad masculina sino también sobre los resultados del tratamiento de reproducción.

La calidad embrionaria después de la fecundación puede variar según la muestra seminal empleada. Se han publicado varios trabajos que sugieren la existencia de efectos paternos (derivados del espermatozoide) sobre la calidad embrionaria en humanos (Janny and Menezo 1994, Parinaud et al. 1993, Shoukir et al. 1998) aunque sólo se evaluaba la capacidad embrionaria para desarrollarse a blastocisto y/o para implantar después del transfer. Posteriormente, para determinar la etapa del desarrollo en la que comienza a manifestarse esta influencia se analiza el primer ciclo celular después de la fecundación aplicando unos criterios de valoración de la morfología pronuclear y se demuestra que los problemas en la cinética embrionaria derivados de la calidad seminal pueden detectarse desde etapas muy precoces del desarrollo, incluso antes de que se produzca la primera división embrionaria. Se describe un fuerte vínculo entre calidad seminal, duración de la primera mitosis y deterioro del desarrollo embrionario (Tesarik et al. 2002).

Coincidiendo con las publicaciones anteriores, los resultados obtenidos en este estudio revelan que los embriones derivados de ciclos tratados con muestras oligozoospermicas/astenozoospermicas presentan cierto retraso en la cinética de desarrollo embrionario que se mantiene a lo largo de todo el periodo de cultivo y que adquiere significación estadística en las primeras divisiones embrionarias, y más concretamente en t2 para muestras seminales astenozoospermicas y en t3 para casos de oligozoospermia; en este último punto, las diferencias significativas también son evidentes en variables relacionadas con la duración de los ciclos celulares como cc2 y s3. El semen usado para la fecundación influye en el tiempo transcurrido entre la

fecundación y el inicio de las divisiones celulares por lo que es posible asumir que el potencial fecundante de la muestra seminal empleada influye sobre la duración de los primeros ciclos celulares y de la posterior cinética de desarrollo embrionario, siendo estos resultados análogos a los obtenidos por Eid (Eid et al. 1994) y Comizzoli (Comizzoli et al. 2000) aunque éste último trabaja con un modelo animal de ovocitos de bovino.

Las manifestaciones tempranas de la influencia paterna sobre el desarrollo pre-implantatorio conducen a la cuestión de la importancia de los mecanismos moleculares subyacentes; sin embargo, el empleo de ICSI para todos los ciclos incluidos en este estudio excluye la implicación de los factores que intervienen en la interacción ovocito-espermatozoide, reforzando a los acontecimientos que ocurren después de la penetración espermática al citoplasma ovocitario. El hecho de trabajar con ciclos que proceden únicamente del programa de donación de ovocitos permite descartar la posible influencia de la calidad ovocitaria al homogeneizar el factor femenino y concluir que sólo el componente paterno repercute sobre el tiempo de división embrionaria.

Como se ha comentado previamente, las muestras seminales oligozoospermicas retrasan el inicio de las divisiones embrionarias, adquiriendo especial importancia en el tiempo que necesita el embrión para alcanzar el estadio de 3-células. La oligozoospermia es una patología común relacionada con la infertilidad masculina y que se caracteriza por unas concentraciones anormalmente bajas de espermatozoides en el eyaculado. Según los criterios revisados por la Organización Mundial de la Salud en 2010, la oligozoospermia se define como una concentración de espermatozoides inferior a los 15 millones/ml de eyaculado en oposición a los 60 millones/ml de un semen normal; dependiendo de la severidad del fenotipo se clasifica como moderada o severa aunque esta clasificación resulta bastante controvertida ya que el hasta ahora recuento real de espermatozoides/ml se ve afectado por el volumen de eyaculado, el cual es independiente de la función testicular y de la tasa de producción espermática (Filipponi and Feil 2009). Ante la introducción de este posible sesgo, se trabaja con el número total de espermatozoides en el eyaculado, con un valor de referencia de 39 millones de espermatozoides para definir una condición de oligozoospermia; además, este parámetro aporta una medida de la capacidad de los testículos para producir espermatozoides y de la permeabilidad del tracto masculino (World Health Organization 2010).

