

# Cuantificación de la calidad embrionaria mediante el consumo de oxígeno durante el proceso rutinario de incubación y desarrollo in vitro.

## TESIS DOCTORAL

Presentada por:

*Alberto Tejera Pastor para optar al título de  
Doctor por la Universitat de València*

Dirigida por:

**Dra. M<sup>a</sup> José de los Santos Molina**

**Dr. Marcos Meseguer Escrivá**

**Dr. Nicolás Garrido Puchalt**



Valencia, 2015

**Dra. M<sup>a</sup> José De los Santos Molina**

Doctora en Ciencias Biológicas por la Universidad de Valencia. Directora del Laboratorio de embriología clínica del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

**CERTIFICO QUE:**

El trabajo de tesis doctoral titulado “Cuantificación de la calidad embrionaria mediante el consumo de oxígeno durante el proceso rutinario de incubación y desarrollo *in vitro*”, ha sido realizado íntegramente por Alberto Tejera Pastor, bajo mi dirección compartida con el Dr. Marcos Meseguer Escrivá y el Dr. Nicolás Garrido Puchalt. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, 18 febrero 2015

Fdo. Dra. M<sup>a</sup> José de los Santos Molina

**Dr. D. Marcos Meseguer Escrivá**

Doctor en ciencias biológicas por la Universidad de Valencia. Embriólogo del laboratorio de embriología clínica del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

**CERTIFICO QUE:**

El trabajo de tesis doctoral titulado “Cuantificación de la calidad embrionaria mediante el consumo de oxígeno durante el proceso rutinario de incubación y desarrollo *in vitro*”, ha sido realizado íntegramente por Don Alberto Tejera Pastor, bajo mi dirección compartida con la Dra. M<sup>a</sup> José De los Santos y el Dr. Nicolás Garrido Puchalt. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, 18 Febrero 2015

Fdo. Dr. Marcos Meseguer Escrivá

**Dr. D. Nicolás Garrido Puchalt**

Doctor en ciencias biológicas por la Universidad de Valencia. Director del laboratorio de andrología del Instituto Universitario Instituto Valenciano de Infertilidad. Valencia

**CERTIFICO QUE:**

El trabajo de tesis doctoral titulado “Cuantificación de la calidad embrionaria mediante el consumo de oxígeno durante el proceso rutinario de incubación y desarrollo *in vitro*”, ha sido realizado íntegramente por Don Alberto Tejera Pastor, bajo mi dirección compartida con la Dra. M<sup>a</sup>José De los Santos y el Dr. Marcos Meseguer Escrivá. Revisado el presente trabajo, reúne las condiciones necesarias para ser defendido públicamente ante la comisión correspondiente para optar al grado de doctor.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, expido el presente certificado en Valencia, 18 Febrero 2015

Fdo. Dr. Nicolás Garrido Puchalt

## **Agradecimientos:**

Cuando empecé con este proyecto todo el mundo me dijo que lo más difícil de una tesis es escribirla, claramente todos ellos o mentían, o no tenían la tesis realizada. Lo más difícil de hacer una tesis es la gestión burocrática universitaria y la parte de agradecimientos. Una vez realizada las 2 primeras partes vamos con la más difícil:

De forma general me gustaría agradecer a todas aquellas personas que de alguna forma han hecho posible que este proyecto se hiciera realidad: familia, amigos, compañeros de trabajo, directores de tesis, jefes de departamento, dueños de la clínica y a Unisense, empresa diseñadora del aparato embryoscope.

En primer lugar quiero agradecer a toda mi familia el apoyo y la comprensión dedicada: a mi mujer Alicia por ser tan paciente, generosa, y por darme tanto cariño y amor durante todos estos años. A mi hija Raquel, por ser tan buena niña, inocente debido a su edad pero a veces tan madura que me sorprende gratamente. También agradecer al último en llegar pero no menos importante: Adrián, por habernos alegrado la vida en el último momento, a pesar de que en alguna ocasión pensemos “con lo bien que vivíamos”, viéndole la cara de bicho y lo sonriente que es, en seguida se nos pasa y vuelve la alegría a la casa. Por supuesto quiero agradecer a mis padres y a mi abuela todo lo que han hecho por mí, de alguna forma todo lo que un hijo llega a ser se lo debe a sus padres, por lo que si llego a ser doctor en parte se debe a su educación y a los ideales que me han inculcado, aunque todo lo que diga de ellos se queda corto, destacaría de ambos la bondad y paciencia que desprenden, es impresionante. A mis hermanos Kike y Fernando, en especial a Fernando, gracias por sus sabios consejos, que aunque joven, siempre ha sido un tío muy maduro y con las cosas muy claras.

En segundo lugar me gustaría agradecer a todos mis amigos su confianza depositada, de forma especial quiero darle las gracias a Juan Iñiguez, por estar ahí cuando lo he necesitado, y por supuesto a los que familiarmente conozco como los Beckam (Jose Luis y Carmen), 2 personas que jamás olvidaré, que han estado muy pendientes de mí cuando lo he necesitado, y que saben vivir y disfrutar de la vida como toca.

Querría también agradecer a mis primeros mentores en el campo de la Reproducción Asistida: Luisa Dieguez e Inmaculada Molina, sobre todo a Inma, porque gracias a ella estoy donde estoy, porque ha sido mucho lo que me has enseñado.

En tercer lugar me gustaría agradecer a todos mis compañeros de trabajo el apoyo incondicional durante todos estos años de “duro curro”. Desde los más jóvenes en

llegar: Yamileth, Clara, Lucía, Fernanda, Mar y Yolanda Galiana y Yolanda Garijo (todas ellas magníficas compañeras de las clases de *English*, y en especial quiero dar las gracias a las 2 yolandas por sus recomendaciones para darle formato al índice de la tesis, pasando por los no tan jóvenes: Lala; con voz y modales de camionera pero con la que me he reído mucho en el lab, eso sí, no sé qué haría esta chica si algún día se llegara a quemar Denia), Belén; a pesar de que me confundió al principio pues parecía una pija más de buena familia, es todo lo contrario, una chica sencilla, cercana, muy trabajadora, y que ha hecho que los proyectos que hemos compartido hayan sido un paseo en barca, Diana Beltrán; creo que entre Diana y yo no hay ningún tipo de cosa de lo que no podamos hablar; sea de cosas de trabajo, o sea de cosas “más bien subidas de tono”, como ella dice, es que contigo puedo hablar de estos temas, me lo tomará como un cumplido, Virginia; que sin filtro y con esa “finura” que la caracteriza todavía me cuesta entenderla cuando habla, Laura escrich: conozco pocas personas tan buenas y generosas como Laura, se la podría catalogar como un ángel caído del cielo, hasta los más veteranos: Las dos Aranchas, perdón, Aránzazu Galán y Arantxa Delgado (una desprende calma y tranquilidad, la otra puro nervio), Pep Romero (fuente de sabiduría), Amparo Mercader( otra fuente de sabiduría meticulosa y organizada al máximo), Carmela Albert (somos de la misma quinta, así que aunque yo esté un poco más “cascado” nos entendemos muy bien), Pili Gámiz( madre y amiga ejemplar, con la que he vivido momentos inolvidables en el Laboratorio:” que la vayan pasando”, y fuera de él( ostias que no se puede pagar con tarjeta!!! Sonia Pérez( otro motoret de morro fino, con quien comparto alguna que otra afición curinaria), Jose Maria de los Santos( para este no tengo palabras; siempre receptivo, generoso, buen amigo, un tío entrañable y extraordinario), M<sup>a</sup> Jose escribá( madre de alto rendimiento en todos los sentidos, con una visión y un conocimiento de las cosas invisible para los mortales), Noelia Grau( trabajadora incansable y siempre dispuesta), Amparo Mifsud (me pareces una tía “peculiar” en el buen sentido de la palabra, eres inigualable, sin filtro a veces, pero de forma graciosa, buena amiga y compañera, con un sentido del humor especial, y con una agilidad para levantar la pierna cuando bailas que todavía no lo entiendo, Damiá Castelló( A ti Damiá te considero antes amigo que compañero, y lo único que puedo decir es que eres un tío espectacular, buena persona, con un gran corazón y con gran proyección profesional),Thamara Viloría( otro ángel caído del cielo Thamara, también irradas bondad y cariño a raudales, es un lujo tenerte en el laboratorio y trabajar contigo, gracias por explicarme el *write-N-cite*, y toda la burocracia de la Universidad(

me has salvado la vida!), Pili Buendía; la verdad es que de ti pili no sé muy bien qué decir, entre que hablas muy pero que muy bajito y que aparentemente eres tan frágil, hace de ti una persona especial. A todos ellos gracias por enseñarme algo, cada uno de vosotros, a vuestra manera, me habéis transmitido vuestra sabiduría. Quisiera dar las gracias a todos los técnicos, tanto los del laboratorio de semen como los del departamento de vitrificación (porque ha habido momentos muy buenos como el archiconocido baile “wigggle”, sin el cual la vida de Joselito y Eva no tendrían sentido), todos ellos buenos compañeros y buenos profesionales. No quiero olvidarme de una persona que nos dejó (no se murió porque es prácticamente imposible acabar con él) para empezar una nueva etapa en su ciudad natal; “El Zula”, con el que hemos vivido momentos inolvidables (en todos los sentidos). Ahora me gustaría hacer una mención especial a mis directores de tesis: Mariajose de los Santos: una muy buena persona que todavía no entiendo como dirige este laboratorio que a veces parece un circo, Nicolás Garrido: gracias a él los trámites y burocracia universitaria han sido un paseo en barca, y por último querría agradecer a Marcos Meseguer todo su apoyo; además de gran amigo director de tesis, está claro que sin mis 3 directores de tesis este proyecto no se hubiera finalizado, pero sobre todo, gracias al esfuerzo, la constancia y la sabiduría de este hombre, este sueño se ha hecho realidad. A pesar de que es un gran paquete jugando al pádel, y que por más que lo intente.....no hay manera, en cuanto a ciencia es un crack y gran parte de mi mejora profesional se la debo a él, así que gracias por darme esta oportunidad.

Me gustaría dedicar esta tesis a la persona que tengo a mi lado durante todos estos años, de una forma u otra esto ha salido gracias a ti, cariño, gracias por aguantarme!!!!

Gracias a todos de corazón

Dedicada a mi suegro y a mi abuelo, que ya no están entre nosotros pero eran personas excepcionales y muy grandes.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1 Infertilidad .....	12
1.2 Limitaciones de las TRA e inconvenientes de los resultados actuales.....	16
1.3. Consecuencias de las transferencias embrionarias dobles.....	17
1.4. Mejora de las técnicas de reproducción asistida:.....	18
1.5 Marcadores de calidad embrionaria:.....	20
1.5.1 Marcadores clásicos no invasivos .....	20
1.5.2 Nuevos marcadores no-invasivos.....	23
1.5.2.1 Recambio de aminoácidos. ....	24
1.5.2.2 Las “-ómicas” como herramientas de investigación. ....	25
1.6. Estudio de la respiración celular:.....	27
2. OBJETIVOS.....	42
2.1 OBJETIVO GENERAL: .....	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	43
3. HIPÓTESIS .....	44
Hipótesis objetivo específico número 1: .....	45
Hipótesis objetivo específico número 2: .....	45
Hipótesis objetivo específico número 3: .....	45
Hipótesis objetivo específico número 4: .....	45
Hipótesis objetivo específico número 5: .....	46
Hipótesis objetivo específico número 6: .....	46
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	47

4.1 DISEÑO: .....	48
4.1.1 Donantes de ovocitos:.....	48
4.1.2 Receptoras de ovocitos: .....	49
4.1.3 El embryoscope Versión C (ESC).....	52
4.1.4 Medición del consumo de oxígeno .....	53
4.1.5 Obtención de los ovocitos.....	56
4.1.6 Decumulación de los ovocitos.....	57
4.1.7 Microinyección ovocitaria: .....	58
4.1.8 Fecundación .....	58
4.1.9 Cultivo y evaluación embrionaria.....	59
4.2 Ovocitos.....	60
4.2.1 Estimulación ovárica de las donantes de ovocitos.....	61
4.2.2 Evaluación morfológica ovocitaria .....	62
4.2.3 Medición del consumo de oxígeno ovocitario .....	63
4.2.4 Embriones transferidos .....	64
4.3 Embriones.....	65
4.3.1 Estimulación ovárica de las donantes .....	66
4.3.2 Medición del consumo de oxígeno embrionario .....	68
4.3.2.1 Consumo de oxígeno y estadio embrionario .....	69
4.3.2.2 Consumo de oxígeno y calidad embrionaria .....	70
4.3.2.3 Consumo de oxígeno y evolución embrionaria.....	70
4.3.2.4 Consumo de oxígeno y citocinesis .....	70
4.3.2.5 Consumo de oxígeno y rangos óptimos de división.....	71
4.3.2.6 Consumo de oxígeno, embarazo e implantación embrionaria .....	71
4.3.3 Transferencias embrionarias.....	72
4.4 Recuperación espermática .....	74
4.4.1 Técnica de “SWIM-UP” .....	74
5. RESULTADOS.....	76
5.1 Ovocitos:.....	77
5.1.1 Protocolos de estimulación ovárica y consumo de oxígeno ovocitario .....	77
5.1.2 Morfología ovocitaria y consumo de oxígeno.....	80
5.1.3 Fecundación y consumo de oxígeno ovocitario .....	81
5.1.4 Embriones y consumo de oxígeno ovocitario .....	83
5.1.5 Implantación y consumo de oxígeno ovocitario .....	84
5.2 Embriones:.....	85

5.2.1 Consumo de oxígeno y estadio embrionario .....	86
5.2.2 Consumo de oxígeno y calidad embrionaria .....	87
5.2.3 Consumo de oxígeno y evolución embrionaria.....	88
5.2.4 Consumo de oxígeno y citocinesis .....	88
5.2.5 Consumo de oxígeno y rangos óptimos de división.....	92
5.2.6 Consumo de oxígeno embrionario y velocidad de división .....	94
5.2.7 Consumo de oxígeno embrionario, tasas de embarazo e implantación.....	95
5.2.8 Consumo de oxígeno en cuartiles, tasas de gestación e implantación.....	96
6. DISCUSIÓN .....	99
Ovocitos.....	100
Protocolos de estimulación ovárica y consumo de oxígeno ovocitario .....	100
Morfología ovocitaria y consumo de oxígeno.....	102
Fecundación y consumo de oxígeno ovocitario .....	103
Embriones y consumo de oxígeno ovocitario .....	105
Implantación y consumo de oxígeno ovocitario .....	105
Embriones.....	106
Consumo de oxígeno y estadio embrionario. ....	107
Consumo de oxígeno y calidad embrionaria.....	108
Consumo de oxígeno y evolución embrionaria.....	109
Consumo de oxígeno embrionario y citocinesis .....	111
Consumo de oxígeno embrionario y rangos óptimos de división.....	113
Consumo de oxígeno embrionario y velocidad de división .....	114
Consumo de oxígeno embrionario y tasas de embarazo e implantación.....	115
Consumo de oxígeno en cuartiles, tasas de gestación e implantación.....	116
7. CONCLUSIONES.....	119
8. Referencias Bibliográficas .....	122

# 1. INTRODUCCIÓN

## **1.1 Infertilidad**

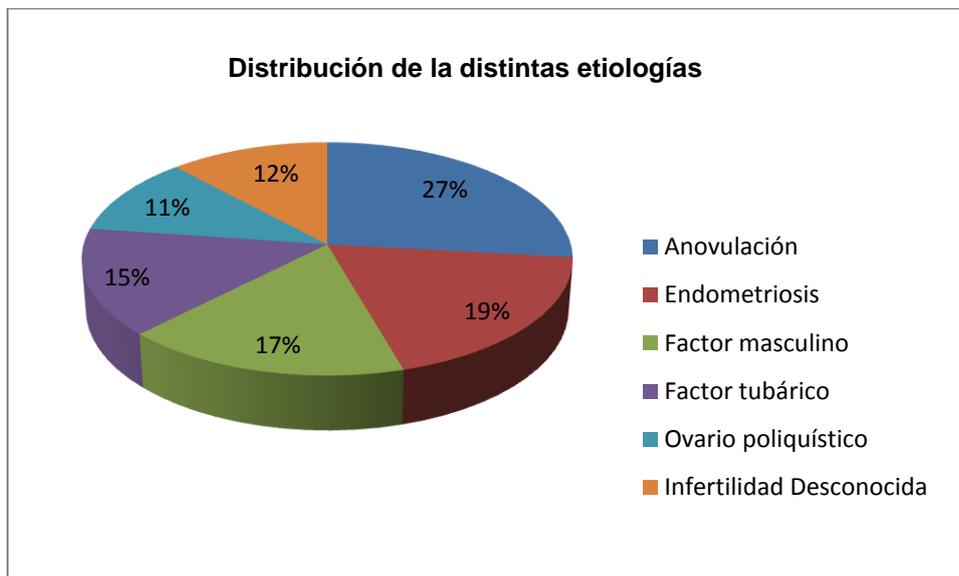
La infertilidad está considerada como un problema de carácter público que repercute sobre los servicios sociales y sanitarios del país. La gestión de la infertilidad supone para la Medicina una labor considerable por las dificultades que entraña su diagnóstico y el tratamiento de los desórdenes reproductivos de cada miembro de la pareja.

El término “Infertilidad” se define como la imposibilidad de una pareja para conseguir un embarazo tras mantener relaciones sexuales regulares no protegidas durante un año. Aproximadamente un 15% de las parejas con deseo de gestación tienen dificultad de concebir tras este período. En los países industrializados, unas 1200 parejas por cada millón de habitantes parecen tener problemas de fertilidad cada año (1). Las causas de la infertilidad abarcan un amplio rango de factores tanto físicos como emocionales y puede atribuirse a cualquier alteración en el sistema reproductor femenino o masculino, que contribuyen en menor o mayor medida a este hecho.

Habría que puntualizar que si bien en la terminología española hasta hace años se diferenciaba entre esterilidad (o imposibilidad de conseguir embarazo), e infertilidad (incapacidad para conseguir que el embarazo llegue a término después de 1 año manteniendo relaciones sin protección), en la actualidad están considerados como sinónimos.

Frente a la infertilidad, históricamente se han desarrollado diferentes técnicas de reproducción asistida (TRA), en función del motivo original por el cual una pareja no puede concebir.

Si bien la etiología de la infertilidad se distribuye de forma más o menos equitativa entre factor masculino (40%) y factor femenino (40%), y el resto (20%) sería debido a un factor mixto, podríamos a su vez subdividir esta etiología en casos de anovulación, endometriosis factor masculino, factor tubárico, ovario poliquístico, y también casos donde la causa es de origen desconocido, la denominada infertilidad idiopática (2)



**Figura 1. “Distribución de la distintas etiologías”, con un mayor porcentaje (casi 1/3 del total) debido a problemas en la ovulación** (Kuivasaari-Pirinen P. et al. 2012)

Este último grupo es muy importante, ya que se trata de un grupo con problemas para concebir, donde no hay una causa determinada y todos los parámetros aparentan ser normales, al que se debería prestar una mayor atención e investigar más a fondo ya que básicamente implica una falta de información tanto a nivel molecular como celular de las distintas etapas implicadas en el proceso reproductivo. Es por esto por lo que se están focalizando los estudios en análisis embrionarios basados en métodos no

morfológicos que profundicen más acerca de los motivos de los fallos de implantación embrionaria (3)(4)(5)(6).

El objetivo principal de las técnicas de reproducción asistida es generar una descendencia sana con el menor coste médico y de esfuerzo por parte de los pacientes (físico, mental, y económico). 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 se define como el depósito de una muestra seleccionada de espermatozoides en el tracto reproductor femenino. Se recomienda, siempre y cuando se cumplan las siguientes condiciones necesarias para maximizar las probabilidades de éxito:

- 1/ diagnóstico de trompas permeables (7)
- 2/ recuento de espermatozoides móviles progresivos superior a los 2 millones post-capacitación (8).
- 3/ edad de la paciente  $\leq$  38 años (9)
- 4/ buena reserva ovárica (9)
- 5/ tiempo de esterilidad de la pareja inferior a los 5 años (10)

Desde el punto de vista del factor masculino y dependiendo del origen del semen, la inseminación artificial puede ser homóloga (IAH) o con semen de donante (IAD). En cuanto a los resultados globales obtenidos mediante esta técnica, las tasas de embarazo oscilan entre un 5% y un 70% por paciente, aunque en general se acepta una tasa de embarazo por ciclo de un 10-20% para todo tipo de etiologías (11). Cuando la inseminación artificial no funciona o

si la paciente no cumple los criterios mínimos exigidos para el éxito de la técnica, la siguiente opción es cambiar a la fecundación *in vitro* (FIV). 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. Básicamente la FIV es un proceso que se divide en 4 fases:

- 1/ Estimulación ovárica controlada
- 2/ Punción ovárica y recuperación ovocitaria
- 3/ Recuperación espermática y fecundación *in vitro*
- 4/ Selección, transferencia embrionaria y criopreservación de los embriones excedentes

Aunque la indicación inicial para realizar un ciclo de FIV fue la patología tubárica, en la actualidad podemos admitir que la situación ha cambiado y su aplicación abarca un amplio rango de situaciones (factor masculino con alteración seminal severa, esterilidad de causa desconocida, endometriosis, esterilidad multifactorial....)

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 técnica que revolucionó el mundo de la reproducción asistida por el gran avance que supuso la inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), práctica que consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado o liberado de las células de la granulosa (12) y que representa aproximadamente el 40% de los procedimientos efectuados en el laboratorio de fecundación *in vitro*. La FIV convencional precisa una cantidad mínima de espermatozoides móviles por lo

que resulta relativamente ineficaz para parejas cuya situación de infertilidad se debe a un factor masculino severo. Teniendo en cuenta estas condiciones previas, el ICSI ha permitido el tratamiento de la infertilidad masculina pura, logrando gestaciones incluso en casos de mal pronóstico (factor masculino muy grave). Esto acompañado de las mejoras en los métodos de cultivo y en las condiciones del laboratorio, ha permitido la obtención de embriones de buena calidad con elevado potencial de implantación.

## **1.2 Limitaciones de las TRA e inconvenientes de los resultados actuales**

En el siglo XXI resulta evidente la mejora de los resultados clínicos obtenidos en la medicina reproductiva, lo que se demuestra con una disminución del número de embriones transferidos al útero, unido a un aumento en las posibilidades de gestación de las parejas (13).

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 el hecho de que sólo entre el 10-20% de los embriones transferidos al útero sean capaces de dar lugar a un embarazo a término (14)(15).

Los criterios de selección morfológica están correlacionados con las tasas de gestación pero no implican una selección del todo fiable, ya que, por un lado, el valor predictivo de estos criterios clásicos de selección no es perfecto y por otro lado, se ha estimado que entre el 50-70% de los embriones no alcanzan el estadio de blastocisto (16)(17) y por tanto, apoyan la teoría de que sólo una pequeña fracción de estos embriones está destinada a convertirse en un recién nacido vivo (18).

La consecuencia es que una gran mayoría de los embriones obtenidos *in vitro* y transferidos verán interrumpido su desarrollo. Esta incapacidad de distinguir con fiabilidad entre embriones competentes y embriones con limitaciones de desarrollo o de implantación, ha promovido que históricamente siempre se haya transferido más de un embrión.

### **1.3. Consecuencias de las transferencias embrionarias dobles**

Aunque la tendencia actual es la transferencia de un solo embrión (conocido por sus siglas en inglés SET: *single embryo transfer*), hasta ahora siempre se han llevado a cabo las transferencias de 2 ó más embriones para contrarrestar la viabilidad relativamente baja (19)(18).

En un intento para superar este obstáculo, se transfieren más de un embrión con la esperanza de que al menos uno de ellos implante y culmine en un nacido vivo, pero con el riesgo consiguiente de que haya un embarazo gemelar.