La oligozoospermia tiene distintas causas externas e internas y los efectos de estos factores causales pueden ser permanentes o temporales. La etiología de la oligozoospermia es muy variada e incluye orígenes tan dispares como la edad, agentes infecciosos, alteraciones funcionales en órganos post-testiculares, agentes ambientales, desajustes hormonales, etc. Además, también se han descrito causas genéticas que explican la patología en sólo una pequeña fracción de pacientes y modificaciones de la función epigenética asociadas a cambios en el patrón de metilación del DNA (Gianotten et al. 2004). El hecho de que los embriones procedentes de ciclos tratados con muestras oligozoospermicas se caractericen por un retraso generalizado de las divisiones embrionarias puede explicarse por la microinyección de un espermatozoide con alteraciones relacionadas con la expresión génica en el cromosoma Y y/o con un patrón aberrante de metilación del DNA, ya que se ha observado que los varones oligozoospermicos presentaban pérdidas variables de la metilación que eran proporcionales a la severidad del fenotipo oligozoospermico (Marques et al. 2004). El ICSI es la única opción reproductiva que tienen estos pacientes por lo que a simple vista se desconoce si existe una causa genética/epigenética que pueda afectar a la cinética de desarrollo y a la posterior calidad embrionaria.

Cuando se evalúa la calidad embrionaria desde el punto de vista cinético y de probabilidades de implantación, se observa una tendencia constante en todas las variables analizadas y que adquiere relevancia estadística en  $s^2$ , lo que indica no sólo que los embriones derivados de ciclos con muestras oligozoospermicas son menos numerosos en los intervalos de tiempo que implican mayores probabilidades de implantación sino que ese impacto clínico es real cuando se considera el intervalo de tiempo transcurrido entre un embrión de 3-células a 4-células. Por lo tanto es posible asumir que las diferencias cinéticas observadas en el laboratorio tienen su correspondiente traducción en cuanto a resultados clínicos en concepto de potencial de implantación. Por último, la distribución embrionaria en las categorías morfocinéticas descritas por el algoritmo de selección (Meseguer et al. 2011) no revela la presencia de diferencias significativas para ninguna de las clases analizadas, lo cual sugiere que los efectos se manifiestan fundamentalmente en la cinética de desarrollo. Sin embargo, cuando se analiza uno de los criterios de exclusión como es el caso de la transición directa de cigoto a embrión de 3-células,

entonces sí aparecen diferencias significativas en la proporción de embriones con esta característica en función de las características seminales. Este dato refuerza la idea del grado de implicación de los espermatozoides en los acontecimientos circundantes a la fecundación y su posterior repercusión sobre los tiempos de las primeras divisiones embrionarias.

La astenozoospermia es causa frecuente de infertilidad masculina, aunque se trata de una condición bastante desconocida que normalmente no se relaciona con algún desorden andrológico conocido. Las causas de la infertilidad masculina permanecen sin aclarar en la mayoría de individuos por lo que normalmente se realiza un diagnóstico de infertilidad idiopática aunque descubrimientos recientes han demostrado que las anomalías genéticas desempeñan un papel fundamental. La descripción clásica de los grupos escandinavos a mediados de los años 70 que sugieren que la astenozoospermia puede tener su origen en alteraciones genéticas relacionadas con la dineína (Afzelius et al. 1975, Pedersen H 1975) abrió un campo que se ha ido enriqueciendo sucesivamente con el reconocimientos de otras variaciones como la ausencia congénita de los vasos deferentes, formas clásicas de fibrosis cística y últimamente con el descubrimiento de microdeleciones en el brazo largo del cromosoma Y. La astenozoospermia severa está causada normalmente por alteraciones estructurales del flagelo, las cuales son responsables de las deficiencias en la movilidad en más de un 70% de los varones infértiles (Chemes 1991). Se describen dos tipos de anomalías: anomalías flagelares no específicas (NFSA) que afectan a una cantidad variable de espermatozoides en distintas muestras, y displasia de la vaina fibrosa (DFS) definida como una patología sistemática primaria, que afecta a la mayoría de espermatozoides en individuos con patologías respiratorias asociadas y además, con cierto grado de incidencia familiar lo que resalta su carácter genético (Chemes et al. 1998).