El elevado porcentaje de gestaciones gemelares (20) conlleva un aumento en las mujeres sometidas a estas técnicas de ciertos riesgos para la salud tanto de la madre como de los fetos, incluyendo embarazo prematuro, bajo peso del recién nacido, retraso en el crecimiento intrauterino, hipertensión y otras complicaciones obstétricas (21). Además también se ha descrito una incidencia 6 veces superior de riesgo de mortalidad perinatal y morbilidad (22), y 4 veces superior de riesgo de parálisis cerebral (23) en los embarazos gemelares comparado con los embarazos únicos.

Se calcula que el porcentaje de embarazos gemelares con las técnicas de reproducción asistida está alrededor del 20% (24), cifras que no tienen nada

que ver con el porcentaje existente entre la población general generados de forma natural (1%) (25, 26).

A estos dos inconvenientes (poca eficacia y aumento de las gestaciones múltiples) hay que añadir un tercer impedimento, como son, las legislaciones restrictivas de algunos países (tanto en términos de fecundación como de criopreservación embrionaria). Todo ello son motivos suficientes para entender la necesidad de conseguir una mejora de las técnicas de reproducción asistida. De esta forma, en una situación ideal, donde se pueda identificar el embrión que tiene más posibilidades de implantar, se podría disminuir la tasa de gestación múltiple transfiriendo un único embrión, pero sin penalizar las tasas de gestación.

#### **1.4. Mejora de las técnicas de reproducción asistida:**

El éxito de las técnicas de reproducción asistida se podría lograr mediante la mejora de varios procesos:

1/ Mejora en los protocolos de estimulación ovárica, y así obtener una buena calidad de los ovocitos recuperados.

2/ Mejora en la selección y recuperación espermática

2/ Una vez tengamos gametos de buena calidad, podremos obtener embriones de buena calidad, siempre y cuando nuestro sistemas de cultivo estén optimizados al máximo.

3/ Mejora en los métodos de selección de embriones, lo que nos permitirá seleccionar con mayor seguridad qué embrión tiene más posibilidades de implantar, permitiendo llevar a cabo transferencias embrionarias únicas (SET) con mayores garantías de éxito. El resto de embriones de buena calidad serán criopreservados para posteriores intentos si fuera necesario. Actualmente la

mejora en las técnicas de congelación embrionaria ha permitido mantener unas tasas de gestación acumuladas por ciclo tras el uso de los embriones congelados y descongelados muy superiores respecto a las existentes hace unos años (27)(28). De esta manera estaremos dando mayores opciones de gestación por ciclo de estimulación sumando a la posibilidad de gestación de los embriones en fresco la de los descongelados, ya que en caso de no obtener gestación con la transferencia de este embrión, podemos intentarlo con los embriones congelados posteriormente.

La probabilidad de éxito de un ciclo de FIV mayoritariamente dependerá de la edad de la paciente y de la etiología femenina, que se reflejará en la calidad de los ovocitos, así como de la calidad del semen, traduciéndose todo ello en la calidad de sus embriones disponibles.

Por otro lado, para obtener gametos femeninos de buena calidad también es importante llevar a cabo estimulaciones ováricas no muy agresivas, para afectar lo menos posible a la calidad de los ovocitos (29). Por ello se aplican protocolos de estimulación más personalizados con el objetivo de maximizar las opciones de éxito, ya que se ha estudiado el efecto e impacto de los distintos protocolos de estimulación en la calidad de los gametos, y se ha observado diferencias tanto en la calidad de los ovocitos como en la fecundación de estos (30).

Aunque inicialmente la transferencia electiva de un solo embrión se llevaba a cabo en pacientes de buen pronóstico: con edad < 36 años, con primer o segundo ciclo de FIV y con varios embriones de buena calidad, cada día esta práctica es llevada a cabo en más pacientes, ampliando el rango de selección, e incluso recomendado esta práctica en pacientes de hasta 39 años

(31). La necesidad de esta mejora ha promovido que se trabaje más exhaustivamente tanto a nivel médico como tecnológico, para ser capaces de distinguir, con la mayor precisión posible, aquellos que van a tener éxito de los que no. Por consiguiente, el compromiso de mejorar las tasas de embarazo a través de técnicas de fecundación *in vitro* debería encaminarse a la búsqueda de nuevos marcadores de calidad embrionaria para la identificación de mejores embriones que den lugar a descendencia sana.

### **1.5 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), y de acuerdo a estas condiciones, tendremos más opciones de obtener embarazo, no solo por la mayor capacidad de implantación a consecuencia de la mejor calidad, sino por el mayor número de embriones disponibles que hará que tengamos más oportunidades al poder realizar mayor número de intentos.

#### **1.5.1 Marcadores clásicos no invasivos**

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, gracias a los cuales ha sido posible profundizar en la apariencia adecuada de un embrión óptimo en diferentes etapas del desarrollo.

La evaluación morfológica, aunque imperfecta, es actualmente el método de selección embrionaria más frecuentemente usado.

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, con el empleo de criterios de selección morfológica basados en métodos de observación estáticos estamos perdiendo información que puede afectar a los resultados. La explicación más probable es que el examen de la calidad embrionaria en un momento predeterminado no es del todo representativo del desarrollo completo del embrión, por lo que las conclusiones extraídas de la valoración morfológica pueden ser engañosas en relación a la competencia embrionaria. Además, algunos trabajos publicados resaltan similares resultados cuando se transfieren embriones congelados (32) con respecto a la transferencia de embriones frescos (33). La razón es o bien porque las condiciones uterinas y endometriales no eran favorables para la implantación durante la estimulación ovárica, o bien porque 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 a veces no son del todo fiables.

Mientras que el examen morfológico convencional tiene la ventaja de ser un método sencillo, no invasivo y rápido, representa el inconveniente de ser altamente subjetivo, que precisa de formación especializada, cierto grado de experiencia y cierta alteración de las condiciones de cultivo (ya que durante los días de desarrollo embrionario los embriones deben extraerse de los incubadores para su evaluación bajo microscopio), con la consiguiente disminución de las opciones de desarrollo embrionario (34)(35). Si bien es cierto, que hace bastantes años que los laboratorios de FIV seleccionan los

embriones en base a estos criterios morfológicos valorados en unos tiempos preestablecidos, y de alguna forma, los resultados son satisfactorios, la definición de calidad embrionaria es un concepto que puede resultar algo confuso y engañoso, ya que algunas veces la transferencia de embriones de “muy buena calidad morfológica” no cursa con gestación, y en cambio, otras veces (aunque en menor medida) pasa lo contrario, tiene lugar gestaciones en casos donde los embriones transferidos tenían una “calidad morfológica subóptima o pobre”.

Nuevas pruebas más informativas, como las pruebas de diagnóstico cromosómico o genético preimplantacional (DGP) mediante hibridación in situ fluorescente han cobrado gran importancia (36) en la última década. Los problemas que se plantean son que las indicaciones de estos análisis son bastante restrictivas y existe cierta controversia en la literatura sobre su eficacia y beneficios. Algunos artículos argumentan que el empleo de estas técnicas en ciertos tipos de pacientes no mejora las tasas de gestación (37, 38). Otros incluso encuentran que en pacientes de edad avanzada no sólo no se benefician del uso del DGP, sino que empeoran sus tasas de gestación (39)(40). Por otro lado existen artículos que si recomiendan el uso del PGD en ciertos tipos de pacientes, como pacientes de edad avanzada o pacientes con abortos de repetición, ya que en este tipo de pacientes si no usamos el PGD obtenemos peores resultados (41, 42).

Hasta la fecha, para la evaluación de la calidad ovocitaria han sido usados diferentes marcadores de calidad, como la morfología del ovocito propiamente dicha (43), de la zona pelúcida, del corpúsculo polar (44, 45), del huso meiótico (46)(47) y de la viscosidad citoplasmática (44). A nivel zigótico se

han analizado la morfología y posición de los pronúcleos, el número, tamaño y posición de precursores nucleolares (48, 49), la orientación de los corpúsculos polares respecto a los pronúcleos (50, 51) y la presencia del halo citoplasmático (44, 52). Con respecto a las blastómeras del embrión, los parámetros considerados son su número (44, 53), el porcentaje y tipo de fragmentación, el tamaño y simetría (54), la apariencia del citoplasma, la compactación, la multinucleación, el ritmo de división y el contacto entre ellas (53). Todos estos parámetros son usados en conjunto para la evaluación del embrión, aunque la subjetividad de estos parámetros hace que se investiguen nuevos métodos que aporten una selección más objetiva y podamos seleccionar de forma más precisa. Además algunos de ellos, como la distribución pronuclear, han mostrado no tener valor predictivo tras los estudios de time-lapse (55).

### **1.5.2 Nuevos marcadores no-invasivos**

La búsqueda de un test objetivo y fiable que evalúe la viabilidad tanto del ovocito como del embrión que permita la gestación de la paciente, con una disminución de 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.

Actualmente contamos con varios métodos no invasivos de evaluación embrionaria no implementados al 100% en la práctica clínica diaria, pero con gran proyección de futuro:

### **1.5.2.1 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 (56, 57). El experimento clave que vincula el perfil de aminoácidos con el potencial de desarrollo embrionario está diseñado por Houghton (58), quien demuestra 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 ó producción de aminoácidos, independientemente de otros factores como la evaluación morfológica. También ha sido demostrado que la adición de aminoácidos al medio de cultivo disminuye la elevada actividad glicolítica de los embriones creados *in vitro*, una actividad aumentada al producirse estos embriones en el laboratorio (del 28% de glucosa convertida en lactado en embriones *in vivo* se pasa al 76% y 90% *in vitro* a las 3 y 6 h respectivamente) (59). Esta elevada actividad correspondería a un mecanismo de respuesta al sacarlos de su entorno natural. Esta idea ha sido contrastada con varios trabajos, entre ellos uno de Lale y Gardner, mostrando como blastocistos de ratón con mayor actividad glucolítica presentaban menos viabilidad post-transfer que aquellos menos activos (60).

Otros grupos que cobran importancia dentro de los parámetros no morfológicos son el análisis del estrés oxidativo en el líquido folicular (4), el uso

de la luz polarizada para visualización del huso y membranas de la zona pelúcida, el HLA-G como marcador del potencial embrionario (5) y la cuantificación de los niveles del factor de activación plaquetario (PAF) en el medio de cultivo (6).

Estos métodos tuvieron su momento de auge, pero con el paso de los años han caído en desuso debido a los poca practicidad y poca eficacia obtenida, actualmente son métodos no usados en el laboratorio.

### **1.5.2.2 Las “-ómicas” como herramientas de investigación.**

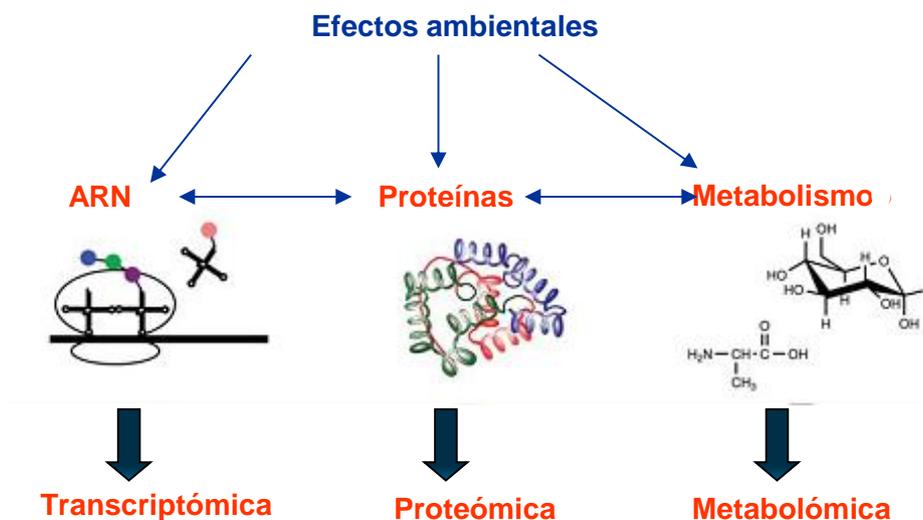
Estas nuevas tecnologías están cambiando la percepción sobre la fisiología de los mamíferos al tratarse de instrumentos que amplían la descripción fenotípica.

**- 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 diagnósticos. 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.

**- 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 (3).

**- Metabolómica.** El examen de los metabolitos presentes en el medio de cultivo ha dado lugar a un método potencial de selección embrionaria que optimiza las oportunidades de gestación mejorando la eficacia de los tratamientos de fecundación *in vitro*. Los estudios publicados hasta el momento describen una correlación directa entre el perfil metabólico y la viabilidad embrionaria. Los perfiles metabólicos que caracterizan a los embriones en distintas etapas del desarrollo están estrechamente relacionados con la competencia del embrión, y por tanto, todos los estudios relacionados han intentado predecir el resultado del ciclo sin resultados concluyentes (61).



**Figura 2. “-Ómicas” como herramientas de investigación**

El grupo de las ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica) ha mostrado evidencias de que los gametos y embriones viables poseen un perfil molecular único que puede ser usado para selección de embriones en términos de desarrollo y viabilidad (3), aunque todavía está lejos de ser implementado en la clínica diaria.

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: poseer un carácter no invasivo, que sean fáciles de usar sin conocimientos específicos ni un entrenamiento excesivo, económicas, rápidas, fiables y reproducibles, que se ajusten al trabajo diario del laboratorio sin forzar cambios en la rutina y que aporten información útil adicional 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 adecuado, por lo que resulta necesario trasladar las muestras a centros especializados. Se trata de ensayos de difícil aplicación clínica por su complejidad, ya que la mayoría precisan de cierto grado de manipulación embrionaria.

Por todo esto, nos centraremos en una nueva metodología prometedora capaz de mostrar parte de un parámetro fisiológico muy importante del embrión, el metabolismo embrionario. Está considerado un procedimiento no invasivo, fácil de manejar, de uso rápido, y con el objetivo de ser una herramienta más del laboratorio de fecundación in vitro.

### **1.6. Estudio de la respiración celular:**

El estudio del metabolismo embrionario, y en particular del consumo de oxígeno, podría mejorar la selección embrionaria a partir de la identificación de los embriones con mayor competencia en el desarrollo. Este factor está

considerado como el mejor indicador de la actividad metabólica global (62), ya que está directamente relacionado con la capacidad del embrión para producir ATP y como un parámetro importante en la evaluación de la calidad embrionaria (63). Además de (62), también otros autores han considerado el consumo de oxígeno como el mejor indicador de actividad metabólica (64).

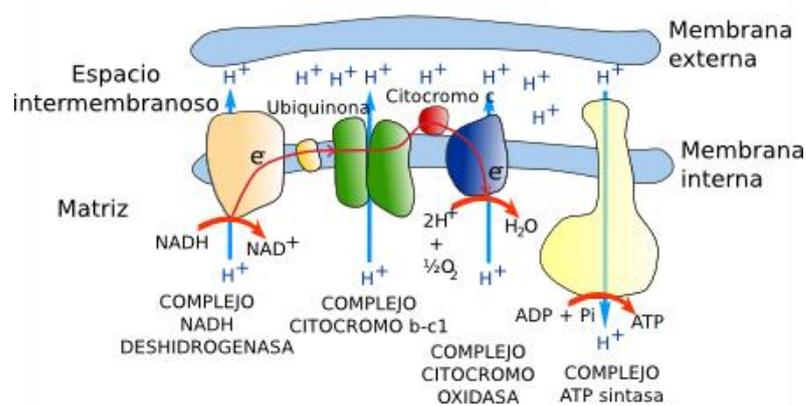
Al conocer la actividad metabólica estamos aportando información relativa a la carga mitocondrial del ovocito, ya que las mitocondrias son las principales productoras energéticas (Figura 3), un factor indicativo del crecimiento y maduración ovocitaria. Una deficiencia en la función o número de mitocondrias en el ovocito implica que no será capaz de completar la fecundación ni llevar a cabo el posterior desarrollo embrionario, puesto que las mitocondrias contribuyen en aspectos como la homeostasis del calcio, esencial para el desarrollo y el suministro de metabolitos durante la generación de energía (65-67). Se ha comprobado que niveles bajos de carga mitocondrial da lugar a bloqueo de maduración ovocitaria, fallos de fecundación y alteración del desarrollo embrionario (65, 66, 68).

La cantidad total de ATP producida viene determinada por 2 mecanismos o vías: la vía aeróbica (fosforilación oxidativa) y la vía anaeróbica (glucólisis). Mientras que a través de la vía aeróbica (donde el ácido pirúvico en presencia de oxígeno es oxidado para producir energía, dióxido de carbono y agua):  $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 38 \text{ energía (ATP)}$  obtenemos la mayor parte de energía(91-97%), mediante la vía anaeróbica (donde una molécula de glucosa es oxidada y dividida en 2 moléculas de piruvato, obteniéndose 2 moléculas netas de ATP y se reducen 2 moléculas de  $NAD^+$ ):  $Glucosa + 2NAD^+ + 2ADP +$

$2\text{Pi} \rightarrow 2\text{Piruvato} + 2\text{NADH} + 2\text{ATP} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$  solo obtenemos una pequeña parte del total de ATP(entre el 2.6-8.7% del total).

Así pues, midiendo el consumo de oxígeno tendremos una aproximación bastante fiable de la producción energética, no toda, pero sí la mayoría. Podríamos entonces afirmar, que la producción de ATP se realiza casi en su totalidad a través de la fosforilación oxidativa.

Las evidencias soportadas por distintos trabajos encontrados en la literatura, que hace que consideremos la actividad metabólica de ovocitos y embriones como buenos predictores de la calidad y desarrollo embrionario, se desarrollaron para calcular el consumo o liberación de hormonas, factores de crecimiento, citoquinas y otros substratos energéticos como la glucosa, el lactato y el piruvato (58).



**Figura 3. Proceso general de la producción de ATP a través de las mitocondrias**  
(webs.uvigo.es)

A pesar de que las mitocondrias no sean especialmente activas en los estadios más tempranos de la división embrionaria sabemos de su papel vital en la competencia ovocitaria y su posterior desarrollo descrito en la literatura. Por tanto, si somos capaces de cuantificar la carga mitocondrial, indirectamente a través del consumo de oxígeno (fosforilación oxidativa), podría traducirse en una manera de diferenciar ovocitos y/o embriones con mayor potencial de

desarrollo embrionario (mayor carga mitocondrial), de aquellos con menos opciones de desarrollo (menor carga mitocondrial).

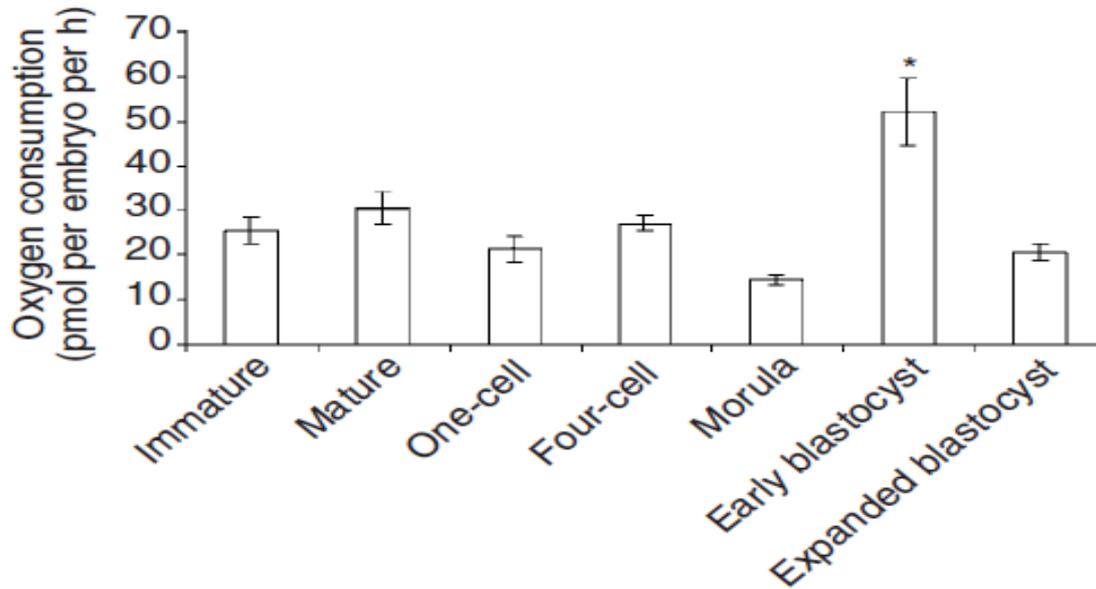
La posibilidad de determinar tasas individuales de consumo en diferentes etapas del desarrollo embrionario puede resultar útil para conocer más a fondo las diferentes necesidades metabólicas de los embriones, e intentar identificar patrones de consumo relacionados con la implantación embrionaria.

Ya han pasado más de 60 años desde las primeras mediciones de oxígeno en ovocitos y embriones de mamífero (70). Los estudios iniciales demostraron que los blastocistos consumían más oxígeno que los embriones en división y que el cambio en la concentración de sustratos metabólicos en el medio de cultivo alteraba la cantidad de oxígeno consumido por los mismos (71). Los siguientes estudios emplearon técnicas de microespectrofotometría para analizar cambios en la oxihemoglobina extracelular como consecuencia del consumo de oxígeno por los embriones (72, 73). Los electrodos estacionarios de oxígeno en estado sólido también han sido empleados tanto para grupos de embriones como para embriones individuales. Magnusson et al publicaron en humanos mediante métodos espectrofotométricos (72) que los embriones que consumían más oxígeno se desarrollaban en mayor medida a blastocisto y tenían mayores tasas de supervivencia que aquellos que consumían menos oxígeno, aunque estos resultados no han sido posteriormente confirmados. Usando también electrodos de oxígeno, Benos y Balaban (74) determinaron que la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS, de sus siglas en inglés) representa entre el 50 y el 70% del oxígeno consumido por los blastocistos para generar ATP por la ATPasa Na/K de

membrana plasmática. Manes y Lai (75) demostraron que una porción del oxígeno total consumido por los embriones no fue invertido en OXPHOS sino en otras oxigenasas. Posteriormente, Houghton et al. (76) desarrollaron una técnica ultra fluorescente para medir el consumo de oxígeno planteando la relación entre los metabolitos del medio y el consumo de oxígeno por los embriones (77).

James R. Trimarchi et al midieron tasas de consumo de oxígeno con electrodos en embriones de ratón. Observaron que los blastocistos consumían  $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$  de oxígeno, mientras que los embriones en estadios tempranos sólo  $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , lo que supone un incremento de dos veces en el consumo de oxígeno durante el estadio de blastocisto. Demostraron que el oxígeno consumido por embriones en estadio de una célula podía modularse por la ausencia de piruvato del medio de cultivo y que el tratamiento con diamida, un agente inductor de muerte celular, resultó en una reducción del consumo de oxígeno. De este modo el gradiente de oxígeno que rodeaba a los embriones tratados (muertos) no variaba a diferencia del que rodeaba a los embriones control o no tratados (69, 77).

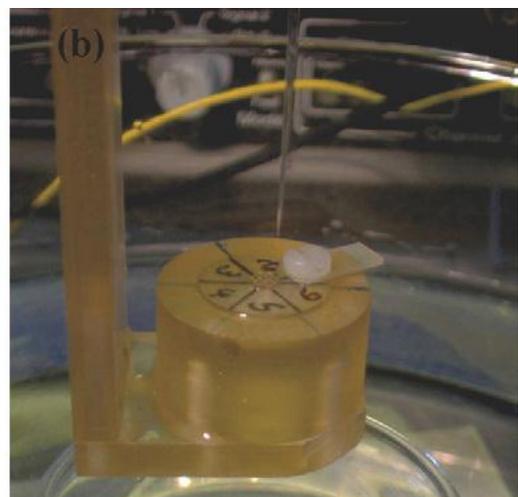
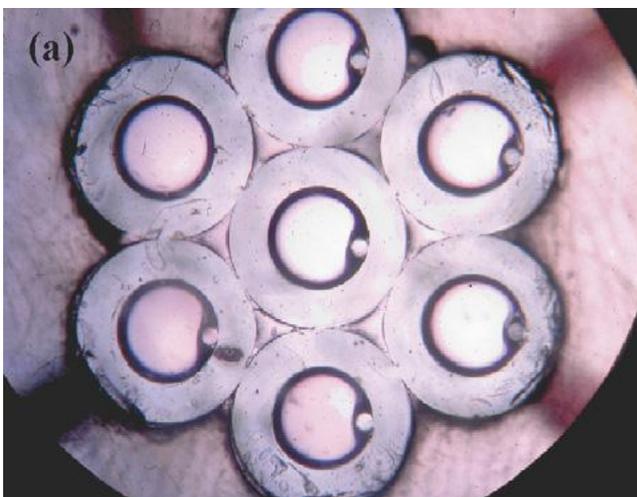
Sturmey et al en el 2003 analizaron el consumo de oxígeno en diferentes estadios embrionarios, no observando diferencias significativas entre ovocitos inmaduros, maduros, cigotos, embriones de 4 células, y mórulas. Cuando sí que vieron que el consumo de oxígeno se incrementaba, con diferencias significativas, era en el momento de la blastulación, alcanzando valores altos en estadio de blastocisto temprano. Cuando los blastocistos se expandían, el consumo de oxígeno volvía a disminuir, volviendo a los valores iniciales de los primeros estadios (78), tal y como muestra la figura 4.



**Figura 4. Consumo de oxígeno medido en pmol/h en diferentes estadios embrionarios, con aumento significativo en el momento de la blastulación.**

*(Sturmey R.Gand Leese H.J.Reproduction 2003 126 197-204)*

El grupo de Lopes y colaboradores fueron los primeros que validaron un sistema de medición de respiración embrionaria (Nanorespirómetro) con el que midieron las tasas de respiración de embriones bovinos en diferentes tiempos, sin verse afectado su desarrollo embrionario (79), tal y como muestra la figura 5.



**Figura 5. Fig. 1. (a) Siete capilares de vidrio unidos, formando lo que se conoce como una “roseta”, y (b) la unidad de medición llamada “nanorespirómetro”. La “roseta” está montada sobre un disco rotatorio, para que los capilares puedan alinearse con el sensor. Los números del disco son usados para saber qué capilar está siendo analizado. Se aprecia el sensor justo arriba del capilar. El cilindro que transporta la roseta es de polisulfonato y el disco es un disco de sujeción, el cual es sumergido dentro del medio durante las mediciones. (Lopes A.S et al. *Theriogenology* 200767 21–31)**

A su vez, basado en la misma tecnología, también validaron el nanorespirómetro, que mide la tasa de consumo embrionario de forma individual e incorpora un sistema de análisis de imagen. El objetivo era usar este consumo embrionario como una posible herramienta para mejorar la selección, y para ello buscaron posibles correlaciones entre tasas de consumo y calidad morfológica, sexo, estadio de desarrollo cinético, diámetro del embrión y la expresión de ciertos genes (80).

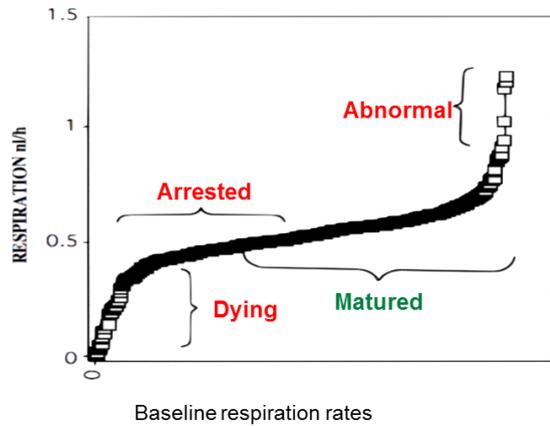
Los datos obtenidos mostraban que las tasas de consumo en bovinos de los embriones producidos in vivo aumentaron de forma directamente proporcional a la calidad morfológica y estadio de desarrollo ( $p < 0.05$ ). La tasa media de consumo no varió significativamente entre los embriones que dieron lugar a embarazo y los que no, pero la transferencia de embriones con tasas de consumo menor de 9.75 fmol/s, entre 9.75-14 fmol/s y mayor de 14 fmol/s resultó en un 48, 100 y 25 % de tasa de embarazo, respectivamente. La tasa media de consumo de embriones producidos in vitro fue mayor que la de los producidos in vivo asociado a diferencias en la calidad morfológica y el estado de desarrollo (80).

En bovinos este mismo grupo investigó la posible relación entre el consumo de oxígeno y la expresión de ciertos genes. Ha quedado demostrado que en el estadio de blastocisto, el ATP es obtenido a través de la glucólisis y

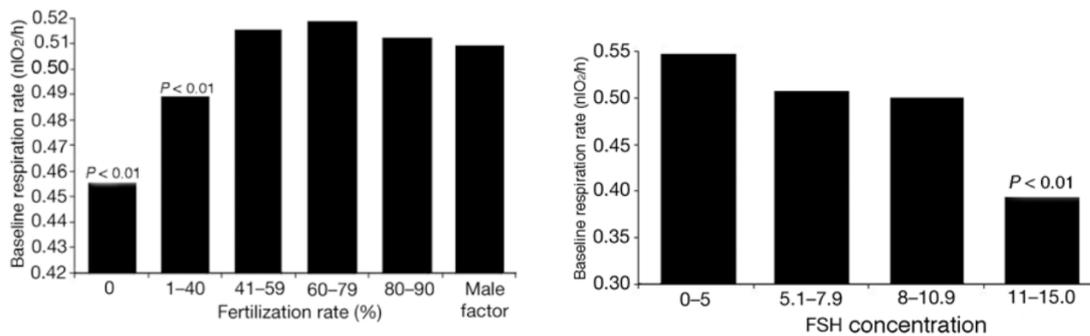
la fosforilación oxidativa (mayoritariamente mediante vía aeróbica), ya que aunque ambas vías (aeróbica y anaeróbica) están activas durante el desarrollo embrionario, es la vía aeróbica la que más presencia tiene durante el desarrollo a blastocisto y la implantación embrionaria (81)(82). Ambos procesos requieren consumo de oxígeno y glucosa, y ambos están regulados por la expresión de GLUT1 y G6PD. Estos autores comprobaron que los niveles de expresión de GLUT1 y G6PD se vieron afectados por la calidad morfológica y el estadio de desarrollo. La expresión de mRNAs de GLUT1 y G6PD se correlacionó con las tasas de consumo, indicando que en blastocistos metabólicamente activos, los consumos de oxígeno y glucosa están aumentados (80).

Posteriormente Scott y cols en el 2008 publicaron datos muy interesantes respecto a las tasas de respiración en ovocitos humanos. Este grupo analizó tasas de consumo de oxígeno en ovocitos madurados in vitro, y en ovocitos de fallos de fecundación. Respecto al primer grupo observaron mayores tasas de consumo en aquellos ovocitos que maduraban correctamente (desde el estadio de vesícula germinal hasta completar la 1ª meiosis y alcanzar el estadio metafase MII), comparado con aquellos que se bloqueaban o degeneraban, donde las tasas observadas eran menores (Figura 6). En el segundo grupo observaron tasas de consumo mayores para aquellos ovocitos donde la fecundación había sido mayor, de modo que a partir de un 40% de fecundación los niveles se mantenían estables, mientras que por debajo de este porcentaje, encontraban niveles de consumo menores, con diferencias significativas ( $p < 0.01$ ), tal y como muestra la figura 7A. Además cuando tenían en cuenta factores claramente relacionados con la salud del ovocito, como era la FSH, encontraban niveles de consumos más bajos: a partir de ciertos niveles de FSH

basal (>11), disminuían los niveles de consumo de oxígeno, con significancia ( $p < 0.01$ ) (83), tal y como se puede apreciar en la figura 7B.



**Figura 6. Tasas de respiración en función de la evolución de los ovocitos inmaduros.** (Scott L et al. *ReprodBiomed Online* 2008 17 461-9)



**Figura 7A. (Izquierda) Tasas de consumo de oxígeno en función de la tasa de fecundación obtenida. Figura 7B (derecha). Las tasas de respiración obtenidas según el rango de FSH basal, con significancia a partir de valores de FSH superiores a 11.** (Scott L et al. *ReprodBiomed Online* 2008 17 461-9)

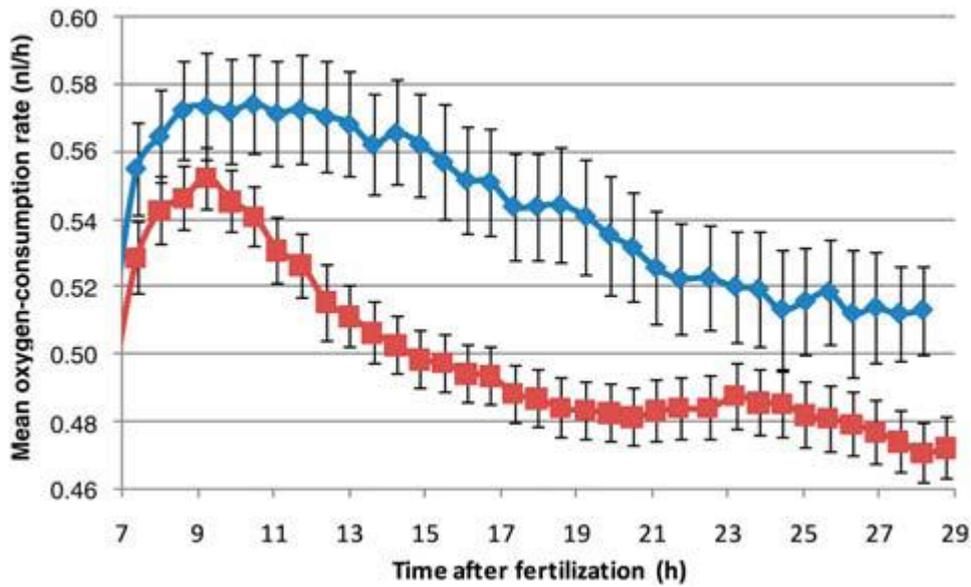
Este trabajo fue la primera aproximación en humanos, y aunque los resultados eran muy interesantes, estaban realizados en ovocitos de uso no clínico, obtenidos a partir de ciclos de reproducción de pacientes en tratamiento, pero, procedían o bien de la cohorte de ovocitos original que no habían completado la 1ª meiosis y estaban en la fase diplotene de la profase I

(eran inmaduros), o bien, que si había madurado a MII, pero no había completado la 2ª meiosis, es decir, no habían sido fecundados por el espermatozoide. Por lo tanto, aunque, el trabajo es la primera experiencia con ovocitos humanos, no podemos extrapolarlos a casos reales por tratarse de ovocitos inmaduros procedentes de ciclos de estimulación ovárica, que son normalmente descartados para su uso clínico.

En el 2010 el grupo de Lopes y cols (82) continuó sus investigaciones con bovinos, y realizaron unos hallazgos muy interesantes. Este grupo encontró un mayor consumo de oxígeno en el momento de la fecundación y cuando se producía la primera división. En concreto, observaron un pico más acentuado de consumo de oxígeno entre las 7-11 horas post fecundación, debido a la mayor actividad mitocondrial a consecuencia de la penetración espermática. Otra hipótesis alternativa a este incremento de oxígeno está relacionada con los niveles de NADPH. Al producirse la penetración espermática el NADPH de procedencia espermática iniciaría una ola de actividad REDOX. Se ha publicado que la correcta maduración ovocitaria y desarrollo embrionario está relacionada de forma indirecta con los niveles NADPH, como papel del glutatión como agente reductor, facilitando la conversión de glutatión reducido a glutatión oxidado (84, 85).

Este pico de consumo de oxígeno post fecundación había sido observado en ratones y en ascidias por otros autores (66, 67, 86)(87). Otros autores habían observado este incremento en ratones en el momento de la glucólisis y en la fosforilación oxidativa cuando se producía la formación pronuclear (88). Con estos descubrimientos Lopes et al., confirmaban lo que se había publicado anteriormente, pero en bovinos.

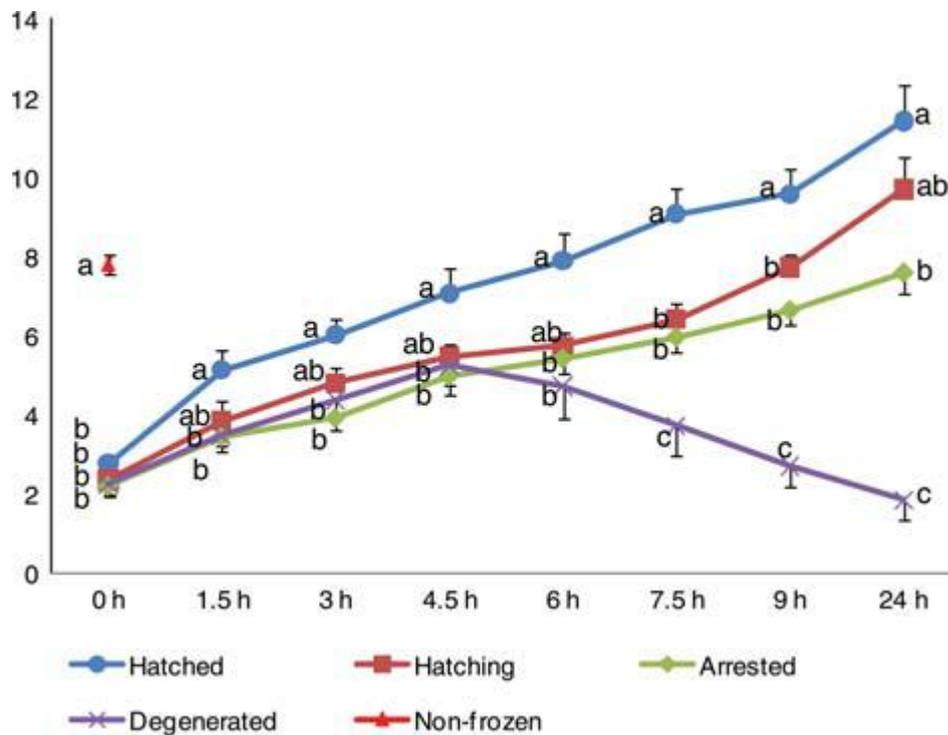
También observaron un pico menos acentuado de consumo de oxígeno entre las 22-25 horas post fecundación, correspondiendo al momento cuando se producía la primera división, debiéndose a una mayor demanda energética para el inicio de la división celular (82), tal y como muestra la figura 8.



**Figura 8. Picos de oxígenos detectados en el momento de la fecundación (7-11 h post-fecundación) y en el momento de la primera división (22-25 h post-fecundación). La línea azul corresponde al grupo control (ovocitos madurados in vitro que no fueron inseminados), mientras que la línea roja corresponde a los cigotos correctamente fecundados. (Lopes A.S et al. *HumReprod* 2010 25 2762-7**

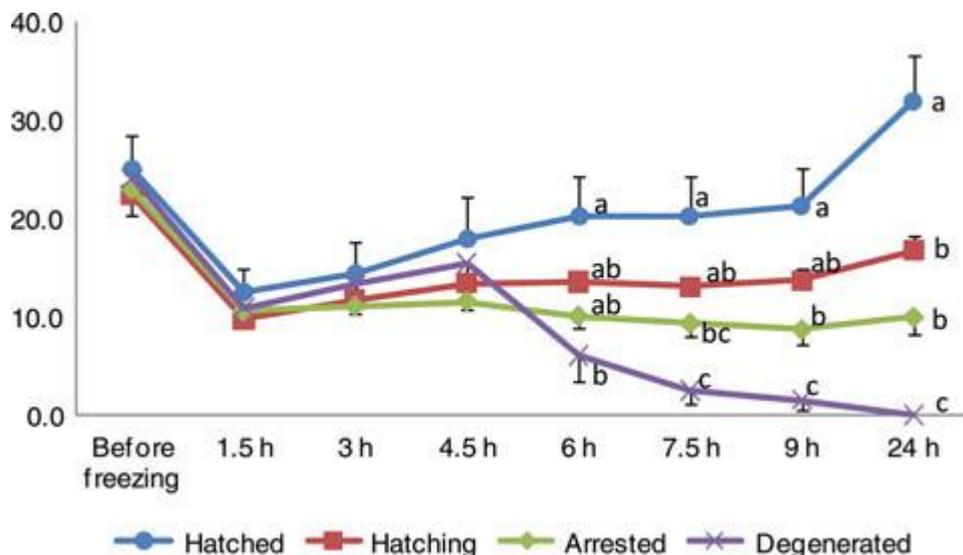
En el 2011 Yamanaka et al (89) publicó un trabajo analizando consumo de oxígeno en embriones humanos. En concreto, analizaron tasas de consumo de oxígeno en embriones en estadio de blastocisto, comparando estas tasas en función de si los embriones habían sido congelados o procedían del ciclo en fresco. Además en los embriones que habían sido descongelados analizaban el consumo dependiendo de la evolución del blastocisto descongelado (con 4 categorías establecidas: degenerado, bloqueado, eclosionando o bien eclosionado).

Los resultados obtenidos mostraban una diferencia importante en el consumo de oxígeno entre los blastocistos frescos;  $7.8 \pm 0.3$  fmol/s ( $n = 10$ ) y los descongelados:  $2.4 \pm 0.1$ fmol/s ( $n = 44$ ) ( $p < 0.05$ ), como se observa en la figura 9.



**Figura 9.** Se aprecia la tasa de consumo de oxígeno mucho más baja en los blastocistos recién descongelados (0 h), comparado con los frescos ( $p < 0.05$ ). También se aprecian cambios en el consumo de oxígeno a medida que transcurre el tiempo después de desvitrificar los blastocistos, con diferencias importantes a partir de las 4.5 h post descongelados. (Yamanaka M et al. HumReprod 2011 12 3366-71)

Cuando analizaron las tasas de consumo de oxígeno de los blastocistos desvitrificados en función de la evolución de éstos, es decir, en función de si continuaban su desarrollo, o bien, si se bloqueaban o degeneraban, observaron que los blastocistos que tras descongelar evolucionaban correctamente (eclosionaban parcial o totalmente), mostraban mayor consumo de oxígeno que aquellos que se bloqueaban o degeneraban, algo que se evidenciaba a partir de las 4.5 horas post-descongelación. Además, si a las 6 horas post-descongelación el embrión morfológicamente había degenerado, mostraba una caída brusca en el consumo de oxígeno ( $1.8 \pm 0.5$  fmol/s ( $n=16$ ) a las 24 h, tal como muestra la figura 10.



**Figura 10.** Diferencias en el consumo de oxígeno a medida que transcurre el tiempo de descongelación, con similares tasas de consumo tras descongelar, mientras que a partir de las 4.5 h post-descongelación se evidencias importantes diferencias entre los blastocistos evolucionados (eclosión total o parcial) y los no evolucionados (bloqueados o degenerados). (Yamanaka M et al. HumReprod 2011 12 3366-71)

De manera indirecta este trabajo evidenciaba que una vez descongelados los blastocistos, podíamos realizar una mejor selección mediante el consumo de oxígeno, ya que morfológicamente se contraían y necesitábamos más horas post-descongelación para corroborar la evolución, mientras que mediante el consumo de oxígeno después de 3 horas de cultivo post-descongelación, los niveles obtenidos nos mostraban cuales iban a evolucionar correctamente y cuáles no, o sea, que nos podía predecir la viabilidad de los blastocistos al cabo de poco tiempo tras su descongelación.

Existen trabajos en la literatura acerca de la calidad de los ovocitos condicionada por los protocolos de estimulación ovocitaria. Estos trabajos muestran como la calidad de los ovocitos (y por tanto de los embriones) resultaría subóptima cuando se llevan a cabo estimulaciones más agresivas o inadecuadas (90-92), por tanto, será de esperar que diferentes regímenes de estimulación afectarían a la calidad de los óvulos, y por tanto, con diferencias en el consumo de oxígeno.

En la misma línea, también se ha publicado mucho respecto a los diferentes dimorfismos ovocitarios y su posible repercusión en el resultado final reproductivo (93-100). En este caso existe mucha controversia respecto al impacto de la morfología del ovocito en el desarrollo embrionario, por lo que una forma de hacer una evaluación más objetiva de la morfología ovocitaria, sería averiguando si existe un consumo de oxígeno diferente según la morfología del ovocito.

De la misma manera, está publicado que aquellos ovocitos que presentan una adecuada carga mitocondrial presentarán una correcta fecundación y un buen desarrollo embrionario (81)(65, 66, 68, 86, 101-103)

(104), también nos hace pensar que aquellos ovocitos que presenten una correcta fecundación y un buen desarrollo embrionario, tendrán consumos de oxígeno diferentes y mayores (debido a la mayor actividad mitocondrial al penetrar el espermatozoide), que aquellos que no fecunden correctamente o bien que fecunden correctamente y den lugar a embriones de peor desarrollo.

Hasta ahora se había publicado en la literatura diferente consumo de oxígeno dependiendo del estadio y calidad del embrión, pero en ratones y bovinos (76, 79, 80, 105, 106), no en humanos. Por esto, hemos querido comprobar si en humanos también pasa lo mismo, esperando un consumo de oxígeno diferente según el estadio evolutivo del embrión, y la calidad de los mismos.

Cabe esperar un mayor consumo de oxígeno justo en el momento de la primera división embrionaria, debido a una mayor demanda energética requerida para completar la división celular y completar así el primer ciclo celular, tal y como está publicado en bovinos (82), por lo que también hemos medido este parámetro justo en el momento de la citocinesis, esperando un mayor consumo.

Por último, se ha descrito que aquellos embriones que implantan, dando lugar a embarazo evolutivo, presentan un perfil metabolómico distinto que aquellos que no logran implantar y por tanto no dan lugar a gestación evolutiva (107)(86, 103, 108-110). Por tanto, cabe esperar que aquellos embriones que implantan y dan lugar a embarazo evolutivo tendrán consumos de oxígeno diferentes de aquellos que no lo logran.

## 2. OBJETIVOS

Por todo esto expuesto anteriormente, nuestro estudio se centrará en el consumo de oxígeno de los ovocitos y embriones en diferentes situaciones:

## **2.1 OBJETIVO GENERAL:**

1. Evaluar la relación entre el consumo de oxígeno del embrión y el éxito reproductivo

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Determinar si la estimulación ovárica y la morfología ovocitaria afectan al consumo de oxígeno
2. Analizar si existen diferencias en el consumo de oxígeno de los ovocitos que dan lugar a cigotos correctamente fecundados y con evolución favorable, comparada con aquellos que presentan una fecundación nula.
3. Determinar si existe variación en la tasa de consumo de oxígeno en los diferentes estadios embrionarios y en función de la evolución final del embrión.
4. Determinar el consumo de oxígeno antes y después de la citocinesis.
5. Determinar el consumo de oxígeno según el ritmo de división embrionario.
6. Determinar los niveles de consumo de oxígeno en los embriones que implantan, dando lugar a embarazo, y compararlo con los que no implantan.

## 3. HIPÓTESIS

Basándonos en trabajos acerca de la calidad ovocitaria en función de los diferentes protocolos de estimulación y en conocimientos previos acerca del consumo de oxígeno en diferentes modelos animales dependiendo del estadio y la calidad de los embriones, nos hemos planteado varias hipótesis de partida en el presente trabajo:

**Hipótesis objetivo específico número 1:**

Dependiendo del protocolo de estimulación utilizado, y de la morfología resultante ovocitaria, existirán diferencias en el consumo de oxígeno de los ovocitos.