La mayoría de pacientes con astenozoospermia que consultan a sus urólogos tienen elevado la proporción de espermatozoides con NFSA; estos varones pueden experimentar mejoría en el porcentaje de formas móviles como resultado de una etiología variada y la aplicación de una serie de tratamientos empíricos que derivan en unas tasas de éxito razonables mediante métodos clásicos como el FIV convencional. Estos datos indican que las patologías NFSA son reversibles y muy probablemente consecuencias

secundarias a las diferentes situaciones que afectan a la fertilidad como puede ser el varicocele, infecciones de la vía seminal, ... aunque en la mayoría de los casos es muy complicado identificar estas condiciones (Chemes 2000). En resumen, las NFSA no se heredan, son secundarias a otros desórdenes andrológicos potencialmente reversibles y/o responden a otros tratamientos. Por su parte, la DFS deriva en astenozoospermia y/o en ausencia total de movilidad espermática, incluye un fenotipo homogéneo caracterizado por distorsiones de la vaina fibrosa y de otras estructuras del axonema, no es consecuencia de ninguna alteración andrológica, no responde a terapias médicas, tiene un pronóstico reproductivo complicado y es heredable.

Los datos de cinética embrionaria obtenidos de comparar muestras astenozoospermicas frente a muestras normales revelan retrasos en el inicio de las divisiones embrionarias para las muestras patológicas que adquieren importancia estadística en el primer ciclo celular. Los espermatozoides portadores de defectos en el flagelo aunque incapaces de fecundar a un ovocito *in vivo/in vitro* debido a su movilidad restringida pueden fecundar ovocitos mediante ICSI, aunque todavía no está claro los riesgos genéticos que supone la microinyección de espermatozoides defectuosos para la siguiente generación. La imposibilidad de realizar un análisis de la ultraestructura espermática dificulta la selección del espermatozoide en cuanto a si éste está afectado por un defecto reversible o por una causa genética subyacente de difícil solución. Pero lo que sí es evidente, es que la calidad seminal, y en este caso el porcentaje de formas móviles presentes en el eyaculado, afecta significativamente al tiempo de la primera división embrionaria, con las posibles repercusiones que este hecho puede conllevar en concepto de calidad embrionaria y de potencial de implantación.

Posteriormente, en el momento de analizar la proporción de embriones incluidos en los intervalos de tiempo óptimos de división embrionaria los resultados no sólo muestran la menor presencia de embriones derivados de muestras astenozoospermicas en cada una de las variables analizadas sino que estas diferencias son significativas para todos los intervalos de tiempo considerados, por lo que en este caso sí se observa una estrecha correlación entre calidad seminal, cinética de desarrollo, y calidad y competencia embrionaria, ya que aquellos embriones que proceden de ciclos donde se ha empleado una muestra seminal de mala calidad no sólo ven retrasada su cinética de desarrollo, sino

que además este hecho tiene repercusiones importantes a la hora de cuantificar sus probabilidades de implantación. Los cigotos derivados de muestras de mala calidad puede que sean más asincrónicos y heterogéneos como consecuencia de la presencia de fases erráticas durante el ciclo celular que conducen a posibles anomalías cromosómicas y a un ciclo celular más largo (Slimane W, Hayes H, Eggen A, Peynot N, Renard JP. 1998). Por lo tanto, se establece cierto paralelismo entre parámetros biológicos y resultados clínicos.

Por último, cuando se integran variables morfológicas con parámetros cinéticos en las categorías del algoritmo (Meseguer et al. 2011) los resultados continúan con la misma línea argumental expuesta hasta ahora, obteniéndose diferencias relevantes entre una muestra patológica y una muestra normal. Los embriones derivados de ciclos tratados con muestras seminales dentro de los límites de la normalidad inician antes sus divisiones celulares lo que beneficia a su posterior desarrollo, ya que aumenta su presencia dentro de los intervalos de tiempo que elevan las probabilidades de implantación, lo que refuerza la hipótesis de que cuanto antes se divida un embrión (dentro de unos límites), mayor va a ser su competencia evolutiva.

# **CONCLUSIONES**

Un paso clave en los tratamientos de Reproducción Asistida es la evaluación de la calidad ovocitaria y embrionaria para determinar a los embriones con más posibilidades de derivar en una gestación. Desafortunadamente, el conocimiento de los determinantes moleculares de la competencia embrionaria es limitado, por lo que las estrategias clínicas habituales se basan en el examen de la morfología y de la tasa de división embrionaria; sin embargo, su precisión está lejos de ser la ideal. El diseño de una prueba objetiva y segura de valoración de la calidad ovocitaria/embrionaria que conduzca a un descenso de las gestaciones múltiples mientras se mantienen las tasas globales de gestación supone uno de los grandes desafíos de la medicina reproductiva.