**Hipótesis objetivo específico número 2:**

Existirá un mayor consumo de oxígeno en aquellos ovocitos con mayor probabilidad de ser fecundados, que dan lugar a mejores embriones y con opción de implantar, comparados con aquellos ovocitos sin fecundar.

**Hipótesis objetivo específico número 3:**

Dependiendo de la evolución y del estadio de desarrollo embrionario, la necesidad energética es distinta, por lo tanto, cabe esperar un consumo de oxígeno diferente según el estadio, la calidad y su evolución final.

**Hipótesis objetivo específico número 4:**

Existencia de un mayor consumo de oxígeno en la primera división embrionaria, como consecuencia de la alta demanda energética debido al inicio del segundo ciclo celular.

**Hipótesis objetivo específico número 5:**

Si el ritmo de desarrollo embrionario es adecuado u óptimo, el consumo de oxígeno será diferente de aquellos embriones con ritmos inadecuados o fuera de los rangos óptimos de división.

**Hipótesis objetivo específico número 6:**

Aquellos embriones que den lugar a embarazo, y por tanto que implanten, tendrán un consumo de oxígeno mayor (mayor demanda energética).

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

## **4.1 DISEÑO:**

El comité ético de investigación clínica del IVI Valencia aprobó el estudio planteado. Este proyecto cumple las leyes gubernamentales españolas de tecnología de Reproducción asistida (14/2006).

La población sujeta a estudio estará formada tanto por donantes de óvulos pertenecientes al programa de donación de ovocitos del IVI (111, 112), (en los que se llevará a cabo el análisis del consumo de oxígeno), como las receptoras de estos óvulos (que recibirán los embriones originados a partir de estos óvulos).

De forma general hay una serie de procedimientos que comparten ambas fases de estudio (tanto la fase de consumo de oxígeno ovocitario como la fase de consumo de oxígeno embrionaria), que paso a explicar detalladamente:

### **4.1.1 Donantes de ovocitos:**

Los criterios de inclusión de las donantes en el programa están basados en su historia, evaluación clínica y pruebas de laboratorio. Básicamente fueron: ciclos de menstruación normal de 26-34 días de duración, edad entre 18-35 años (según la legislación actual), peso de la paciente que no afecte a las tasas de gestación o implantación (índice de masa corporal entre 18-28 Kg/m<sup>2</sup>)(113), y no tratamientos endocrinos en los 3 meses previos al estudio. Todas las donantes fueron testadas para HIV, citomegalovirus, hepatitis B y C, y screening del cariotipo (111).

Todas las donantes de ovocitos fueron informadas respecto al tratamiento de fecundación in vitro, posibles complicaciones, y aspectos legales de la donación de ovocitos. Las que estaban de acuerdo, firmaron el debido consentimiento informado y formaron parte del programa de donación de ovocitos.

#### **4.1.2 Receptoras de ovocitos:**

Se llevó a cabo una selección controlada de pacientes receptoras de ovocitos donados, quedando fuera del estudio aquellas que cumpliera alguno de los criterios de exclusión: endometriosis, hidrosalpinx, índice de masa corporal mayor de 30, alguna patología uterina (mioma, adenomiosis, endocrionopatología, trombofilias, patología crónica, anormalidades uterinas congénitas o adquiridas), pérdida recurrente de embarazo, edad de la madre avanzada (mayor de 45 años) o factor masculino severo (menor de 5 millones de totales móviles progresivos en el eyaculado). Todas las receptoras de ovocitos fueron informadas respecto al tratamiento de fecundación in vitro, posibles complicaciones. Las que estaban de acuerdo, firmaron el debido consentimiento informado y formaron parte del programa de receptoras de ovocitos.

La donación de ovocitos es un procedimiento (también basado en la FIV) originariamente desarrollado para la consecución del embarazo en mujeres sin función ovárica (menopausia precoz natural). Sin embargo, y gracias en parte a sus excelentes resultados, las indicaciones se han ido ampliando a lo largo de los años, incluyendo mujeres que sin ser menopáusicas presentan una reserva

ovárica limitada o han fracasado en múltiples intentos de reproducción asistida con sus propios gametos (114). Las principales indicaciones de la donación de ovocitos son el fallo ovárico, la menopausia, las disgenesia gonadal, fallo repetido de FIV de causa ovocitaria y baja reserva funcional ovárica (114).

En nuestro estudio las receptoras de estos ovocitos eran pacientes que, cumpliendo los criterios de inclusión, habían acudido al centro para un tratamiento de infertilidad, y el ginecólogo, tras revisión de la historia clínica, exploración, ecografía y test hormonal, había considerado que la única opción para conseguir embarazo, era someterse a un tratamiento de donación de óvulos.

Paralelamente a la estimulación de las donantes se llevó a cabo la preparación endometrial de las receptoras de los óvulos, tal y como paso a describir a continuación:

#### *Preparación endometrial de las receptoras*

El protocolo usado para la preparación endometrial de las receptoras ha sido publicado anteriormente (115-118).

Las pacientes con función ovárica activa fueron desensibilizadas con una única administración intramuscular de triptorelina 3.75 mg "*depto.*" (Decapeptyl 3.75 mg; Ipsen-Pharma, Barcelona, Spain) administrada entre 18-21 días del ciclo previo. La sustitución de estrógenos fue iniciada en el día 3-5 del nuevo ciclo de menstruación, después de confirmar la quiescencia ovárica y un determinado grosor endometrial mediante ecografía transvaginal.

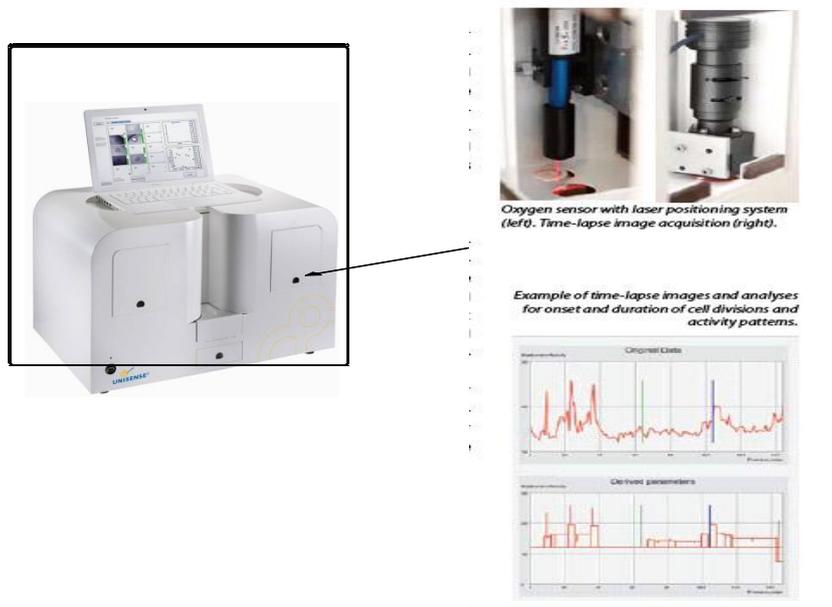
Se administró (vía oral) valeraniato de Estradiol, la cantidad administrada es de 2 mg/día (Progynova; Schering, Madrid, Spain) durante los 8 primeros días,

incrementándose a 4 mg/día durante los 3 días posteriores, finalmente se aumentó la dosis a 6 mg/día hasta el momento del test de embarazo. El grosor del endometrio ha sido considerado como un importante factor pronóstico para el resultado del tratamiento. En ciclos de donación de ovocitos se ha observado una correlación entre el grosor endometrial y el resultado del ciclo (119)(120)(121). En algunos laboratorios, la suplementación con progesterona no se empieza si la línea endometrial es más fina de 9 mm o más gruesa de 12 mm (122). En nuestra experiencia el grosor endometrial no es un factor determinante en el pronóstico del ciclo. Incluso endometrios finos (<7 mm) tienen buenas tasas de gestación e implantación, sin ningún incremento en la tasa de aborto (118). Únicamente el ciclo se canceló en casos de sangrado vaginal de la receptora durante la administración del valerianato de estradiol (30). Una vez comprobada la fecundación, las pacientes iniciaron la administración de progesterona (P) intravaginal micronizada (Progeffik, Laboratories Effik S.A., Madrid, Spain), con una dosis diaria de 800 mg/día, continuando con esta dosis al menos hasta el resultado del embarazo (123). Cuando el test de embarazo fue positivo, la administración de valerianato de estradiol y de P micronizada continuó hasta 80 días después del test de embarazo.

Todos los experimentos del análisis del consumo de oxígeno fueron llevados a cabo mediante el EmbryoScope™ Versión C (UnisenseFertiTech, Aarhus, Denmark), que paso a describir detalladamente:

### 4.1.3 El EmbryoScope Versión C (ESC)

El ESC es un incubador de nueva generación con control de la temperatura y gas. Consta de un microsensor, que facilita la medición automática del consumo de oxígeno del ovocito o embrión, basado en el principio de respirometría (Figura 11).



**Figura 11. Esquema del incubador EmbryoScope versión C, con la imagen ampliada del microsensor, mediante el cual se mide la tasa de oxígeno consumida.** ([www.unisense.com](http://www.unisense.com))

El microsensor es un sensor de oxígeno electroquímico tipo Clark (OX50, con diámetro de entre 40–60 mm; UnisenseFertiliTech A/S, Aarhus, Denmark), capaz de llevar a cabo la medición sin alterar la rutina de laboratorio, con una duración aproximada por medición de 90 segundos por pocillo. El incubador además del microsensor incluye un sistema de imagen (CCD cámara 1280 x 1024 pixel), y un microscopio que consta de una lente

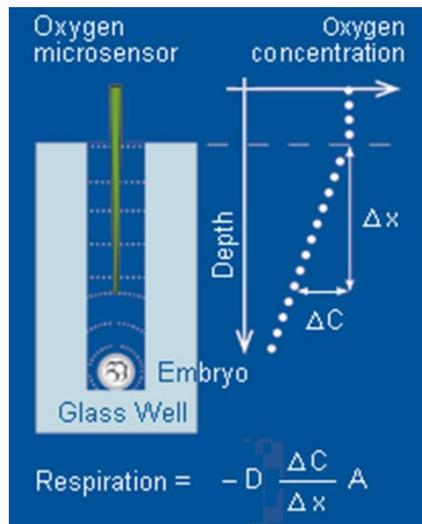
modificada de contraste Hoffman con un objetivo 20 x (Leica), proporcionando una alta sensibilidad y resolución para la longitud de onda del rojo (3 pixel/ $\mu\text{m}$ ). El sistema de imagen usa luz roja de baja intensidad (650 nm) a partir de un sistema LED con tiempos de iluminación cortos de 30 ms por imagen, y así obtener imágenes de embriones en desarrollo durante los días del cultivo. Como consecuencia se obtiene una imagen por pocillo en menos de 10 segundos, incluyendo el enfoque previo. Las imágenes obtenidas mediante el sistema de time-lapse que incluye el ESC, fueron consideradas para la última parte del estudio, centrándonos en el consumo de oxígeno para esta primera parte, y considerando las imágenes para la parte final.

#### **4.1.4 Medición del consumo de oxígeno**

La técnica de medición es bastante sensible y segura, permitiendo mediciones exactas con márgenes de error de  $0.05 \text{ ni/h}^{-1}$  ( $=0.6 \times 10^{-15} \text{ mol s}^{-1}$ ). La técnica empleada la describió Lopes et al en su artículo (80). Respecto a la seguridad de la técnica ha sido descrito y publicado su uso clínico en ovocitos humanos, mostrando buenas condiciones de cultivo al tener la misma tasa de fecundación cuando cultivamos ovocitos en el ESC o en un incubador convencional (124), mostrando resultados clínicos de embarazo similares que aquellos obtenidos en el programa de donación de ovocitos (125).

Brevemente, el ovocito se coloca en el fondo del micropocillo (0.5 mm diámetro y 1.5 mm profundidad) en la placa del ESC (EmbryoSlide <sup>TM</sup>). A medida que el ovocito o embrión consume oxígeno, la concentración de éste en el fondo del pocillo se va reduciendo, estableciéndose un gradiente de

concentración de oxígeno lineal desde el fondo hasta la superficie del pocillo. Este gradiente generado dentro del pocillo es medido por el sensor de oxígeno y como resultado la tasa de consumo de oxígeno puede ser estimada según la ley de difusión de FICK, multiplicando una constante (Coeficiente de difusión molecular  $O_2$ :  $3.379 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  a  $37^\circ\text{C}$  y 9% salinidad), por el área transversal del pocillo ( $0.25 \text{ mm}^2$ ), según la fórmula descrita en la figura 12:



**Figura 12. Descripción del cálculo del consumo de oxígeno, teniendo en cuenta la constante (A), la profundidad del pocillo ( $\Delta C/\Delta x$ ) y el diámetro (D).**  
([www.unisense.com](http://www.unisense.com))

La tasa de oxígeno puede ser calculada en nanolitros por hora (nl/h) o en femtomoles por segundo (fmol/s), en nuestro caso fue calculada y expresada en fmol/s, usando una solubilidad de  $O_2$  en el medio de  $200.4 \mu\text{mol/L}$  a  $37^\circ\text{C}$  y 9% salinidad. El hecho de que el pocillo sea tan estrecho evita cálculos erróneos de la tasa de consumo de oxígeno, ya que esta estrechez afecta directamente a la seguridad de los cálculos de difusión. El diseño de la placa hace que sea impermeable al intercambio gaseoso, y el microelectrodo de  $O_2$

es recalibrado de forma automática al comienzo de cada nuevo ciclo de medición.

Antes de iniciar cada medición del consumo de oxígeno, se realizó una calibración del sensor. Ésta fue llevada a cabo introduciendo el microsensor en 4 soluciones de una placa NUNC de calibración: solución 1—HCl (0.1 M, pH 1) y detergente (2% ES 7X-PF, MP BioMedicals, Irvine, CA, USA), para el lavado del sensor; solución 2—solución alcalina de ascorbato sódico (0.1 M de ascorbato sódico y 0.1 M NaOH), para calibración al 0% de O<sub>2</sub>; solución 3—solución salina a pH 7.2(PBS), para nuevo lavado del microsensor; solución 4—medio de cultivo, el mismo usado para el cultivo embrionario en la placa EmbryoSlide™, para calibración al 19% O<sub>2</sub>. La calibración del ESC fue llevada a cabo mediante la introducción del microsensor de manera continua en las 4 soluciones y así tomar valores de referencia correspondientes al 0 y al 19% de O<sub>2</sub>. El tiempo requerido para llevar a cabo la medición del consumo de oxígeno no excedía de 30 minutos.

El análisis de los ovocitos MII se llevó a cabo en las placas del ESC (EmbryoSlide™ Unisense FertiliTech, Aarhus Denmark), preparadas previamente durante un mínimo de 4 horas y así asegurar el pre-equilibrado a 37°C y a 5.0% CO<sub>2</sub> atmosférico. Después del preequilibrio de las placas, algunas burbujas aparecieron en los pocillos como consecuencia de la diferencia de temperatura entre el medio de cultivo, aceite de la nevera y los 37°C del incubador donde se gasean las placas durante las 4 horas previas, de modo, que todas las burbujas aparecidas fueron eliminadas antes de colocar los ovocitos. La eliminación de las burbujas es absolutamente necesaria,

primero para evitar mediciones erróneas, y en segundo lugar, para evitar imágenes alteradas o distorsionadas.

Las placas constan de una depresión central, conteniendo 12 pocillos de columnas cilíndricas, cada uno de ellas con 20  $\mu$ L de medio QACM (Quinn's Advantage Cleavage medium), todos ellos cubiertos con una capa de 1.2 ml de aceite mineral para evitar la evaporación del medio de cultivo.

Además para cada placa del ESC se pusieron 2 pocillos sin ovocitos, únicamente con medio de cultivo, para así obtener 2 valores de control negativo y poder corregir mediciones erróneas captadas por el sensor, y compararlas con los valores del grupo de estudio.

#### **4.1.5 Obtención de los ovocitos**

La punción folicular se llevó a cabo 36 horas después de administrar la hCG para completar la maduración ovocitaria. Se realizó bajo sedación, mediante ecografía guiada, y en un quirófano contiguo al laboratorio de FIV, con el fin de que el traslado de los tubos al laboratorio fuera lo más rápido posible. Los tubos con el líquido folicular se mantuvieron a 37<sup>a</sup> C mediante bloques térmicos calefactados. Una vez en el laboratorio se siguen los siguientes pasos:

- Verter el líquido folicular sobre las placas *petri* precalentadas.
- Buscar los ovocitos mediante inspección directa del líquido de la punción, siempre con el objetivo de menor aumento (8-10X), con el fin de obtener un mayor campo visual.

- Una vez localizado el ovocito, aspirar un poco de medio tamponado con una pipeta Pasteur, recoger el ovocito y depositarlo en una placa de lavado.
- Si el ovocito se encuentra adherido a un coágulo de sangre, proceder a eliminarlo con la ayuda de agujas y jeringas de insulina.

#### **4.1.6 Decumulación de los ovocitos**

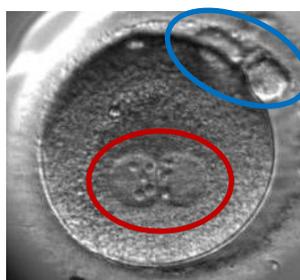
Para ambos casos la metodología de trabajo fue la misma: una vez obtenidos los ovocitos tras la aspiración folicular, los complejos corona-cúmulo-ovocito fueron lavados en medio QAM: Quinn's Advantage medium (SAGE, Rome, Italy). Después del lavado, los ovocitos rodeados de las células de la granulosa, fueron cultivados en medio QAFM: Quinn's Advantage Fertilization medium (Sage Rome, Italy) al 5.2% CO<sub>2</sub> y 37°C durante 3-4 horas, antes del proceso de decumulación. La decumulación de las células de la granulosa consiste en la eliminación de las células de alrededor del ovocito mediante acción mecánica ayudados por una enzima. Ésta fue llevada a cabo mediante pipeteado en medio QAFM diluido al 50% con la enzima hialuronidasa 40 IU/ml. La decumulación de los ovocitos es necesaria por 2 cosas: primero para comprobar el grado de madurez de éstos, y segundo, para llevar a cabo la microinyección, es decir, para poder sujetar al ovocito e inyectar el espermatozoide.

#### **4.1.7 Microinyección ovocitaria:**

En todos los casos se llevó a cabo la inseminación de los ovocitos mediante la técnica ICSI (126) (127), que consiste en la microinyección de un espermatozoide en el interior de un ovocito previamente decumulado, ya que técnicamente sería imposible medir el consumo de oxígeno de los mismos sin decumular, es decir, con la corona de células de la granulosa no habría espacio físico para introducir el ovocito en el pocillo, y, por otro lado, el análisis del consumo de oxígeno sería generado a partir de 2 tipos de células; el ovocito y las células de la granulosa, siendo imposible diferenciar la procedencia.

#### **4.1.8 Fecundación**

La fecundación de los ovocitos viene determinada por una correcta activación ovocitaria, produciéndose una serie de eventos necesarios para el correcto desarrollo embrionario: incremento en los niveles de calcio intracelular, la exocitosis de los gránulos corticales para prevenir la polispermia, extrusión del segundo corpúsculo polar (culminándose la 2ª meiosis) y la aparición de los pronúcleos (paterno y materno), con la consecuente replicación del ADN y la primera división mitótica. A la hora de visualizar esta correcta fecundación tenemos que diferenciar los 2 corpúsculos polares y los 2 pronúcleos, tal y como muestra la figura 13:



**Figura 13: Zigoto humano mostrando la correcta fecundación de un ovocito: con el círculo rojo rodeando los 2 pronúcleos materno y paterno, y con el círculo azul rodeando los 2 corpúsculos polares, confirmando la culminación de la 2ª meiosis.**

#### **4.1.9 Cultivo y evaluación embrionaria**

Los embriones fueron cultivados en medio de cultivo QACM suplementado con un 10% de proteína (HSA *Sage in Vitro Fertilization*) hasta el día de la transferencia (aproximadamente 72 horas post-ICSI), momento en el cual fueron seleccionados para la transferencia basándonos en los criterios morfológicos. La morfología embrionaria fue evaluada tanto en día 2 de evolución (48 h después del ICSI), como en día 3 (69 h post ICSI), teniendo en cuenta el número, la simetría, y la granulosis de las células, tipo y porcentaje de fragmentación, presencia de células multinucleadas, y grado de compactación, parámetros descritos previamente (53).

Los embriones eran considerados como embriones de buena calidad si cumplían las siguientes características: no presencia de células multinucleadas, presencia de entre 2-5 células en día 2 de evolución, y entre 6-10 células en día 3, todas ellas simétricas o ligeramente asimétricas. Por último respecto al volumen de fragmentos, deben ocupar un porcentaje inferior al 15%. Cuando el embrión no cumplía una o más de las características arriba señaladas era considerado como un embrión de subóptima calidad.

##### *Análisis Estadístico:*

La mayor parte de las medias de las tasas de consumo de oxígeno por ovocito siguieron una distribución normal. Fueron analizadas con test de Student o ANOVA y test bonferroni cuando se tuvo en cuenta grupos múltiples.

El análisis de regresión logística fue empleado para analizar el efecto de la tasa de consumo de oxígeno en la fecundación de los ovocitos.

Los análisis estadísticos se realizaron con el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significancia estadística fue definida en  $p < 0,05$ .

## 4.2 Ovocitos

En la primera fase se llevó a cabo un estudio observacional de cohortes de manera prospectiva en el que se analizó el consumo de oxígeno de los ovocitos.

En esta primera fase se llevó a cabo la medición del consumo de oxígeno, correlacionándolo con parámetros de estimulación (dosis administrada de gonadotrofinas, días de duración de la estimulación y estradiol alcanzado pre-hCG). A su vez, también se correlacionó este consumo de oxígeno con parámetros de laboratorio (morfología ovocitaria, fecundación, calidad de los embriones resultantes e implantación de los embriones resultantes). Para esta fase del estudio (fase I), se incluyó un total de 395 ovocitos, obtenidos a partir de 56 ciclos de donación de ovocitos, entre enero y mayo del 2010. De los 395 ovocitos, obtuvimos un total de 349 maduros (metafase II), usando los mismos medios de cultivo usados en un cultivo convencional.

Lo primero que paso a describir es la estimulación ovárica de las donantes de esta primera fase (que difiere de la segunda fase):

#### **4.2.1 Estimulación ovárica de las donantes de ovocitos**

Todas las donantes fueron sometidas a un protocolo largo de desensibilización hipofisaria con dosis diaria de agonistas de la GnRH (GnRH-a) (Procrin ®; Abbott, Madrid, Spain). Tras la desensibilización el recuento mínimo de folículos antrales en el primer día de la administración de gonadotrofinas debía ser como mínimo 12 (128).

Para llevar a cabo la estimulación ovárica controlada nos basamos en el mismo protocolo usado por este grupo (30). Brevemente, las donantes fueron agrupadas con 3 protocolos de estimulación usando distintos tipos de gonadotrofinas; grupo 1 (n=14), 225 IU de rFSH (Gonal-f; Merck Serono, Madrid, Spain); grupo 2 (n=28), 225 IU de HP-hMG (Menopur; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, Spain); grupo 3 (n=14), 150 IU de rFSH (Gonal-f; Merck Serono) plus 75 IU HP-hMG (Menopur; Ferring). Cuando había 3 o más folículos con un tamaño de 18 mm de diámetro se administró la hCG (Ovitrelle®, 250 µg; Serono, Madrid, Spain), y la aspiración folicular se llevó a cabo 36 horas más tarde. Los niveles de estradiol y progesterona se midieron el día de administración de la hCG, para controlar posibles ovulaciones o caídas de estradiol, que pudieran afectar negativamente al resultado del ciclo.

Tras la obtención de los ovocitos, se llevó a cabo la decumulación de las células de la granulosa a las 3 horas post-punción.

Tras la decumulación de las células de la granulosa y comprobar el grado de madurez, aquellos que habían completado la metafase de la primera

meiosis (han madurado y se encuentran en estadio metafase II) se colocan en el Embryoscope versión C (ESC) para medir el consumo de oxígeno.

Justo antes de llevar a cabo el análisis del consumo de oxígeno, éstos fueron agrupados según la morfología en 7 categorías, para después averiguar posibles diferencias en el consumo según la variabilidad de la morfología ovocitaria, tal y como describo detalladamente:

#### **4.2.2 Evaluación morfológica ovocitaria**

Los fenotipos ovocitarios fueron agrupados en 7 categorías morfológicas basadas en categorías anteriormente descritas por Van Blerkom y Alikani (129)(130). Éstas se agrupaban en: ovocitos normales (N): con citoplasma homogéneo o ligeramente granuloso, con corpúsculo polar no fragmentado y de tamaño normal, y sin demasiado espacio perivitelino; ovocitos granulosos (GR): ovocitos con citoplasma de aspecto granuloso; ovocitos clúster (Clust): ovocitos con área central muy granulosa tipo clúster; ovocitos refráctiles (R/B): ovocitos con presencia de cuerpos necróticos o refráctiles; ovocitos con espacio perivitelino agrandado (LPS): ovocitos con gran espacio perivitelino entre la membrana y la zona pelúcida; ovocitos con corpúsculo polar fragmentado (CPf): Ovocitos con el corpúsculo polar no íntegro.

### **4.2.3 Medición del consumo de oxígeno ovocitario**

La medición del consumo de oxígeno de cada ovocito metafase II duró aproximadamente una hora, con una media de 2-3 mediciones/hora, llevándose a cabo las mediciones con intervalos consecutivos de 20 minutos para el mismo ovocito.

Tras finalizar la medición del consumo de oxígeno, los ovocitos fueron de nuevo sacados del ESC y se llevó a cabo la inseminación mediante la técnica ICSI descrita previamente, con semen de la pareja.

Todos los ovocitos cultivados en el ESC se mantuvieron separados para hacer el seguimiento y saber su destino final. Después de ser inseminados, fueron de nuevo colocados en el incubador convencional, para continuar su desarrollo embrionario hasta el momento de la transferencia embrionaria, al igual que el resto de pacientes.

Al igual que en el resto de pacientes, en esta primera fase, a las 16-19 horas post-ICSI se llevó a cabo la valoración de la fecundación de los ovocitos, y aquellos que habían sido fecundados correctamente se colocaron en placas con nuevas gotas de medio de cultivo nuevo de 50 µl de QACM, para continuar su desarrollo hasta el día de la transferencia embrionaria.

La morfología embrionaria fue evaluada en un microscopio invertido con placa calefactada de la casa comercial Olympus, en unos tiempos preestablecidos, que sabemos nos dan la máxima información posible acerca del buen desarrollo del embrión (42-44 horas post inseminación para valorar los embriones en día 2 de evaluación y 62-64 horas en día 3), teniendo en cuenta los parámetros morfológicos descritos anteriormente para la determinación de

la calidad embrionaria. La selección embrionaria se llevo a cabo en día 3, usando los criterios anteriormente citados (131, 132). A la hora de seleccionar los embriones no tuvimos en cuenta el consumo de oxígeno de los ovocitos, seleccionando los embriones considerando exclusivamente la morfología, independientemente de los niveles de O<sub>2</sub> consumido.

#### **4.2.4 Embriones transferidos**

El total de embriones transferidos en esta primera fase fue de 279, siempre transferidos en día 3 de evolución.

Para analizar la implantación embrionaria en función del consumo de oxígeno de los ovocitos que habían dado lugar a esos embriones, se analizaron un total de 54 de los 279 totales, que fue en los que sabíamos exactamente la implantación final: o bien 100% de implantación (cuando el número de sacos gestacionales coincidía con el número de embriones transferidos o bien, cuando no se había producido implantación, 0% implantación).

En la mayoría de las transferencias embrionarias se transfirieron 2 embriones, solo en casos de indicación ginecológica o por decisión propia se transfirió un único embrión. El valor de la $\beta$ -hCG fue determinado 13 días después de la transferencia embrionaria. El embarazo clínico fue confirmado cuando se visualizó saco gestacional con latido cardíaco a las 5-6 semanas después de la extracción de los ovocitos.

### **4.3 Embriones**

En esta segunda parte del estudio (fase II) se llevó a cabo un estudio retrospectivo observacional en un total de 575 ovocitos microinyectados en 56 ciclos de donación de ovocitos, con transferencia embrionaria siempre en d3 de evolución. Para cada embrión, el ESC proporcionó la media de consumo de oxígeno durante todo el desarrollo embrionario, con valores máximos y mínimos de consumo, realizándose mediciones de la tasa de consumo de oxígeno embrionario, y analizando este consumo desde el momento de la microinyección espermática hasta el momento de la transferencia de los embriones. Una vez realizada la microinyección espermática se colocaron los ovocitos inseminados en el incubador ESC, y se midió el consumo de oxígeno durante los tres días de desarrollo (entre 68-72 horas post-ICSI), momento en el cual se sacaron del incubador y se seleccionaron los embriones en base a los criterios morfológicos convencionales para llevar a cabo la transferencia de éstos. Posteriormente se correlacionó el consumo de oxígeno con estadio de desarrollo, evolución y calidad del embrión. También se analizó si existían diferencias en el consumo antes y después de la primera división embrionaria (citocinesis) y en función del ritmo de división celular.

Finalmente se correlacionó el consumo de oxígeno con la tasa de gestación e implantación de los embriones.

Se usó el mismo incubador (EmbryoScope™, Versión C, Unisense Fertilitech, Aarhus, Denmark: ESC), con el mismo tipo de microsensor). A diferencia de la fase I, en esta segunda fase el número de mediciones

analizado es mucho mayor, ya que se realizaron mediciones durante 3 días consecutivos sin interrupciones.

#### **4.3.1 Estimulación ovárica de las donantes**

La parte de la estimulación ovárica fue distinta; en la primera parte se usaron 3 protocolos de estimulación diferentes, mientras que en esta segunda se usó un único protocolo de estimulación estándar, ya que en esta parte del estudio se trataba de analizar el consumo de oxígeno embrionario, mientras que en la primera se trataba de averiguar si existía correlación alguna entre el tipo de protocolo de estimulación usado en las donantes y la tasa de consumo de oxígeno en los ovocitos. Para llevar a cabo la hiperestimulación ovárica controlada (COH) se usó un único protocolo mediante agonistas de la GnRH, siendo descrito anteriormente(126). Brevemente, las donantes comenzaron la administración de 0.1 mg de agonista (Procrin®; Abbott, Madrid, Spain) en la fase lútea del ciclo previo, hasta comprobar mediante ecografía transvaginal la quiescencia ovárica (inactividad). Tras esto, la dosis de agonista disminuyó a 0.05 mg hasta la administración de la hCG. La administración de gonadotrofinas comenzó con una dosis de 150 a 225 IU/día de FSH (Gonal-F®; Serono, Madrid, Spain; o Puregón®; Organón, Madrid, Spain) y/o gonadotrofina menopáusica humana (Menopur®; Ferring Pharmaceuticals, Madrid, Spain) entre 2-5 días del ciclo. La dosis administrada variaba dependiendo de la edad, índice de masa corporal, y respuesta previa en un ciclo anterior, ajustándose según el estradiol sérico obtenido.

La aspiración folicular de los óvulos de las donantes, la preparación endometrial de las receptoras de los óvulos, la técnica de decumulación de los ovocitos y la técnica de inseminación (microinyección) fue igual que en la primera fase.

Una vez obtenidos los ovocitos (a diferencia de la primera fase), la incubación de los éstos previa a la decumulación fue de 1 hora más en esta segunda fase (4 horas), ya que en la fase previa necesitábamos hacerlo a las 3 horas para medir el consumo durante 1 hora y así completar las 4 horas de incubación necesarias antes de ponerse a trabajar y decumular los ovocitos. Tras la decumulación se procedió a la microinyección de la misma forma que en la fase I. Después de microinyectar los ovocitos, éstos fueron lavados en medio QACM, y colocados en los pocillos de la placa del ESC.

Durante los 3 días de cultivo embrionario (72 horas aproximadamente) se llevaron a cabo mediciones del consumo de oxígeno de forma continua e individual para cada embrión, con el correspondiente recalibrado del microsensado antes de cada nueva medición. Al igual que en la primera fase del estudio, ésta se llevó a cabo en las 4 soluciones ya descritas en el apartado anterior.

La valoración de la fecundación de los ovocitos fue llevada a cabo a la misma hora que en la fase previa (entre las 16-19 horas post-inseminación), y teniendo en cuenta los mismos criterios a la hora de valorar una correcta fecundación. Pero, a diferencia de la anterior fase, en esta 2ª fase los cigotos fueron valorados dentro del ESC, observando las imágenes proporcionadas por el embrioscopio.

La morfología embrionaria también fue evaluada dentro del ESC, teniendo en cuenta las imágenes obtenidas mediante el sistema time-lapse. Al igual que en la primera parte del estudio se tuvo en cuenta todos los parámetros morfológicos para la determinación de la calidad embrionaria, tanto en día 2 como en día 3 de evolución. La selección embrionaria se llevo a cabo en día 3, teniendo en cuenta las características morfológicas observadas, y usando los mismos criterios. Tampoco tuvimos en cuenta el consumo de oxígeno a la hora de seleccionar los embriones.

#### **4.3.2 Medición del consumo de oxígeno embrionario**

Al igual que en la primera parte del estudio los análisis del consumo de oxígeno se realizaron con el mismo tipo de sensor, y en las mismas condiciones, generándose también un gradiente lineal desde la base del pocillo donde se encuentra el embrión hasta la superficie, llevándose a cabo las mediciones con los mismos intervalos. En este caso tanto el total de mediciones obtenidas, como la media de mediciones obtenida por embrión fue mucho mayor, debido a un periodo mucho más largo de cultivo embrionario. Durante el tiempo del cultivo embrionario (entre 68 y 72h), se llevaron a cabo un total de 85 mediciones para cada embrión (con 2-3 mediciones/hora de media), y con un total de 47.741 mediciones.

Del mismo modo que en la fase previa se usaron 2 pocillos como control negativo, donde los pocillos solo contenían medio de cultivo sin embriones.

#### **4.3.2.1 Consumo de oxígeno y estadio embrionario**

El primer paso fue averiguar el consumo de oxígeno en diferentes estadios embrionarios, y para ello se analizó el consumo de los embriones en diferentes intervalos de tiempo, llevándose a cabo el análisis en 4 cuartiles o rangos de tiempo (con un número de mediciones similar para cada periodo). La razón de dividir el consumo total embrionario en cuartiles es porque técnicamente el aparato no puede realizar el análisis del consumo de oxígeno y tomar la foto del embrión al mismo tiempo, por lo tanto, la única forma de realizar el análisis del consumo de oxígeno según el estadio del embrión, es haciéndolo en cuartiles, donde podemos averiguar el consumo según un rango determinado de tiempo, y consecuentemente un estadio diferente. El periodo total de medición de consumo embrionario abarcaba desde la fecundación de los ovocitos hasta el momento de la transferencia, quedando los 4 periodos de tiempo agrupados de la siguiente manera: **1)** desde el momento del ICSI hasta la formación del cigoto o aparición de los pronúcleos (<17.2 horas), **2)** desde la formación pronuclear hasta la primera división embrionaria (17.2-35.0 horas), **3)** desde el estadio de 2 células hasta el estadio de 5 células, incluyendo la 2ª 3ª y 4ª división embrionaria (35.1-52.0 horas), y **4)** desde el estadio de 5 células hasta el momento de la transferencia embrionaria en 6-8 células (52-72 h aproximadamente).

#### **4.3.2.2 Consumo de oxígeno y calidad embrionaria**

Mediante este análisis encuartiles también se analizó el consumo de oxígeno dependiendo del destino final del embrión: transferido (T), congelado (C) o no viable (NV), es decir, se comparó la tasa de consumo de oxígeno de los embriones en función de la calidad de éstos, considerándose de buena calidad aquellos embriones que habían evolucionado favorablemente (C o T), y de mala calidad aquellos con mala evolución, que acababan bloqueándose o degenerando (NV).

#### **4.3.2.3 Consumo de oxígeno y evolución embrionaria**

El siguiente paso fue averiguar el consumo de oxígeno según la evolución del embrión fuera favorable o no; agrupando los ovocitos microinyectados en cigotos incorrectamente fecundados o no fecundados (NF), fecundados correctamente pero cuyo desarrollo terminó en embriones bloqueados o degenerados, considerados NV, y embriones evolutivos que, o bien, fueron congelados (C) o bien transferidos (T).

#### **4.3.2.4 Consumo de oxígeno y citocinesis**

Posteriormente, se correlacionó el consumo de oxígeno embrionario con el momento exacto de la primera división embrionaria, analizando las tasas del consumo de oxígeno justo antes de la citocinesis (n=2204 mediciones), y una

vez producida la primera división (n=3815 mediciones). Esto se llevó a cabo primero para todos los embriones, posteriormente se comparó la media entre los embriones de mejor y peor calidad, y finalmente se comparó nuevamente los valores de media entre los que daban lugar a implantación y los que no.

#### **4.3.2.5 Consumo de oxígeno y rangos óptimos de división**

Como ya habíamos apuntado en el apartado de objetivos, en la literatura había sido descrito unos rangos óptimos de división asociados a una mayor implantación denominados parámetros morfocinéticos embrionarios, que comprendían divisiones celulares desde el estadio de 2 hasta 5 células: 2 células t2 (24.6-28.2horas post-ICSI), 3 células t3 (35.6-40.6horas), 4 células t4 (36.6-41.9horas) y 5 células t5 (49.5-56.7horas). Las tasas de consumo de oxígeno fueron analizadas en función de si los embriones cumplían o no las divisiones dentro de estos rangos, observando si se producían diferencias según alcanzaran el t2, t3, t4 o t5 fuera o dentro del rango. De esta forma se analizó la tasa de consumo de oxígeno dependiendo del momento exacto cuando se produjeron las diferentes divisiones celulares, es decir, según el ritmo de división embrionario.

#### **4.3.2.6 Consumo de oxígeno, embarazo e implantación embrionaria**

En la última parte del estudio, usando de nuevo el análisis en cuartiles, también se averiguaron los consumos de oxígeno en función del embarazo y de la implantación obtenida. Para correlacionar el análisis del consumo de

oxígeno con la gestación se comparó los niveles de consumo de oxígeno de aquellos embriones transferidos que dieron lugar a embarazo clínico (N=36 embriones) con aquellos que no (N=48 embriones). Posteriormente se analizaron las tasas de consumo de oxígeno en función de la implantación embrionaria, analizando 57 embriones de los 84 transferidos, en los que conocíamos con total seguridad el resultado de la implantación: o bien 100% de implantación (N=9 embriones) o bien, cuando no se había producido implantación (N=48 embriones). Para llevar a cabo este análisis no consideramos los casos donde 2 embriones fueron transferidos, y solo resultó implantación de uno de ellos (N=27). Como se ha comentado, en todos los casos se llevaron a cabo transferencias de 2 embriones (DET) excepto en un caso, en el cual, por decisión de la paciente, se transfirió un único embrión.

### **4.3.3 Transferencias embrionarias**

El total de embriones transferidos en esta primera fase fue de 84, también siempre transferidos en día 3 de evolución.

En el caso de tener embriones sobrantes, se congelaron mediante la técnica estándar de vitrificación del IVI (27) para un posible uso futuro.

#### *Análisis Estadístico*

Las medias de consumo de oxígeno por embrión y por periodo (cuartiles) siguieron una distribución normal. Al igual que en la primera fase del estudio las tasas de consumo fueron analizadas mediante test de Student o ANOVA, seguido de comparaciones múltiples post-hoc con la prueba de Bonferroni en

aquellos valores que resultaron significativamente diferentes. Mediante correlación de Pearson se analizó la asociación lineal entre el tiempo y el consumo de oxígeno, estableciéndose un índice y un p valor.

El embarazo clínico fue empleado como test predictivo del consumo de oxígeno con respecto a la implantación embrionaria. El análisis mediante la curva ROC (133) proporciona valores de entre 0.5-1 de área bajo la curva (AUC), pudiendo ser interpretados como un modelo de clasificación global. A la hora de tener en cuenta el valor predictivo del test, valores de 0.8 de AUC lo consideramos apropiado para la validación del test.

Los análisis estadísticos se realizaron con el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significancia estadística fue definida en  $p < 0,05$ .

Para poder llevar a cabo la inseminación de los ovocitos es necesario procesar paralelamente la muestra de semen, para seleccionar los mejores espermatozoides más aptos para la fecundación.

Una vez obtenida la muestra de semen mediante masturbación se deja licuar durante 30 minutos antes de su procesado, tal y como se describe a continuación:

#### **4.4 Recuperación espermática**

Mediante la recuperación espermática (ó capacitación), se elimina el plasma seminal del eyaculado y se seleccionan los espermatozoides con mejor movilidad. En este estudio hemos realizado la selección espermática mediante la técnica swim-up, una de las más usadas en los laboratorios de FIV.

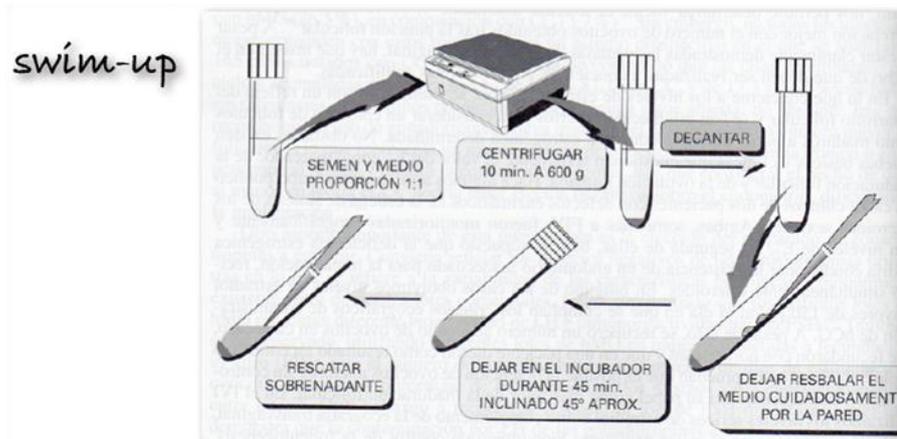
##### **4.4.1 Técnica de “SWIM-UP”**

Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los espermatozoides con movilidad progresiva de avanzar en un medio de cultivo adecuado, también denominado “capacitación espermática”.

Se coloca el eyaculado en un tubo Falcon® (Becton Dickinson, USA) de 13 ml y se añade medio HTF/HSA enriquecido con un 5% de proteína (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) en proporción 1:2 ó 1:3; se centrifuga 10 minutos a 600g y se decanta con cuidado. Una vez decantado, se le añade al pellet o sedimento entre 0,5-1 ml de medio, dejándolo resbalar cuidadosamente por las paredes.

Seguidamente se coloca el tubo en el incubador con 45° de inclinación durante 45 minutos a 37°C; allí los espermatozoides móviles migran desde el

pellet hacia el medio de cultivo. Por último, pasado ese tiempo, se aspira cuidadosamente el sobrenadante que contiene los espermatozoides móviles que han ascendido, tal y como muestra la Figura 14.



**Figura 14. Esquema del proceso de selección espermática mediante swim-up.** (dc231.4shared.com)

La muestra una vez capacitada está ya preparada para llevar a cabo la inseminación de los ovocitos obtenidos, manteniéndose en el incubador a 37°C y 5.5% de CO<sub>2</sub> hasta el momento justo de la inseminación.

## 5. RESULTADOS

## 5.1 Ovocitos:

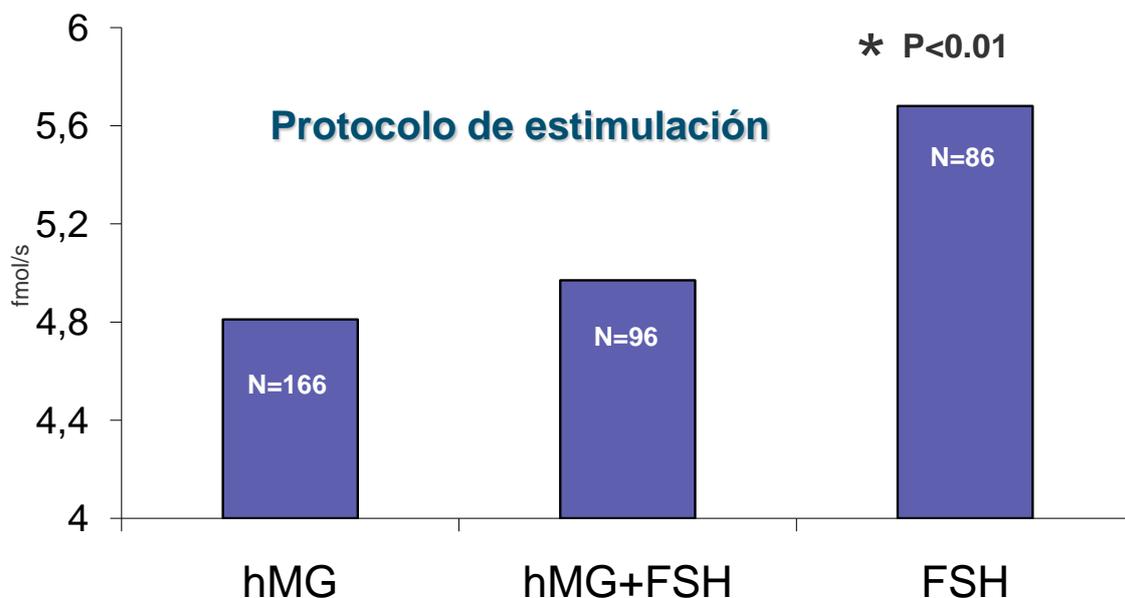
En la primera parte del estudio se incluyeron un total de 56 ciclos con 349 ovocitos analizados, llevándose a cabo un total de 1044 mediciones de la tasa del consumo de oxígeno. En esta población de estudio, la media de edad obtenida de las donantes de ovocitos fue de  $27.1 \pm 4.2$  años, con una media de dosis de gonadotrofinas administrada por ciclo de  $2307 \pm 582$  IU. La media de días de estimulación fue de  $10.6 \pm 1.3$  días (CI 95% 10.3-11.0) y la media de estradiol en el día de la administración de hCG fue  $2775 \pm 1128$  IU/ml (CI 95% 2445-3106). El número de ovocitos medio obtenido por paciente fue de  $13.4 \pm 8.8$ . La media de consumo de oxígeno para todos los ovocitos fue de  $5.41 \pm 1.234$  fmol/s (CI 95% 5.02-5.83). La tasa de fecundación obtenida tras ICSI fue de 84.5% (CI 95% 81.3-88.5). La tasa de embarazo clínico fue 51.8% (CI 95% 38.7-64.9), y respecto a la tasa de implantación para todos los embriones transferidos fue de 32.1 % (CI 95% 22.4-41.2). La tasa de aborto fue de 10.4% (CI 95% 0-21.5).

Respecto a la calidad embrionaria el 64.8% (CI 95% 51.7-78.0) de los embriones fueron clasificados como embriones de buena calidad en día 2 y el 57.4% (CI 95% 43.8-71.0) en día 3 de evolución.