Las técnicas de análisis de imagen añaden objetividad a los procesos de selección embrionaria, y en consecuencia, pueden mejorar los resultados de los tratamientos de Reproducción Asistida. La valoración cuantitativa de los aspectos clave de la morfología y cinética de desarrollo embrionario así como el almacenamiento de los datos relacionados con estas determinaciones pueden usarse para mejorar nuestro conocimiento acerca del desarrollo embrionario temprano y conducir hacia sistemas de clasificación mucho más sofisticados.

Ante estas consideraciones, se plantearon una serie de objetivos con el propósito inicial de validar clínicamente un incubador con un sistema integrado de análisis de imagen; posteriormente se evaluó si las características morfológicas y cinéticas de las primeras etapas de desarrollo podían actuar como marcadores de desarrollo a blastocisto, y por último, se analizó la influencia de un conjunto de factores sobre la cinética de desarrollo y posterior calidad embrionaria. Las conclusiones extraídas de este trabajo son:

1.- la ausencia de diferencias significativas obtenidas en parámetros clínicos y de calidad embrionaria confirma la posibilidad de incorporar esta tecnología a la actividad diaria de un laboratorio de fecundación *in vitro* con el propósito es definir nuevos parámetros de selección embrionaria que mejoren los resultados de un tratamiento de reproducción asistida.

2.- se demuestra que la capacidad embrionaria de crecimiento hasta blastocisto así como la calidad resultante del mismo está vinculada a las características morfocinéticas que definen las primeras etapas del desarrollo embrionario, por lo que se asume que la

tasa de desarrollo a blastocisto está asociada a una secuencia altamente regulada de procesos celulares que se inician en el mismo momento de la fecundación.

3.- se demuestra que las diferencias morfocinéticas asociadas al método de fecundación se deben a las características intrínsecas que definen a cada una de las técnicas, confirmando la necesidad de ajustar la secuencia cronológica de desarrollo embrionario a cada procedimiento en concreto. Sin embargo, estas diferencias no se traducen en variaciones cualitativas en cuanto a calidad embrionaria y potencial de implantación.

4.- se refuerza la idea del grado de implicación de los espermatozoides, tanto en concentración como en porcentaje de formas móviles, en los acontecimientos circundantes a la fecundación y su posterior repercusión sobre los tiempos de las primeras divisiones embrionarias y potencial de implantación.

# **BIBLIOGRAFÍA**

Afzelius BA, Eliasson R, Johnsen O and Lindholmer C. Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol* 1975;**66**:225-232.

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS and Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 2004;**8**:616-627.

Aitken RJ and Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987;**81**:459-469.

Albert C, Romero J, Florensa M, Gadea B and Escriba M. Procesado de muestras de semen patológicas para ICSI. In McGraw-Hill Interamericana (ed) Manual Practico de esterilidad y Reporduccin Humana. El laboratorio de Reproduccion Asistida. 2008, pp. 157-176.

Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG and European IVF-monitoring programme (EIM), European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2005;**20**:1158-1176.

Arav A, Aroyo A, Yavin S and Roth Z. Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:669-675.

Bar-Hava I, Ashkenazi J, Shelef M, Schwartz A, Brengauz M, Feldberg D, Orvieto R and Ben-Rafael Z. Morphology and clinical outcomes of embryos after in vitro fertilization are superior to those after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1997;**68**:653-657.

Basile, N, Meseguer, M. Time-lapse technology: evaluation of embryo quality and new markers of embryo selection. *Expert Rev Obstet Gynecol* 2012;**7**:1.

Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK and Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;**86**:1608-1615.

Blake, D.A, Proctor, M and Johnson, N.P. The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2004;**19**:795-807.

Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P and Van Steirteghem A. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 2002;**17**:671-694.

Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Devroey P, Van Steirteghem AC and Liebaers I. A follow-up study of children born after intracytoplasmic sperm

injection (ICSI) with epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 1998;**13 Suppl 1**:196-207.

Borini A, Suriano R, Barberi M, Dal Prato L and Bulletti C. Oocyte donation programs: strategy for improving results. *Ann N Y Acad Sci* 2011;**1221**:27-31.

Braundmeier AG and Miller DJ. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *J Dairy Sci* 2001;**84**:1915-1925.

Budak E, Garrido N, Soares SR, Melo MA, Meseguer M, Pellicer A and Remohi J. Improvements achieved in an oocyte donation program over a 10-year period: sequential increase in implantation and pregnancy rates and decrease in high-order multiple pregnancies. *Fertil Steril* 2007;**88**:342-349.