### **5.1.1 Protocolos de estimulación ovárica y consumo de oxígeno ovocitario**

En el estudio inicial se usaron 3 tipos de protocolos de gonadotrofinas para las estimulaciones de las donantes, observándose diferencias

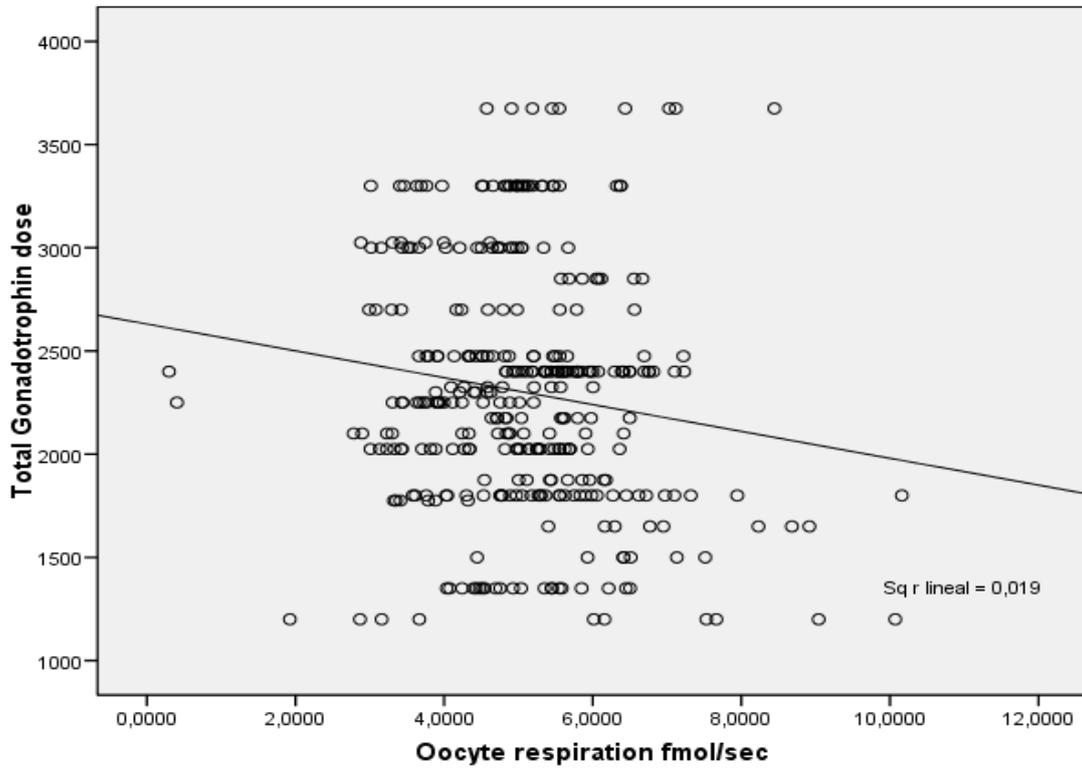
significativas en la media de consumo de oxígeno entre los grupos ( $p < 0.01$ ), con una media mayor de consumo de oxígeno cuando se usó sólo FSH (5.68 fmol/s), comparado con las estimulaciones a base de hMG (4.81fmol/s) o hMG+FSH (4.97fmol/s) (figura 15).



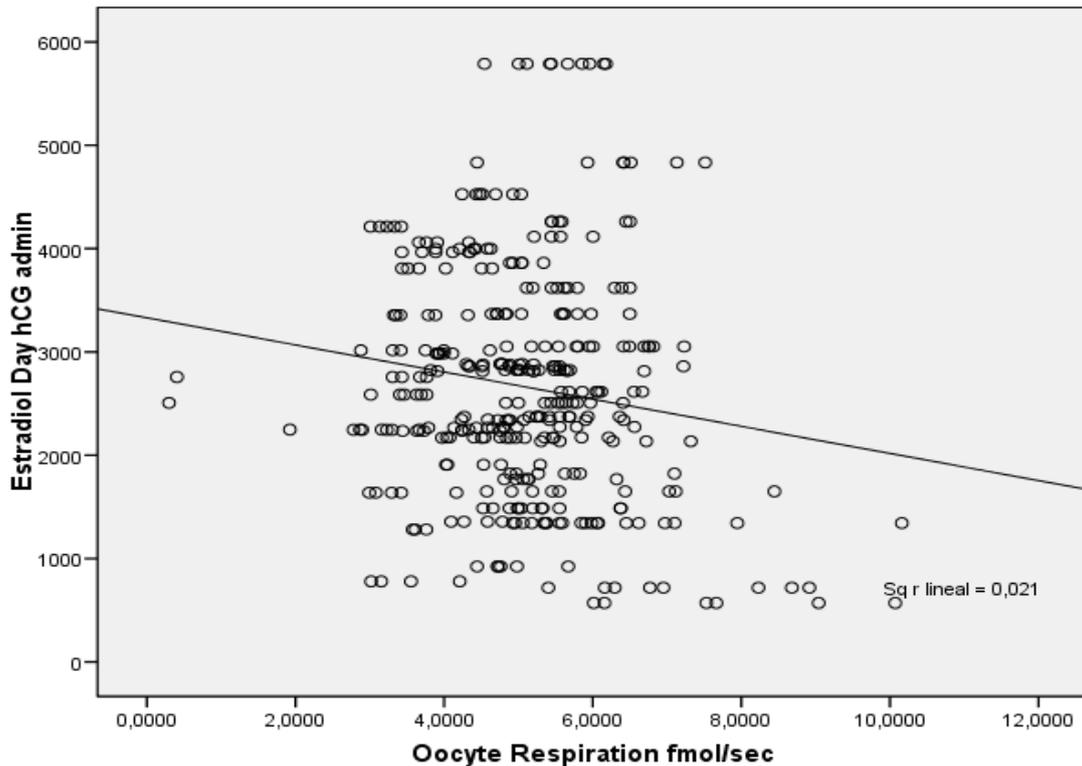
**Figura 15.** Valores de consumo medio de oxígeno ovocitario en función del protocolo de estimulación ovárica usado en las donantes de óvulos. Aquellas donantes estimuladas con FSH dieron lugar a ovocitos con mayor tasas de respiración comparados con aquellos ovocitos procedentes de donantes estimuladas con hMG o con hMG+FSH. (Tejera A et al. *FertilSteril* 2011 **96** 618-23)

Cuando se analizó la tasa de consumo de oxígeno en función de la dosis de gonadotrofinas administrada a las donantes de ovocitos, y de los niveles de estradiol pre- hCG para desencadenar la ovulación, se observó una correlación inversa entre la dosis administrada y los niveles de estradiol con respecto a la tasa de consumo de oxígeno, con menores niveles de consumo conforme era

mayor la dosis suministrada y mayor nivel de estradiol alcanzado, tal como muestran las figuras 16 y 17 respectivamente.



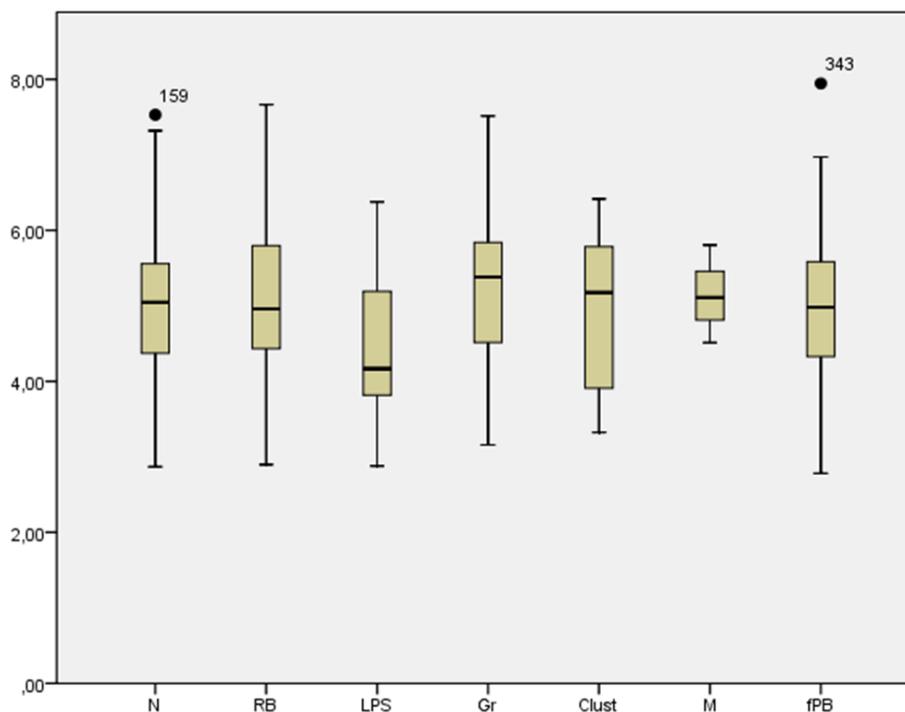
**Figura 16.** Valores de consumo de oxígeno ovocitario que disminuyen al aumentar la dosis de gonadotrofinas. (Tejera A et al. *FertilSteril* 2011 **96** 618-23)



**Figura 17.** Conforme mayores son los niveles de estradiol en sangre menores son los valores del consumo de oxígeno obtenido. (Tejera A et al. *FertilSteril* 2011 **96** 618-23)

### **5.1.2 Morfología ovocitaria y consumo de oxígeno**

Respecto a la morfología ovocitaria y el consumo de oxígeno, no encontramos un consumo diferente dependiendo de la morfología del ovocito, no viéndose afectado el consumo de oxígeno por los dimorfismos ovocitarios, resultando tasas similares de consumo de oxígeno entre los ovocitos con morfología normal, y los ovocitos con fenotipos como clúster, espacio perivitelino agrandado, cuerpos refráctiles o necróticos, granuloso, o con corpúsculo polar fragmentado (Figura 18).

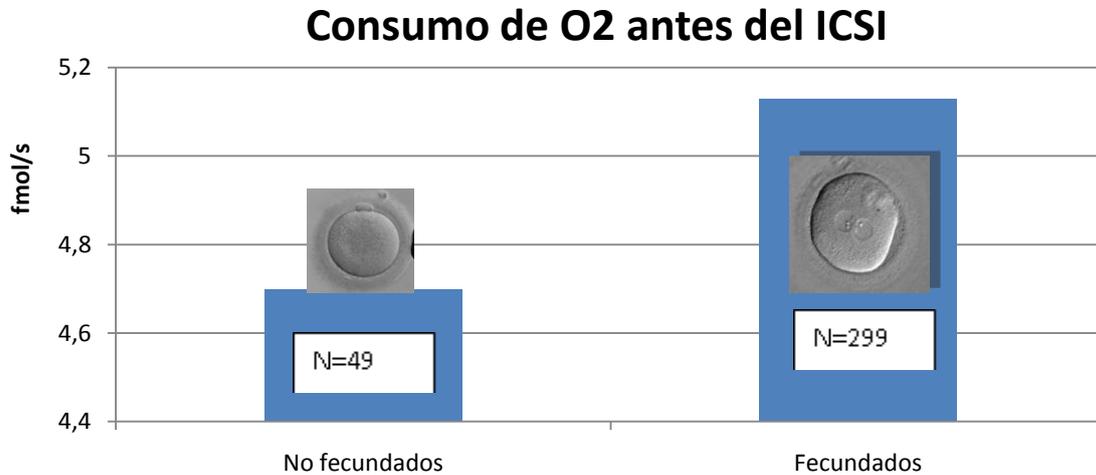


**Figura 18.** Valores de consumo medio de oxígeno en función de la morfología del ovocito. Aquellos ovocitos considerados como normales (N) presentaban valores similares comparados con aquellos ovocitos con presencia de alteraciones morfológicas evidentes como cuerpos refringentes (RB), con enorme espacio perivitelino (LPS), granulosa (Gr), con clúster (Clust), con múltiples dimorfismos (M) o con corpúsculo polar fragmentado (fPB). (Tejera A et al. *FertilSteril* 2011 96 618-23)

### 5.1.3 Fecundación y consumo de oxígeno ovocitario

Cuando medimos el consumo de oxígeno de los ovocitos antes de microinyectarlos y, posteriormente observamos la fecundación obtenida, encontramos diferencias significativas, con un mayor consumo (5.13 fmol/s) a favor de los que habían fecundado correctamente, por tanto, los que habían completado la segunda meiosis (zigotos), mientras que los no fecundados

tenían un menor consumo (4.7 fmol/s), con una odds ratio (OR)=1.34 (CI 95% 1,04-1,73) (p=0.014) (Figure 19).

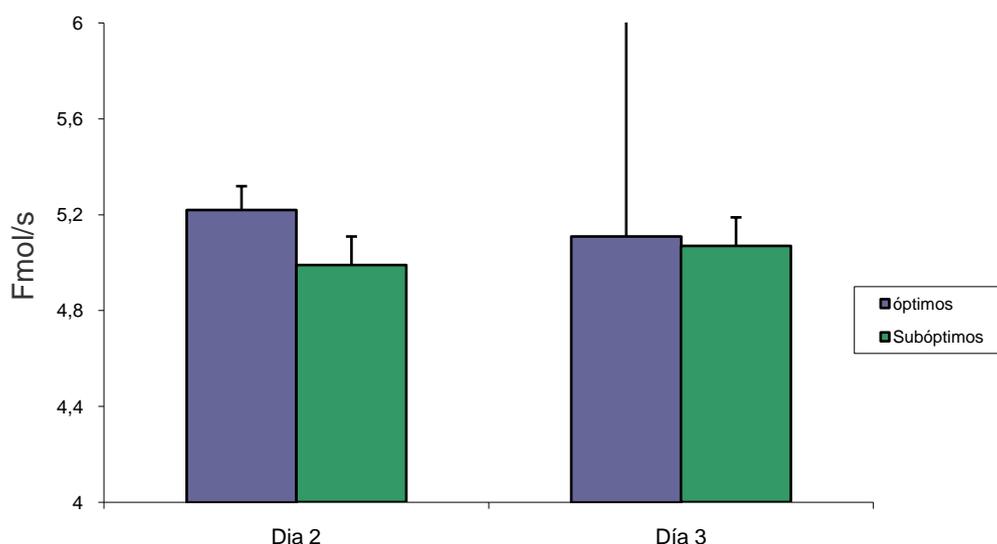


**Figura 19. Valores de consumo medio de oxígeno en función de la fecundación del ovocito. Aquellos ovocitos que presentaban una correcta fecundación (con presencia de 2 corpúsculos polares y 2 pronúcleos), y por tanto, con la culminación de la segunda meiosis, tenían una mayor tasa de consumo de oxígeno que aquellos ovocitos que no presentaban una correcta fecundación. (Tejera A et al. FertilSteril 2011 96 618-23)**

El consumo de oxígeno fue aproximadamente de un 10% más para aquellos ovocitos inseminados que dieron lugar zigotos fecundados correctamente (presencia de 2 corpúsculos y 2 pronúcleos), comparados con los que habían fallado en la fecundación tras la inseminación.

### 5.1.4 Embriones y consumo de oxígeno ovocitario

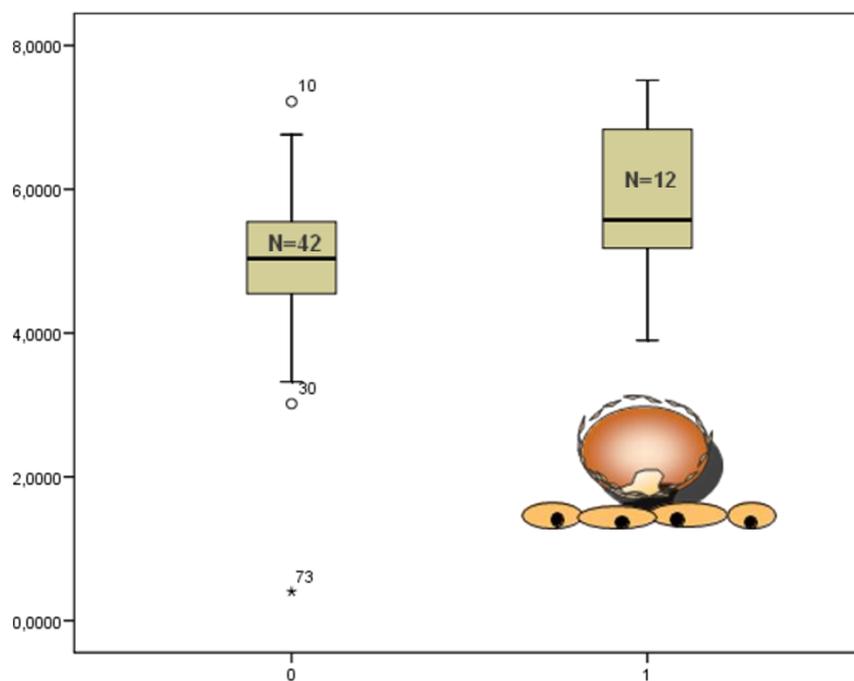
No encontramos diferencias significativas en el consumo de oxígeno de los ovocitos que dieron lugar a embriones de mejor o peor calidad, tanto en día 2 como en día 3 de evolución, aunque aquellos ovocitos que dieron lugar a embriones de calidad óptima presentaron una ligera mayor tasa de consumo de oxígeno en ambos días (5.22fmol/s en d2 y 5.11 fmol/s en d3), comparado con los de peor calidad (4.99 y 5.07 fmol/s, respectivamente) (figura 20).



**Figura 20.** Valores de consumo medio de oxígeno ovocitario en función de la calidad de los embriones generados a partir de estos ovocitos. Los ovocitos que dieron lugar a embriones de mejor calidad (tanto en día 2 como día 3 de evolución), presentaron un ligero incremento en las tasas de consumo, pero sin diferencias significativas. (Tejera A et al. *FertilSteril* 2011 **96** 618-23)

### 5.1.5 Implantación y consumo de oxígeno ovocitario

A la hora de valorar la implantación de los embriones procedentes de los ovocitos analizados para el consumo de oxígeno, como ya se comentó, se tuvo en cuenta los embriones cuya implantación era conocida (100% ó 0% implantación). De los 279 embriones transferidos se analizaron un total de 54 (n=12 con 100% implantación y n=42 con 0% implantación). La media resultante de consumo de oxígeno ovocitario fue significativamente mayor ( $p < 0.030$ ) para aquellos ovocitos que desarrollaron embriones que implantaron, comparados con la media de ovocitos que dieron lugar a embriones que no implantaron (figura 21).



**Figura 21.** Valores de consumo de oxígeno ovocitario en función de la implantación de los embriones generados a partir de estos ovocitos. Aquellos ovocitos que dieron

**lugar a embriones que implantaban tenían mayor consumo que aquellos que daban lugar a embriones que no implantaron.** (Tejera A et al. *FertilSteril* 2011;96:618-23)

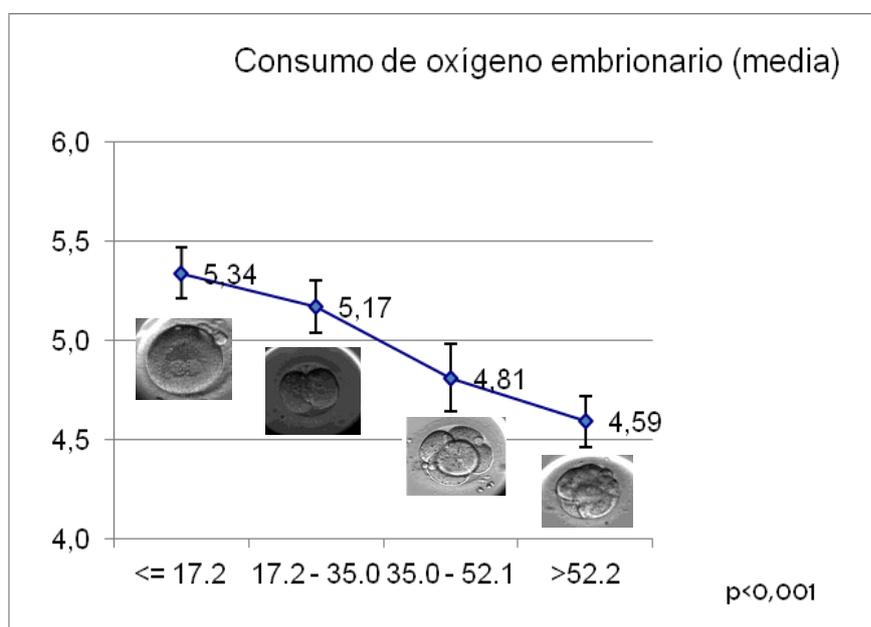
## 5.2 Embriones:

En la segunda fase del estudio, la media de edad de la población de donantes de ovocitos fue de  $25.8 \pm 2.9$  años, con una media de dosis de gonadotrofinas administrada de  $2,640 \pm 302$  IU por ciclo. La media de días de estimulación fue de  $10.5 \pm 1.1$  días, y la media del estradiol en el día de la hCG fue de  $2,750 \pm 880$  IU/ml. La media del número de ovocitos obtenidos por donante fue de  $15.2 \pm 7.0$ . Tras el ICSI, de los 575 ovocitos microinyectados 414 (72%) fecundaron correctamente (95% CI 68–80.0%). De los 84 embriones transferidos 23 de ellos (27,3%) implantaron (95% CI 20.1– 37.5%), resultando en una tasa de gestación clínica del 49.1% (n=28; 95% CI 36.1% 62.1%), y una tasa de aborto del 7.0% (n=4; 95% CI 0–13.6%).

Como ya se anotó anteriormente, los valores de consumo de oxígeno embrionario fueron tomados desde el momento de la inseminación (ICSI) hasta el momento de la transferencia embrionaria (entre 68–72 horas después del ICSI), generándose un total de 47.741 mediciones. De los 575 ovocitos microinyectados, 161 fecundaron o bien de forma incorrecta (zigotos aneuploides) o bien no fecundaron (NF), de los 414 fecundados correctamente (2CP 2 pronúcleos), 213 fueron embriones bloqueados, de mala calidad o degenerados, considerados no viables, y 201 embriones evolutivos que, o bien, fueron congelados, (n=117), o bien fueron transferidos (n=84).

### 5.2.1 Consumo de oxígeno y estadio embrionario

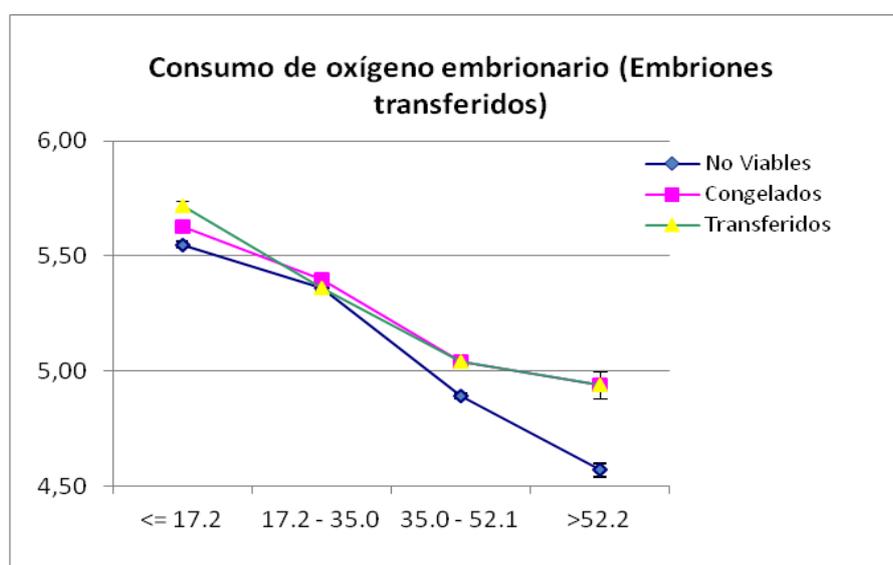
El primer paso en el análisis, consistió en observar posibles diferencias en el consumo de oxígeno en función del estadio del embrión, para ello se llevó a cabo el análisis en diferentes periodos de tiempo (el tiempo de estudio se dividió en cuartiles), de esta forma, la media obtenida para cada cuartil reflejaba el consumo en diferentes momentos evolutivos del embrión, y por tanto, correspondía con diferentes fases del desarrollo embrionario. Los valores obtenidos para cada cuartil de forma consecutiva fueron: 5.34 fmol/s (CI 95% 5.31–5.36) para el estadio de cigoto, 5.17 fmol/s (CI 95% 5.15–5.20) para el segundo periodo (correspondiendo con embriones de 2 células), 4.81 fmol/s (CI 95% 4.78– 4.84) para el tercer periodo , correspondiendo con embriones de entre 3-5 células, y 4.59 fmol/s (CI 95% 4.56–4.62) para el último periodo, siendo embriones de entre 6-8 células;  $P < .0001$ ), con una correlación lineal negativa significativamente entre el desarrollo embrionario y el consumo de oxígeno( índice de correlación de Pearson= $- 0.188$ ), tal y como muestra la figura 22:



**Figura 22. Consumo de oxígeno embrionario tiempo-dependientes, con las medias para cada uno de los 4 periodos de tiempo analizados. (Tejera A et al. FertilSteril 2012 98 849-57)**

### 5.2.2 Consumo de oxígeno y calidad embrionaria

Otro dato interesante que quisimos analizar mediante los intervalos o rangos de tiempo (cuartiles) fue el análisis del consumo de oxígeno en función del destino final del embrión, es decir, de forma indirecta este análisis nos mostraba si la respiración embrionaria dependía de la calidad embrionaria. Los resultados mostraron un consumo de oxígeno muy parecido durante las primeras horas de desarrollo (estadios más tempranos) para las 3 categorías (T, C y NV), pero a medida que fueron evolucionando los embriones (a partir de las 52.1 horas post-ICSI), se observaron diferencias en el consumo de oxígeno de manera significativa entre los embriones de mejor calidad (4.96 fmol/s para los transferidos T y 4.94 fmol/s para los congelados C) y los de peor (4.57 mol/s para los no viables NV), tal y como muestra la figura 23.



**Figura 23. Consumo de oxígeno embrionario tiempo-dependiente. Medias del consumo en cada uno de los 4 periodos de tiempo dependiendo de la viabilidad embrionaria, con significancia (\*) ( $p < 0.001$ ) en el último periodo de tiempo entre los embriones de buena calidad (congelados/transferidos) y los de mala calidad (no viables).** (Tejera A et al. *FertilSteril* 2012 **98** 849-57)

### 5.2.3 Consumo de oxígeno y evolución embrionaria

De forma general, respecto a la tasa media, valores mínimos y máximos de consumo de oxígeno en función de la evolución de los embriones resultantes, encontramos diferencias significativas para las 4 categorías establecidas previamente (NF, NV, C, y T), tal y como muestra la tabla I.

Parámetro	NF (n=161)		NV (n=213)		C (n=117)		T (n=84)		p-valor
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	
<b>Media</b>	3.62	2.31	5.03	0.77	5.21	0.81	5.32	1.02	0.004
<b>Mínimo</b>	2.59	2.21	3.51	1.57	4.02	1.41	4.08	1.66	>0.001
<b>Máximo</b>	5.20	3.14	6.80	1.93	6.63	1.39	6.79	1.50	>0.001

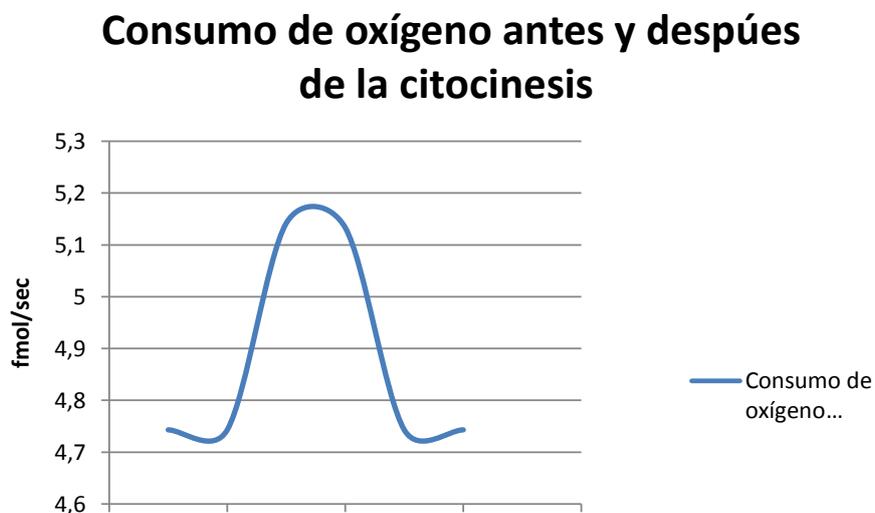
**Tabla I. Valores del consumo de oxígeno (mínimo, medio y máximo) para las 4 categorías establecidas tras ser inseminados los ovocitos (con 161 anormalmente fecundados (aneuploides) o no fecundados (NF), 213 fecundados correctamente originando embriones no viables (NV), 201 fecundados correctamente dando lugar a 117 embriones congelados (C) y 84 embriones transferidos (T).** (Tejera A et al. *FertilSteril* 2012 **98** 849-57)

### 5.2.4 Consumo de oxígeno y citocinesis

Otro análisis llevado a cabo fue el consumo de oxígeno en 2 momentos del desarrollo embrionario que consideramos clave; en el momento justo de la

división embrionaria (citocinesis), que denominamos periodo activo, y una vez producida la división embrionaria (interfase), o periodo inactivo. Esto fue estudiado inicialmente en todos los embriones, luego se comparó el consumo entre los embriones transferidos y los descartados (no viables), y finalmente, de aquellos embriones transferidos en los que hubo implantación y los que no.

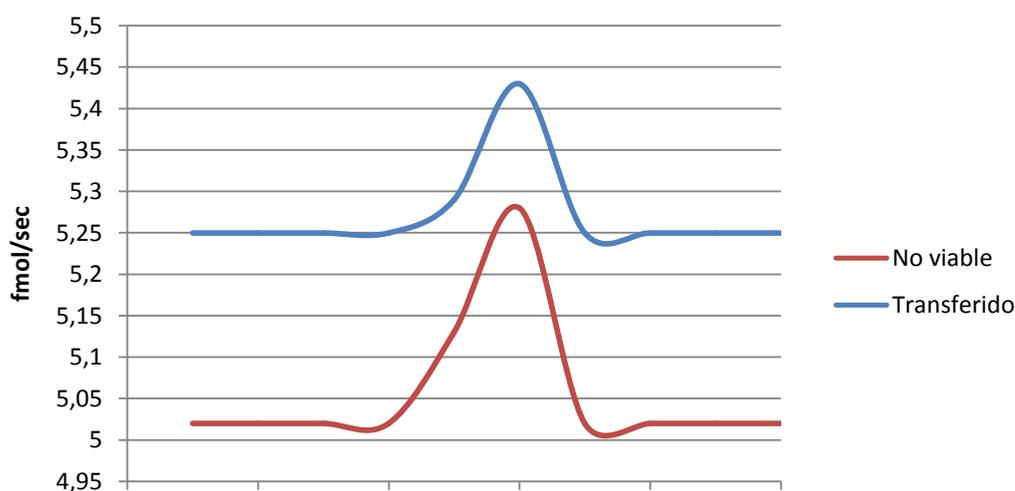
Para un total de 3815 mediciones obtenidas durante la citocinesis y 2204 mediciones tras la división, los resultados obtenidos mostraron un mayor nivel de consumo de oxígeno justo cuando se producía la división embrionaria: 5.14 fmol/s (CI 95% 4.72-4.76) durante la fase activa, mientras que durante la interfase el valor disminuía de forma significativa a 4.74 fmol/s (CI 95% 4.72-4.76), como se observa en la figura 24.



**Figura 24. Medias del consumo de oxígeno embrionario justo antes de la primera división embrionaria (fase activa), y posteriormente una vez producida la división, en la fase interfase o inactiva, para todos los embriones. Obsérvese el pico formado como resultado del incremento en la demanda de oxígeno en el momento de la citocinesis.**

Cuando analizamos el consumo de oxígeno antes y después de la citocinesis en aquellos embriones transferidos (de buena calidad), y lo comparamos con aquellos embriones no viables (de mala calidad), observamos un mayor consumo de oxígeno en ambas fases en los embriones de mejor calidad; 5.43 fmol/s en la fase activa (CI 95% 5.33-5.52) y 5.25 fmol/s (CI 95% 5.23-5.28) en la interfase para los embriones óptimos, y 5.28 fmol/s (CI 95% 5.21-5.35) y 5.09 fmol/s (CI 95% 5.01-5.05) respectivamente, para los subóptimos, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) (figura 25)

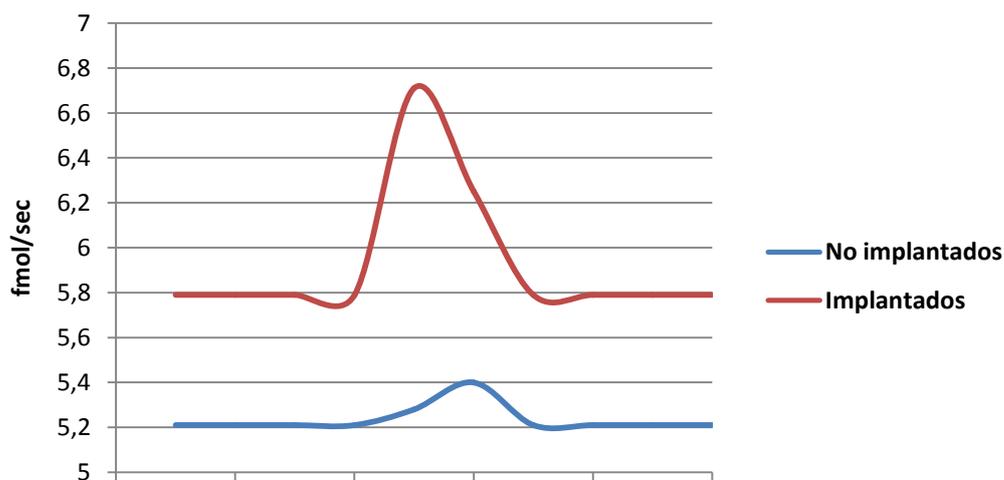
### Consumo de oxígeno antes y después de la citocinesis según calidad



**Figura 25. Medias del consumo de oxígeno embrionario justo antes de la primera división embrionaria (fase activa), y posteriormente una vez producida la división (fase interfase o inactiva), comparando los valores entre los embriones transferidos (de buena calidad) y los embriones no desarrollados o no viables (de mala calidad). Obsérvese que en ambos casos existen picos de consumo de oxígeno, aunque en el caso de los embriones no viables (franja roja) los valores son siempre inferiores a los valores de los embriones de buena calidad (franja azul).**

Si nos fijamos solo en la implantación de los embriones transferidos se repite el mismo patrón pero además con mayores diferencias en el consumo de oxígeno entre las fases activas e inactivas de cada tipo de embrión, además aquellos embriones implantados presentan un mayor consumo de oxígeno en ambas fases comparado con los no implantados: 6.71 (CI 95% 5.85-7.58) fmol/s durante el periodo de división y 5.79 (CI 95%5.66-5.91) durante la fase inactiva, para los implantados, y 5.28 (CI 95% 5.15-5.41) fmol/s y 5.21 (CI 95% 5.06-5.36) respectivamente, para los embriones no implantados (Figura 26).

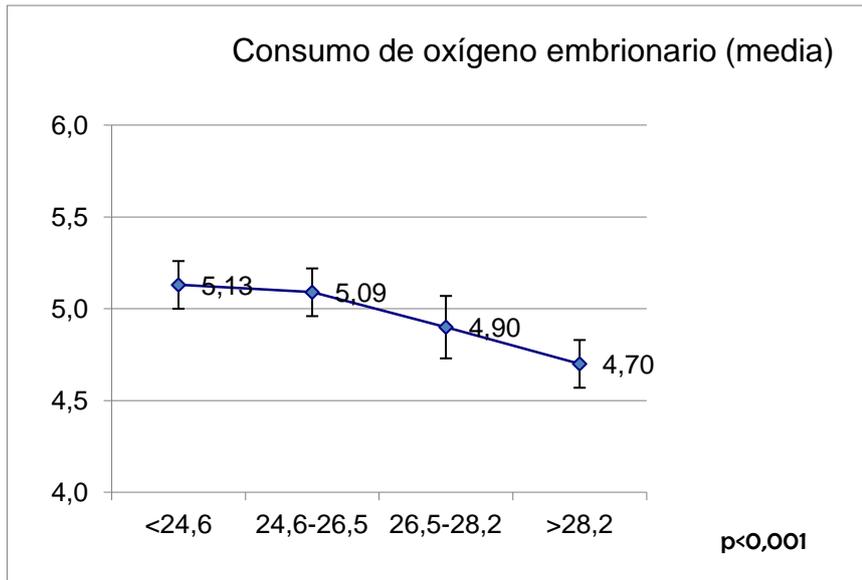
### Consumo de oxígeno antes y después de la citocinesis según implantación



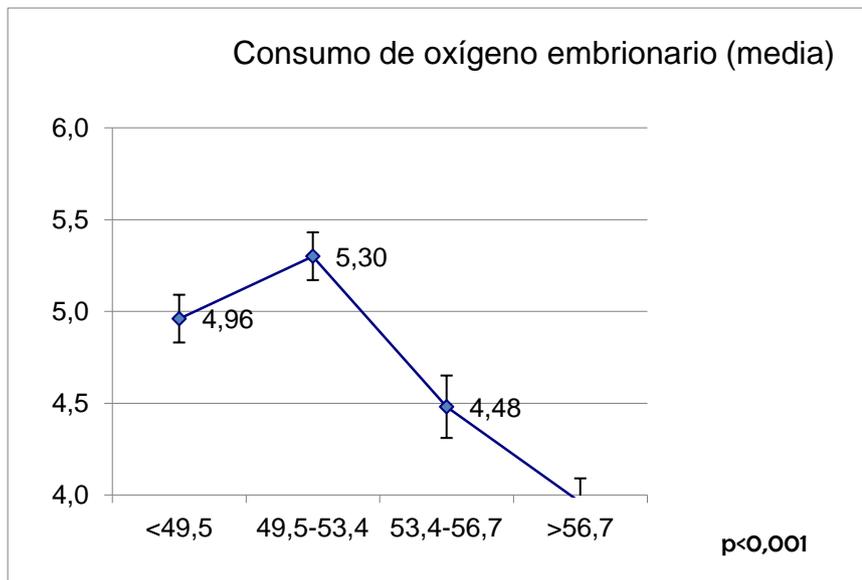
**Figura 26. Medias del consumo de oxígeno embrionario justo antes de la primera división embrionaria (fase activa), y posteriormente una vez producida la división, en la fase interfase o inactiva, para aquellos embriones implantados y para los no implantados. Obsérvese la diferencia de picos de consumo de oxígeno entre los embriones implantados (franja roja) y los que no logran implantar (franja azul), con prácticamente ausencia de pico para estos últimos.**

### **5.2.5 Consumo de oxígeno y rangos óptimos de división**

En esta parte final del estudio quisimos profundizar más acerca del consumo de oxígeno en función del momento exacto cuando se producían las divisiones embrionarias, comprobando las tasas de respiración en función de los rangos óptimos de división asociados a una mayor implantación (denominados parámetros morfocinéticos embrionarios), descritos en el artículo publicado por nuestro grupo en el 2011 anteriormente (134). Los rangos óptimos de tiempo relacionados con una mayor implantación venían definidos como t2 o momento en el cual el embrión tiene 2 células, con un rango óptimo de división de 24.6-28.2 horas post-ICSI; t3 o momento cuando el embrión tiene 3 células, con un rango óptimo de división de 35.6-40.6 horas post-ICSI y t5 o momento cuando el embrión tiene 5 células, con un rango óptimo de división de 49.5-56.7 horas post-ICSI. Según los resultados pudimos comprobar que los embriones que realizaban las divisiones cumpliendo los rangos óptimos de división para t2 y t5, tenían un mayor consumo de oxígeno que aquellos embriones que realizaban estas divisiones fuera de los rangos, de manera significativa para ambas variables estudiadas ( $p < 0.01$ ), como se puede apreciar en las figuras 27 y 28.



**Figura 27. Medias del consumo de oxígeno embrionario según realizan los embriones la división a 2 células (t2) en los distintos periodos de tiempo, con mayores consumos de oxígeno conforme alcanzan las 2 células más rápido y dentro de los rangos óptimos de división descritos (24.6-28.2).(ESHRE 2013 London).**



**Figura 28. Medias del consumo de oxígeno embrionario según realizan los embriones la división a 5 células (t5) en los distintos periodos de tiempo, con mayores consumos de oxígeno conforme alcanzan las 5 células más rápido y dentro de los rangos óptimos de división descritos (49.5-56.7) (ESHRE 2013 London).**

### 5.2.6 Consumo de oxígeno embrionario y velocidad de división

También quisimos comprobar la relación existente entre las tasas de consumo de oxígeno embrionaria y los parámetros morfocinéticos embrionarios, es decir, el consumo de oxígeno en función de la velocidad de división de los embriones. Tal y como refleja la tabla II, de las 47740 mediciones obtenidas, encontramos una correlación lineal inversa entre los niveles de las tasas de consumo de oxígeno y los parámetros morfocinéticos embrionarios, de modo que, cuanto mayor es el consumo de oxígeno, menor es el tiempo requerido para alcanzar las distintas divisiones embrionarias, es decir, los embriones que van más lentos y que no se dividen dentro del rango óptimo, tienen una tasa de consumo menor comparado con aquellos embriones que tienen una mayor velocidad de división y si que cumplen los rangos óptimos de división.

Correlación de Pearson	Tasas	tPNA	tPND	t2	t3	t4	t5	t6
Tasas de Respiración	1	-0.123	-0.101	-0.118	-0.038	-0.060	-0.166	-0.171
Sig(bilateral)		0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000
Población	47740	9481	1840	7427	3498	4606	3219	1590

**Tabla II: Relación lineal inversa existente entre las tasas de consumo de oxígeno y los parámetros morfocinéticoembrionarios. tPNA= tiempo de la aparición pronuclear; tPND= tiempo de la desaparición pronuclear.**

### 5.2.7 Consumo de oxígeno embrionario, tasas de embarazo e implantación

Cuando analizamos de forma global los consumos de oxígeno en los 84 embriones transferidos en función de la tasa de embarazo, encontramos un mayor consumo en aquellos embriones que generaron embarazo, comparado con los que no, tal y como muestra la tabla (tabla III):

Parámetro	No embarazo (n=36)			Embarazo (n=48)			p-valor
	Media	Desviación estándar		Media	Desviación estándar		
	[fmol/se]	[fmol/sec]		[fmol/se]	[fmol/sec]		
<b>Media</b>	5.11	0.61		5.54	1.27		0.049
<b>Mínimo</b>	3.94	1.34		4.21	1.94		0.481
<b>Máximo</b>	6.51	1.14		7.08	1.76		0.084

**Tabla III. Valores de consumo de oxígeno para los embriones transferidos, con valores medios, máximos y mínimos en los embriones que dieron lugar a gestación y en los que no.** (Tejera A et al. *FertilSteril* 2012 **98** 849-57)

El mismo patrón fue observado para la implantación, con mayores consumos de oxígeno en aquellos embriones que implantaron, mientras que aquellos que no lograron implantar presentaban valores inferiores de media (tabla IV). De los 84 embriones transferidos en 48 casos no se produjo implantación (0%), en 27 casos se produjo implantación al 50%, y en 9 casos la implantación fue del 100%, realizándose el análisis en los casos con implantación segura (0% ó 100%).

Parámetros	Embriones no implantados (n=48)		Embriones implantados (n=9)		p-valor
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	
	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	[fmol/sec]	
<b>Media</b>	5.17	0.63	6.96	1.93	>0.001
<b>Mínimo</b>	4.11	0.96	4.67	1.33	0.393
<b>Máximo</b>	6.58	1.83	8.14	1.17	0.014

**Tabla IV. Valores de consumo de oxígeno para 57 de los 84 embriones transferidos, con valores medios, máximos y mínimos en los embriones que implantaron y en los que no.** (Tejera A et al. *FertilSteril* 2012 **98** 849-57)

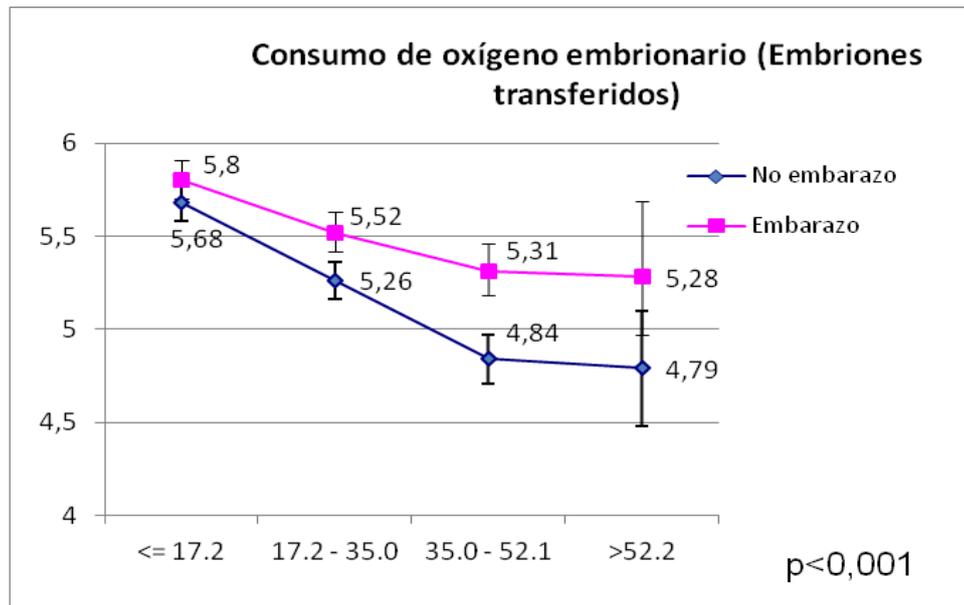
Usando la media de consumo de oxígeno embrionario para la determinación de la tasa de implantación, la media del área bajo la curva (AUC) fue de 0.692 (95% CI 0.556–0.808), con un valor de punto de corte de >5.89 fmol/s (sensibilidad del 55.6%, especificidad del 87.5%).

### **5.2.8 Consumo de oxígeno en cuartiles, tasas de gestación e implantación**

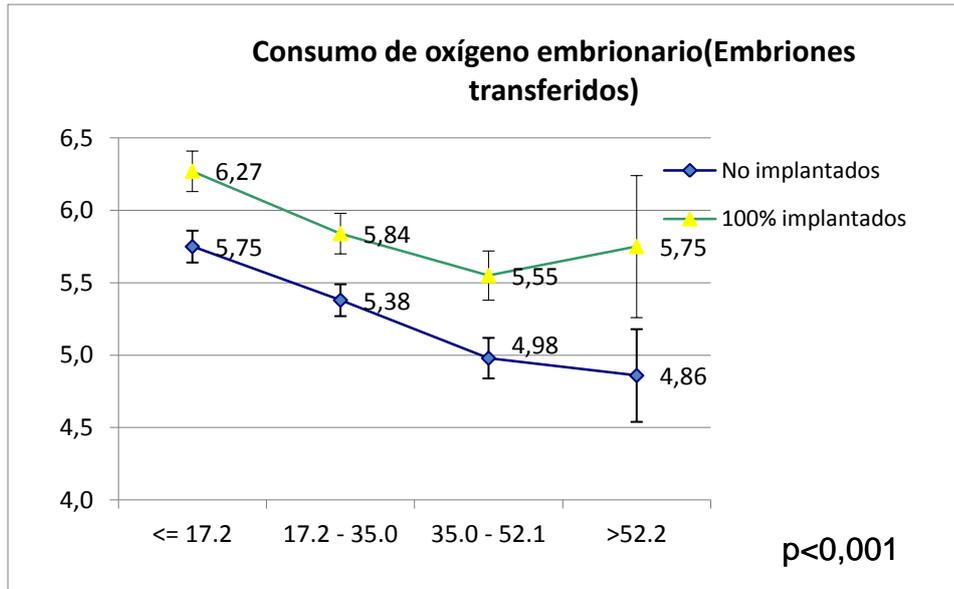
También nos pareció interesante analizar el consumo de oxígeno en diferentes periodos de tiempo (cuartiles), observando si existían variaciones en el consumo de oxígeno para los diferentes estadíos embrionarios, según si los embriones implantaron, y por tanto, dieron lugar a embarazo o no.