Canaria CA and Lansford R. Advanced optical imaging in living embryos. *Cell Mol Life Sci* 2010;**67**:3489-3497.

Chemes EH. The significance of flagellar pathology in the evaluation of asthenozoospermia. In Rave Press (ed) *Comparative Spermatology 20 years later*. 1991, pp. 815-819.

Chemes EH and Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 2003;**9**:405-428.

Chemes HE. Phenotypes of sperm pathology: genetic and acquired forms in infertile men. *J Androl* 2000;**21**:799-808.

Chemes HE, Olmedo SB, Carrere C, Oses R, Carizza C, Leisner M and Blaquier J. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. *Hum Reprod* 1998;**13**:2521-2526.

Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F and Bahceci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril* 2006;**85**:358-365.

Cobo A, Meseguer M, Remohi J and Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;**25**:2239-2246.

Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y and Renard JP. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod* 2000;**62**:1677-1684.

Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM and Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986;**3**:284-295.

da Costa AL AL, Abdelmassih S, de Oliveira FG, Abdelmassih V, Abdelmassih R, Nagy ZP and Balmaceda JP. Monozygotic twins and transfer at the blastocyst stage after ICSI. *Hum Reprod* 2001;**16**:333-336.

Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani S and Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;**16**:749-756.

Dominguez F, Gadea B, Esteban FJ, Horcajadas JA, Pellicer A and Simon C. Comparative protein-profile analysis of implanted versus non-implanted human blastocysts. *Hum Reprod* 2008;**23**:1993-2000.

Dumollard R, Duchen M and Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;**77**:21-49.

Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignoul-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen JM, Derhaag JG, Geraedts JP and Evers JL. Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 2000;**15**:402-409.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, Steptoe PC and Webster JM. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984;**1**:3-23.

Eid LN, Lorton SP and Parrish JJ. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biol Reprod* 1994;**51**:1232-1237.

Escriba MJ, Bellver J, Bosch E, Sanchez M, Pellicer A and Remohi J. Delaying the initiation of progesterone supplementation until the day of fertilization does not compromise cycle outcome in patients receiving donated oocytes: a randomized study. *Fertil Steril* 2006;**86**:92-97.

Ezin M and Fraser S. Time-lapse imaging of the early avian embryo. *Methods Cell Biol* 2008;**87**:211-236.

Fancsovits P, Takacs FZ, Tothne GZ, Papp Z Urbancsek J. Examination of early cleavage and its importance in IVF treatment. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006;**3**:367-372.

Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP and Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 2002;**17**:407-412.

Filho ES, Noble JA and Wells D. A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *Open Biomed Eng J* 2010;**4**:170-177.

Filipponi D and Feil R. Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics* 2009;**4**:27-30.

Frattarelli JL, Leondires MP, Miller BT and Segars JH. Intracytoplasmic sperm injection increases embryo fragmentation without affecting clinical outcome. *J Assist Reprod Genet* 2000;**17**:207-212.

Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Meseguer M. Ontological evaluation of transcriptional differences between sperm of infertile males and fertile donors using microarray analysis. *J Assist Reprod Genet* 2010a;**27**:111-120.

Garcia-Herrero S, Meseguer M, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A and Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 2010b;**94**:1360-1373.

Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 1998;**49**:83-102.

Gardner DK, Lane M, Calderon I and Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996;**65**:349-353.

Gardner DK, Lane M and Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *J Reprod Immunol* 2002;**55**:85-100.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T and Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;**69**:84-88.

Garrido N, Bellver J, Remohi J, Simon C and Pellicer A. Cumulative live-birth rates per total number of embryos needed to reach newborn in consecutive in vitro fertilization (IVF) cycles: a new approach to measuring the likelihood of IVF success. *Fertil Steril* 2011:.

Garrido N, Remohi J, Martinez-Conejero JA, Garcia-Herrero S, Pellicer A and Meseguer M. Contribution of sperm molecular features to embryo quality and assisted reproduction success. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:855-865.

Gianotten J, Lombardi MP, Zwinderman AH, Lilford RJ and van der Veen F. Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is unlikely to provide a shortcut to better understanding. *Hum Reprod Update* 2004;**10**:533-539.

Gonzales DS, Pinheiro JC and Bavister BD. Prediction of the developmental potential of hamster embryos *in vitro* by precise timing of the third cell cycle. *J Reprod Fertil* 1995;**105**:1-8.

Gorus FK and Pipeleers DG. A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertil Steril* 1981;**35**:662-665.

Graham J, Han T, Porter R, Levy M, Stillman R and Tucker MJ. Day 3 morphology is a poor predictor of blastocyst quality in extended culture. *Fertil Steril* 2000;**74**:495-497.

Grow DR, Oehninger S, Seltman HJ, Toner JP, Swanson RJ, Kruger TF and Muasher SJ. Sperm morphology as diagnosed by strict criteria: probing the impact of teratozoospermia on fertilization rate and pregnancy outcome in a large *in vitro* fertilization population. *Fertil Steril* 1994;**62**:559-567.

Hall J, Fishel S, Green S, Fleming S, Hunter A, Stoddart N, Dowell K and Thornton S. Intracytoplasmic sperm injection versus high insemination concentration *in vitro* fertilization in cases of very severe teratozoospermia. *Hum Reprod* 1995;**10**:493-496.

Hamel M, Dufort I, Robert C, Gravel C, Leveille MC, Leader A and Sirard MA. Identification of differentially expressed markers in human follicular cells associated with competent oocytes. *Hum Reprod* 2008;**23**:1118-1127.

Hardy K, Martin K, Leese H, Winston R and Handyside A. Human preimplantation development *in vitro* is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;**5**:708-714.

Harris SJ, Milligan MP, Masson GM and Dennis KJ. Improved separation of motile sperm in asthenospermia and its application to artificial insemination homologous (AIH). *Fertil Steril* 1981;**36**:219-221.

Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT and Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2004;**71**:1108-1119.

Herbert M, Gillespie JI and Murdoch AP. Development of calcium signalling mechanisms during maturation of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1997;**3**:965-973.

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ and Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002;**17**:999-1005.

Hsu MI, Mayer J, Aronshon M, Lanzendorf S, Muasher S, Kolm P and Oehninger S. Embryo implantation in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: impact of cleavage status, morphology grade, and number of embryos transferred. *Fertil Steril* 1999;**72**:679-685.

Janny L and Menezo YJ. Evidence for a strong paternal effect on human preimplantation embryo development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1994;**38**:36-42.

Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N and Wood C. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;**70**:1022-1029.

Kamel RM. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;**8**:21.

Karnaikhov AV, Sviridova-Chailakhyan TA, Karnaikhova EV, Panchenko MM, Bogdanenko EV and Chailakhyan LM. Time-lapse cinematography study of preimplantation mouse embryo development. *Dokl Biol Sci* 2009;**426**:306-310.

Katz-Jaffe MG and Gardner DK. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Can proteomics help to shape the future of human assisted conception?. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:497-501.

Kaufman RA, Menezo Y, Hazout A, Nicollet B, DuMont M and Servy EJ. Cocultured blastocyst cryopreservation: experience of more than 500 transfer cycles. *Fertil Steril* 1995;**64**:1125-1129.

Kausche A, Jones GM, Trounson AO, Figueiredo F, MacLachlan V and Lolatgis N. Sex ratio and birth weights of infants born as a result of blastocyst transfers compared with early cleavage stage embryo transfers. *Fertil Steril* 2001;**76**:688-693.

Khamsi F, Yavas Y, Roberge S, Wong JC, Lacanna IC and Endman M. Intracytoplasmic sperm injection increased fertilization and good-quality embryo formation in patients with non-male factor indications for in vitro fertilization: a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2001;**75**:342-347.

Kiessling AA. Timing is everything in the human embryo. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1025-1026.

Klein J and Sauer MV. Oocyte donation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002;**16**:277-291.

Kline D and Kline JT. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992;**149**:80-89.

Kovalevsky G and Patrizio P. High rates of embryo wastage with use of assisted reproductive technology: a look at the trends between 1995 and 2001 in the United States. *Fertil Steril* 2005;**84**:325-330.

Kumar R, Gautam G and Gupta NP. Drug therapy for idiopathic male infertility: rationale versus evidence. *J Urol* 2006;**176**:1307-1312.

Lemmen JG, Agerholm I and Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008;**17**:385-391.

Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yauger BJ and Larsen FW. Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2008;**90**:2138-2143.

Lewis WH and Gregory PW. Cinematographs of Living Developing Rabbit-Eggs. *Science* 1929;**69**:226-229.

Lonergan P, Khatir H, Piumi F, Rieger D, Humblot P and Boland MP. Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1999;**117**:159-167.

Lundin K, Bergh C and Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001;**16**:2652-2657.

Lunenfeld B, Van Steirteghem A and Bertarelli Foundation. Infertility in the third millennium: implications for the individual, family and society: condensed meeting report from the Bertarelli Foundation's second global conference. *Hum Reprod Update* 2004;**10**:317-326.

Lutjen P, Trounson A, Leeton J, Findlay J, Wood C and Renou P. The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature* 1984;**307**:174-175.

Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM and Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1999;**72**:1035-1040.

Marques CJ, Carvalho F, Sousa M and Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;**363**:1700-1702.

Martin KL. Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts. *Hum Fertil (Camb)* 2000;**3**:247-254.

Martin KL and Leese HJ. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 1995;**40**:436-443.

Martin. K.L. Blastocyst Culture- Clinical and Future Applications. *J Fertil Reprod* 2004;**14**:13-18.

Martinez MC, Bernabe MJ, Gomez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G, Gil-Salom M, Remohi J and Pellicer A. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl* 2000;**21**:651-655.

McKiernan SH and Bavister BD. Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Hum Reprod* 1994;**9**:2123-2129.

McLaren A and Bowman P. Genetic effects on the timing of early development in the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 1973;**30**:491-498.

Meijering E, Smal I, Dzyubachyk O and Olivo-Marin J. Time-lapse imaging. In Wu Q, Merchant F and Castleman K (eds) *Microscope Image Processing*. 2008. Elsevier Academic Press, pp. 401-440.

Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut N and Nicollet B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in humans. *Hum Reprod* 1992;**7 Suppl 1**:101-106.

Menezo YJ, Chouteau J, Torello J, Girard A and Veiga A. Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *Fertil Steril* 1999;**72**:221-224.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing N and Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011:1-14.

Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J and Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;**86**:1376-1385.

Meseguer M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J and Garrido N. The significance of sperm DNA oxidation in embryo development and reproductive outcome in an oocyte donation program: a new model to study a male infertility prognostic factor. *Fertil Steril* 2008;**89**:1191-1199.

Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D and Behr B. Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 2000;**73**:126-129.

Munne S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J and Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 1995;**64**:382-391.

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

Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;**2**:21-32.

Oehninger S, Kruger TF, Simon T, Jones D, Mayer J, Lanzendorf S, Toner JP and Muasher SJ. A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;**11**:1086-1089.

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

Ozil JP. The parthenogenetic development of rabbit oocytes after repetitive pulsatile electrical stimulation. *Development* 1990;**109**:117-127.

Ozil JP and Huneau D. Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca<sup>2+</sup> signal regime on development. *Development* 2001;**128**:917-928.

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

Parinaud J, Mieusset R, Vieitez G, Labal B and Richoilley G. Influence of sperm parameters on embryo quality. *Fertil Steril* 1993;**60**:888-892.

Patrizio P and Sakkas D. From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;**91**:1061-1066.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF and Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 1997;**12**:532-541.

Pedersen HRH. Absence of arms in the axoneme of immotile human spermatozoa. *Biol Reprod* 1975;**12**:541-544.

Plachot M. Fertilization. *Hum Reprod* 2000;**15 Suppl 4**:19-30.

Prados N, Crespo M, Hernaez MJ, Ruiz M, Gacia J, Vime P, Calderon G and Fernandez-Sanchez M. Criterios de seleccion embrionaria. In Manual Pratico de

Esterilidad y Reproduccion Humana. El Laboratorio de Reproduccion Asistida. 2008. McGraw-Hill/Interamericana, pp. 201.

Pribenszky C, Losonczy E, Molnar M, Lang Z, Matyas S, Rajczy K, Molnar K, Kovacs P, Nagy P, Conceicao J *et al.* Prediction of in-vitro developmental competence of early cleavage-stage mouse embryos with compact time-lapse equipment. *Reprod Biomed Online* 2010;**20**:371-379.

Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, Carr BR, Nackley AC, Doody KM and Doody KJ. Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril* 2007;**87**:1041-1052.

Rieder CL and Khodjakov A. Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. *Science* 2003;**300**:91-96.

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

Rijnders PM and Jansen CA. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;**13**:2869-2873.

Ron-el R, Nachum H, Herman A, Golan A, Caspi E and Soffer Y. Delayed fertilization and poor embryonic development associated with impaired semen quality. *Fertil Steril* 1991;**55**:338-344.

Rubio C, Gil-Salom M, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Minguez Y, Remohi J and Pellicer A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001;**16**:2084-2092.

Ruiz A, Remohi J, Minguez Y, Guanes PP, Simon C and Pellicer A. The role of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in couples with unexplained infertility after failed intrauterine insemination. *Fertil Steril* 1997;**68**:171-173.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG and Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod* 1998;**13**:182-187.

Salihu HM, Shumpert MN, Slay M, Kirby RS and Alexander GR. Childbearing beyond maternal age 50 and fetal outcomes in the United States. *Obstet Gynecol* 2003;**102**:1006-1014.

Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A and Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003;**18**:821-825.

Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J and Munne S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001;**16**:1954-1958.

Santalla A, Calderon M, Lopez-Criado M, Fontes J, Lopez-Jurado R and Martinez-Navarro L. Donacion de ovocitos. *Clin Invest Gin Obst* 2008;**35**:131-137.

Scholtes MC and Zeilmaker GH. A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2006;**61**:521-525.

Scott L, Alvero R, Leondires M and Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000;**15**:2394-2403.

Shoukir Y, Campana A, Farley T and Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997;**12**:1531-1536.

Shoukir Y, Chardonens D, Campana A and Sakkas D. Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence?. *Hum Reprod* 1998;**13**:1632-1637.

Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M and Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 1993;**60**:123-126.

Sills ES and Palermo GD. Human blastocyst culture in IVF: current laboratory applications in reproductive medicine practice. *Rom J Morphol Embryol* 2010;**51**:441-445.

Simon C, Gutierrez A, Vidal A, de los Santos MJ, Tarin JJ, Remohi J and Pellicer A. Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction: results from in-vitro fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 1994;**9**:725-729.

Slimane W, Hayes H, Eggen A, Peynot N, Renard JP. Incidence of chromosomal abnormalities in two cell bovine IVF embryos after normal or delayed cleavage Abstract 250. In Proceedings of the 14th A.E.T.E. 1998.

Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohi J and Pellicer A. Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;**90**:4399-4404.

Staessen C, Camus M, Clasen K, De Vos A and Van Steirteghem A. Conventional in-vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection in sibling oocytes from couples with tubal infertility and normozoospermic semen. *Hum Reprod* 1999;**14**:2474-2479.

Stephens PC and Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978;**2**:366.

Tarlatzis BC. Report on the activities of the ESHRE Task Force on intracytoplasmic sperm injection. European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod* 1996;**11 Suppl 4**:160-85; discussion 186.

Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N and Meseguer M. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril* 2011;**96**:618-623.e2.

Tesarik J, Mendoza C and Greco E. Paternal effects acting during the first cell cycle of human preimplantation development after ICSI. *Hum Reprod* 2002;**17**:184-189.

Trounson A, Leeton J, Besanko M, Wood C and Conti A. Pregnancy established in an infertile patient after transfer of a donated embryo fertilised in vitro. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;**286**:835-838.

Van Blerkom J. Can the developmental competence of early human embryos be predicted effectively in the clinical IVF laboratory?. *Hum Reprod* 1997;**12**:1610-1614.

Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD and Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004;**19**:2103-2108.

Verheyen G, Tournaye H, Staessen C, De Vos A, Vandervorst M and Van Steirteghem A. Controlled comparison of conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in patients with asthenozoospermia. *Hum Reprod* 1999;**14**:2313-2319.

Vitullo AD and Ozil JP. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol* 1992;**151**:128-136.

Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M and Kallen B. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 2000;**15**:944-948.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM and Reijo Pera RA. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nat Biotechnol* 2010;**28**:1115-1121.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth Edition edn, 2010.

World Health Organization. Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted diseases: overview and estimates. *WHO/CDS/CSR/EDC/2001.10* 2001:.

Yamagata K, Suetsugu R and Wakayama T. Long-term, six-dimensional live-cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term development. *J Reprod Dev* 2009;**55**:343-350.

Yang D, Shahata MA, al-Bader M, al-Natsha SD, al-Flamerzia M and al-Shawaf T. Intracytoplasmic sperm injection improving embryo quality: comparison of the sibling oocytes of non-male-factor couples. *J Assist Reprod Genet* 1996;**13**:351-355.

Yoeli R, Orvieto R, Ashkenazi J, Shelef M, Ben-Rafael Z and Bar-Hava I. Comparison of embryo quality between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization in sibling oocytes. *J Assist Reprod Genet* 2008;**25**:23-28.