Los valores del consumo de oxígeno para los distintos estadíos embrionarios fueron siempre superiores para aquellas pacientes que dieron

lugar a embarazo y en aquellos embriones implantados, con diferencias significativas para ambos casos ( $p < 0.05$ ), observándose mayores diferencias en el consumo a partir del último cuartil ( $> 52$  horas post-ICSI), tal y como muestran las figuras 29 y 30:



**Figura 29. Consumo de oxígeno embrionario tiempo-dependientes para aquellos embriones transferidos. Medias en cada uno de los 4 periodos de tiempo analizados para los embriones que dieron lugar a embarazo y los que no, con significancia (\*) ( $p < 0.001$ ) en los 4 rangos de tiempo. (Tejera A et al. FertilSteril 2012 98 849-57)**



**Figura 30. Consumo de oxígeno embrionario tiempo-dependiente. Medias del consumo para los embriones transferidos en cada uno de los 4 periodos de tiempo dependiendo de la implantación, con significancia (\*) ( $p < 0.001$ ) en los 4 rangos de tiempo entre los embriones implantados y los que no. (Tejera A et al. FertilSteril 2012 98 849-57)**

## 6. DISCUSIÓN

## **Ovocitos**

Numerosos trabajos proponen la actividad metabólica como un nuevo parámetro a tener en cuenta para la selección de embriones (58, 60, 103, 110). En la literatura encontramos también artículos que demuestran que el consumo de oxígeno es el mejor indicador de la actividad metabólica. Aunque existe un trabajo publicado que se realizó en embriones humanos donde se comparó el consumo de oxígeno entre embriones congelados y frescos (89), ninguno de ellos ha sido realizado en embriones que finalmente fueron transferidos, siendo éste el primer trabajo en ovocitos y embriones humanos de uso clínico en tratamientos de reproducción asistida. Por tanto, en cuanto a los resultados generales de los experimentos, podemos comentar:

### ***Protocolos de estimulación ovárica y consumo de oxígeno ovocitario***

Según el protocolo de estimulación usado hemos observado un consumo de oxígeno ovocitario distinto, pudiendo afirmar que, los distintos protocolos de estimulación ovárica tienen un efecto en las tasas de consumo de oxígeno. El protocolo de estimulación ovárica más adecuado para la inducción de la maduración folicular en los ciclos de fecundación in vitro (IVF) no está del todo claro, existiendo cierta controversia en la literatura acerca del más efectivo (47, 48). Numerosos trabajos han demostrado que la respuesta folicular en estimulaciones de pacientes que recibieron HP-hMG era diferente de aquellas pacientes que recibieron rFSH (49), y en este trabajo se ha

evidenciado que la tasa de consumo de oxígeno está afectada por los protocolos de estimulación, siendo el ciclo con estimulación a base de rFSH el que daba lugar a ovocitos con mayor consumo de oxígeno. Esto, a su vez ha dado lugar a embriones con mayores probabilidades de implantación, por lo que el uso de este tipo de gonadotrofinas podría tenerse en cuenta.

Respecto a los niveles de estradiol y la dosis de gonadotrofina administrada, existen artículos previos donde se evidencia que estimulaciones con altos niveles de estradiol afectan a la calidad embrionaria, y por tanto, al resultado final del ciclo, con tasas de embarazo inferiores (135-139). Incluso se ha publicado trabajos donde se evidencia una mayor tasa de alteraciones cromosómicas de los ovocitos en estimulaciones con mayores niveles de estradiol y de gonadotrofinas, comparado con aquellas estimulaciones más suaves(140)(130). Un trabajo reciente correlaciona niveles de estradiol y dosis de gonadotrofinas, con cinética del desarrollo embrionario(141), demostrando que por encima de determinadas dosis de gonadotrofinas y de ciertos niveles de estradiol, los embriones no logran cumplir algunos de los rangos morfocinéticos óptimos de implantación descritos anteriormente (134).

Ya existen otros trabajos previos publicados (83), donde se usa el mismo tipo de técnica para medir el consumo de oxígeno, obteniéndose resultados que evidencian un consumo de oxígeno menor en ovocitos de pacientes con mayor edad y niveles altos de FSH basal, 2 factores claramente relacionados con la respuesta a la estimulación de las gonadotrofinas. Nosotros hemos corroborado los datos publicados por este grupo, de forma más directa y en ovocitos de uso clínico, ya que en este artículo publicado anteriormente no se compara las tasas de consumo de oxígeno y el resultado final del ciclo,

puesto que los ovocitos obtenidos no eran viables, y por tanto, no se transfirieron embriones a partir de estos ovocitos analizados.

También el grupo de Magnuson y cols trabajó en este campo, midiendo el consumo de oxígeno mediante otra técnica llamada micro-espectrofotometría. Los valores de consumo de oxígeno obtenidos fueron de  $0.532 \pm 0.079$  medidos en nl/h, lo cual es equivalente con los valores obtenidos por nuestro grupo de  $6.6 \pm 1.0$  en fmol/s. El problema de éste trabajo es que este grupo tuvo inconvenientes técnicos, como la exposición a una alta intensidad de luz (435 nm), tensión de oxígeno cercana al 0, y que los ovocitos fueron analizados en capilares de vidrio con oxihemoglobina. Como consecuencia ninguno de los embriones resultantes fueron transferidos (72).

### ***Morfología ovocitaria y consumo de oxígeno***

La morfología ovocitaria es bastante subjetiva de valorar, y lo demuestra el hecho de la gran controversia que encontramos en la literatura, donde existen muchos artículos que argumentan que los dimorfismos o alteraciones ovocitarios afectan claramente al desarrollo embrionario (97, 142) (95), mientras que existen otros publicados que no encuentran una calidad embrionaria comprometida procedente de ovocitos con numerosas alteraciones morfológicas (93, 143). Hasta ahora tampoco se había estudiado si puede variar el consumo de oxígeno ovocitario en función de la morfología de éste, y por tanto, verse afectado el consecuente desarrollo embrionario. En este trabajo se ha demostrado que el consumo de oxígeno no se ve afectado por los diferentes dimorfismos ovocitarios, ya que ovocitos con alteraciones

importantes como el área granulosa central (tipo clúster) o con cuerpos refringentes, no presentaban un consumo diferente comparado con aquellos ovocitos considerados morfológicamente normales. Por tanto, a partir de este estudio, podemos concluir que no existe un consumo de oxígeno ovocitario morfodependiente, con valores muy parecidos y sin diferencias significativas entre ovocitos normales y otros con alteraciones importantes.

### ***Fecundación y consumo de oxígeno ovocitario***

Respecto a la correlación entre la fecundación y el consumo de oxígeno, hemos observado que existe un mayor consumo en los ovocitos que dan lugar a cigotos correctamente fecundados comparado con aquellos que no culminan la segunda meiosis, y por tanto, no logran fecundar. Teniendo en cuenta que las muestras seminales de este estudio eran muestras de sémenes con buenos valores de recuento, morfología y motilidad, debemos pensar, que la causa de la no culminación de la segunda meiosis, es debido a una causa ovocitaria, y probablemente, a una carga mitocondrial defectuosa (104), ya que una de las organelas más abundantes en el citoplasma ovocitario es la mitocondria. Por tanto, de forma indirecta hablar de una alteración en la fecundación es hablar de una menor carga mitocondrial, ya que la mitocondria interviene de forma directa en la maduración ovocitaria, fecundación y desarrollo embrionario, tal y como ha sido publicado (144). La distribución anormal de carga mitocondrial afecta a la correcta maduración ovocitaria, y por tanto a la embriogénesis, fundamentalmente debido a unos niveles deficitarios de ATP (145). Por todo esto, podemos afirmar que durante el proceso de la fecundación se requiere

una gran cantidad de energía (ATP), generado por la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Cualquier alteración o pérdida de la actividad mitocondrial afectaría al correcto desarrollo embrionario, y en consecuencia, a las tasas de embarazo durante los tratamientos de fecundación in vitro (101). Así pues, el presente estudio muestra como el consumo de oxígeno está relacionado con la capacidad de fecundación, lo cual coincide con los datos publicados acerca de una mayor reserva de ATP en ovocitos maduros (65, 68, 146). Una menor producción de ATP correspondería con un menor consumo de oxígeno, dando lugar a una fecundación alterada, tal y como ha quedado demostrado. El grupo de Lopes y cols describió un mayor pico de consumo de oxígeno en el momento de la fecundación (82). Cuando hemos analizado las tasas de consumo de oxígeno justo en el momento de la fecundación (estado de cigoto), hemos observado un pico de mayor consumo de oxígeno en este momento, coincidiendo estos resultados con los hallados por el este grupo, pero en bovinos. La interpretación de estos resultados es la necesidad de un mayor aporte energético justo en el momento de la culminación de la segunda meiosis, datos que también coinciden con los trabajos de otros autores en invertebrados y ratones (66, 147) (148) (67) (65, 149). La explicación del aumento de la actividad mitocondrial estaría en la penetración espermática, provocando la estimulación mitocondrial, y el consecuente aumento de consumo de oxígeno.

Teniendo en cuenta que el desarrollo embrionario está relacionado directamente con la salud del ovocito (150), tras estos hallazgos, deberíamos plantearnos si el consumo de oxígeno podría ser considerado como un nuevo marcador de calidad.

### ***Embriones y consumo de oxígeno ovocitario***

A pesar de observar un ligero aumento del consumo de oxígeno en los ovocitos que dan lugar a embriones de mejor calidad, no encontramos diferencias significativas en el consumo de oxígeno de los ovocitos que dieron lugar a embriones de mejor o peor calidad, por lo que, una hipótesis respecto a estos resultados podría ser que sea demasiado pronto para observar diferencias en el metabolismo debido a la no activación del genoma embrionario, puede que estas diferencias existan pero más adelante, una vez se ha producido esta activación( en torno al día 3 de evolución embrionario, cuando el embrión tiene entre 6-8 células).

### ***Implantación y consumo de oxígeno ovocitario***

En cuanto a la implantación de los embriones resultantes de los ovocitos analizados, hemos observado que los embriones que más implantan proceden de ovocitos con un mayor consumo de oxígeno ( $p < 0.003$ ), de modo, que se confirma lo expuesto en el apartado anterior, la calidad embrionaria viene determinada por la salud ovocitaria, y cualquier alteración en la madurez y/o calidad del ovocito se verá reflejado en el desarrollo del embrión. Como ya se ha comentado anteriormente, las mitocondrias son las principales fuentes energéticas a través de la formación de ATP, y sabiendo que el desarrollo embrionario precisa de una gran cantidad de aporte de energía, la carga mitocondrial ovocitaria tiene una influencia directa y fuerte en el potencial de desarrollo del ovocito, y, por tanto, del embrión. Teniendo en cuenta que

actualmente no existe un método del todo efectivo y predictivo de selección ovocitaria basado en la morfología, este método podría servir para seleccionar ovocitos antes de la fecundación, sobre todo, en países con restricciones de legislación en reproducción asistida, donde solo unos pocos ovocitos pueden ser inseminados.

## **Embriones**

Al igual que en el apartado anterior los valores de consumo de oxígeno también pueden ser relacionados con los niveles de carga y actividad mitocondrial en el embrión (66), con el mismo tipo de repercusión en la viabilidad y desarrollo embrionario, así como en la tasa de gestación, cuando se ve alterada su funcionalidad (151)(67, 86) (68). Diferentes estudios en animales han mostrado distintos niveles de consumo de oxígeno entre los embriones más evolucionados (blastocistos), y los más tempranos (152-155). También se ha publicado en animales mamíferos no humanos que existe una correlación entre el número de células del embrión y el consumo de oxígeno, es decir, dentro de los estadios más iniciales, también existe un consumo de oxígeno que varía en función del estadio embrionario. Sin embargo, hasta la fecha, la posibilidad de que también en humanos exista un diferente consumo de oxígeno en los primeros estadios embrionarios no estaba demostrada ni del todo clara.

### **Consumo de oxígeno y estadio embrionario.**

El análisis realizado se llevó a cabo en diferentes periodos de tiempo (cuartiles), obteniendo valores de diferentes momentos evolutivos, y por tanto, en diferentes fases del desarrollo del embrión. El análisis obtenido muestra diferentes valores según el estadio embrionario, con una disminución progresiva a medida que se va desarrollando el embrión. Si tenemos en cuenta la “*quiet embryo hypothesis*”, de *Leese et al*, es lógico pensar en un menor consumo de oxígeno a medida que el embrión se desarrolla, ya que además de formar parte de un proceso de adaptación a las condiciones *in vitro* del laboratorio, según esta hipótesis, el embrión debe minimizar el consumo de oxígeno desde el estadio de cigoto hasta el de mórula para regular y limitar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así evitaremos el daño que producirían estas células a nivel celular y molecular durante esta etapa tan susceptible (107).

Estos resultados muestran, por un lado, que existe un consumo de oxígeno tiempo dependiente, de modo, que según en la fase en que se encuentre el embrión, tiene un consumo diferente, y por otro lado, que existe una disminución del consumo de oxígeno a medida que el embrión se va desarrollando, hasta día 3 de evolución (66 horas post inyección). En la literatura encontramos artículos donde se demuestra que existen 2 picos de mayor consumo de oxígeno, uno acentuado en el momento de la fecundación, y otro, menos acentuado, en la primera división embrionaria (82), y por otro lado, existen también antecedentes de un mayor consumo de oxígeno en estadio de blastocisto comparado con los estadios embrionarios iniciales (152-

155), debido a una alta demanda energética para llevar a cabo la blastulación o formación del blastocele (103). Pero en cualquier caso, hasta ahora no se había analizado el consumo de oxígeno embrionario humano durante los primeros estadios de desarrollo, y tampoco se había comparado este consumo de oxígeno entre las diferentes fases celulares (zigoto y embriones con diferente número de células), por lo que estos datos aportan nueva información en este campo del metabolismo embrionario.

Podemos afirmar que según el estadio embrionario existe un consumo de oxígeno diferente, que va disminuyendo a medida que va desarrollándose el embrión.

### ***Consumo de oxígeno y calidad embrionaria***

Cuando hemos analizado el consumo embrionario en función de la calidad del embrión, hemos observado que aquellos embriones con buena calidad presentan una media de consumo superior comparado con aquellos embriones de peor calidad. En este caso lo hemos hecho en cuartiles (4 fases), y hemos establecido 3 categorías: los embriones no viables (NV), los embriones transferidos (T), y los embriones congelados (C). El consumo de oxígeno para las 3 categorías es muy similar durante los primeros estadios (fases), pero, a medida que se va desarrollando el embrión, existen mayores diferencias en los consumos de oxígeno entre los embriones de mayor calidad (T ó C) y los de peor (NV), alcanzando diferencias a nivel significativo en la última fase (> 52.1 h post-ICSI). Estos datos refuerzan la hipótesis anterior, donde la variabilidad existente en la cohorte embrionaria de la misma paciente,

podría explicarse por defectos mitocondriales en el ovocito que afectan a la calidad de algunos embriones, y por tanto, viéndose afectado también su consumo de oxígeno. Esto explicaría el porqué dentro de una misma paciente podemos tener una cohorte embrionaria tan heterogénea, con embriones de muy buena calidad, y otros de muy baja calidad. Algunos trabajos han aportado también diferencias en el consumo de oxígeno en embriones de distinta evolución, aunque eran análisis realizados en embriones mucho más evolucionados (blastocistos), y estos análisis se realizaron fuera del incubador, con el consiguiente estrés celular embrionario, y por tanto, pudiéndose verse afectado su consumo(89). Todos estos datos confirman lo anteriormente expuesto, pudiendo considerar el consumo de oxígeno como una nueva herramienta de selección embrionaria, en concreto, esta selección debería hacerse teniendo en cuenta las mediciones del consumo de oxígeno cercanas al momento de la transferencia embrionaria(a partir de las 52.1 horas post-icsi), que es cuando mayores diferencias hemos observado, probablemente debido a la activación del genoma embrionario, marcando la capacidad de desarrollo del embrión, y por tanto, la capacidad de implantación.

### ***Consumo de oxígeno y evolución embrionaria.***

Cuando hemos analizado de forma global el consumo según la evolución categorizando los ovocitos inseminados en ovocitos no fecundados (NF), ovocitos fecundados correctamente pero que dan lugar a embriones no viables (NV), ovocitos correctamente fecundados que dan lugar a embriones viables transferidos (T), y ovocitos fecundados correctamente que dan lugar a

embriones viables que se congelan (C), analizando los valores de consumo de oxígeno mínimos, media, y máximos para las 4 categorías, hemos observado un mayor consumo de oxígeno para los embriones con mejor evolución, es decir, para aquellos embriones viables que se transfieren o congelan (de mejor calidad), comparado con los que no fecundan, o con los que fecundaron pero tuvieron una peor evolución embrionaria. Es lógico que, en los casos en los que no hubo fecundación, obtengamos valores inferiores, ya que no se culmina la segunda meiosis, y por tanto, no necesitamos un aporte extra energético, mientras que en los casos de fecundación dando lugar a embriones de calidad subóptima, probablemente estos embriones proceden de ovocitos que presentan deficiencias mitocondriales, reflejándose posteriormente en una mala calidad embrionaria asociado con un menor consumo de oxígeno. Estos datos confirman lo averiguado en el apartado anterior, donde se establece una relación directa entre calidad embrionaria y consumo de oxígeno.

En la literatura encontramos un trabajo donde también se evidencia un menor consumo de oxígeno embrionario en embriones de peor calidad, pero en este caso los embriones comparados eran blastocistos (105). Por tanto, podemos pensar que lo mismo que ocurre en este tipo de embriones evolucionados, también es válido para embriones en d3 de evolución, ya que embriones de mala calidad en d3 darán lugar bien a menor porcentaje de blastocistos o bien blastocistos de mala calidad (156).

### **Consumo de oxígeno embrionario y citocinesis**

Cuando se ha analizado el consumo de oxígeno justo antes de la citocinesis (fase activa), y justo después de la 1ª división (fase interfase inactiva) para todos los embriones, sólo para los embriones transferidos, y analizando de los embriones transferidos, los que implantan y los que no, hemos observado en los 3 casos un mayor consumo de oxígeno (pico) justo en el momento en que se produce la 1ª división embrionaria.

En cuanto a los resultados obtenidos para todos los embriones las diferencias existentes en el consumo de oxígeno entre la fase activa y la inactiva, mostraron diferencias significativas, con un consumo incrementado justo en el momento de la división embrionaria.

Lo mismo ocurre cuando analizamos el consumo de oxígeno antes y después de la citocinesis en aquellos embriones transferidos (mejor calidad), y lo comparamos con aquellos embriones descartados o no viables (de peor calidad), observando diferencias significativas al comparar el consumo de oxígeno entre estos 2 tipos de embriones, antes y después de la primera división. Si nos fijamos solo en la implantación de los embriones transferidos se repite el mismo patrón pero además con mayores diferencias en el consumo de oxígeno entre las fases activas e inactivas de cada tipo de embrión.

De estos resultados anteriores podemos confirmar la existencia de un pico de consumo de oxígeno justo en el momento de la primera división embrionaria, datos anteriormente confirmados por otros autores. En realidad el grupo de Lopes y cols describió 2 picos de consumo de oxígeno (uno mayor en

el momento de la fecundación, y otro más pequeño, justo en el momento de la primera división). Ya hemos explicado anteriormente el por qué de la existencia de este primer pico.

Respecto a la primera división, también este grupo ha publicado datos (96) acerca de un pequeño pico de consumo de oxígeno (incremento de entre 3–10%) justo en el momento de la división celular, y con una duración de aproximadamente 2 horas, aunque sin analizar la implantación resultante.

En nuestro caso nosotros analizamos el consumo de oxígeno antes y después de la primera división, observamos las mediciones en los diferentes cuartiles (fases) y comparamos el valor del primer cuartil (momento en el cual no se había producido la primera división), con el valor del tercer cuartil (ya se había producido), obteniendo una diferencia del 10% en el consumo de oxígeno entre estos cuartiles (5.34 fmol/s para el primero y 4.81 fmol/s para el segundo).

Los datos obtenidos por nuestro grupo coinciden con los datos encontrados por estos grupos anteriormente citados, y la causa de este incremento justo en el momento de la división celular se debe a la alta demanda energética necesaria justo en el momento del inicio del ciclo celular. Al igual que en el momento de la fecundación este incremento de actividad metabólica viene ocasionado por el incremento en la actividad mitocondrial. Como consecuencia la existencia de un mayor pico de consumo de oxígeno en la primera división marcará la evolución embrionaria, favoreciendo la implantación de los embriones.

### **Consumo de oxígeno embrionario y rangos óptimos de división**

Respecto al consumo de oxígeno dependiendo del momento en el que los embriones realizaban las divisiones, muestran como aquellos embriones que alcanzan el t2 (división a 2 células) y el t5 (división a 5 células) dentro de los rangos óptimos de implantación, tenían un mayor consumo de oxígeno que aquellos embriones que realizaban las divisiones fuera de estos rangos óptimos de división con mayor implantación. Cuando se ha comparado la media de consumo embrionario durante los 3 días de desarrollo embrionario (66 horas post-ICSI), entre los embriones que cumplían estos rangos óptimos de división, y los embriones que alcanzaban el t5 y t2 fuera de los rangos, se ha observado mayores medias de consumo embrionario con diferencias significativas a favor de los embriones dentro de los rangos. A la vista de los resultados podríamos decir que la mayor parte de embriones que no cumplen los rangos óptimos de división, es porque se dividen de forma más tardía (van más lentos), por lo tanto podemos concluir que aquellos embriones con un mayor consumo de oxígeno son aquellos embriones que tienen un desarrollo más rápido, y por tanto están dentro de estos rangos óptimos de división, o dicho de otra manera, que aquellos embriones que tienen menor consumo de oxígeno son aquellos que tienen un desarrollo más lento, y por tanto alcanzan las divisiones a 2 ó 5 células de forma más tardía. Por otro lado, Magnusson y cols sugirieron que aquellos embriones con un mayor consumo de oxígeno conseguían desarrollarse hasta el estadio de blastocisto más rápidamente que aquellos que tenían un menor consumo de oxígeno (72). Teniendo en cuenta que el estadio de blastocisto es justo el estadio previo a la implantación

embrionaria, y que los embriones que realizan la división a 2 y 5 células dentro de los rangos tiene más posibilidades de implantar (134), la interpretación a partir de estos resultados podría ser que, los embriones que cumplan los rangos óptimos de división tienen mayor consumo de oxígeno, ya que este tipo de embriones tiene más posibilidades de desarrollarse a blastocisto, y por tanto, de implantar.

Hasta ahora se había publicado datos acerca de la implantación embrionaria condicionada por el momento cuando se producían ciertas divisiones embrionarias (134), y por otro lado también se ha publicado artículos donde el consumo de oxígeno es mayor en embriones de mejor calidad, y se incrementa con la blastulación del embrión (estadios embrionarios avanzados) (79, 80). También se ha publicado que este consumo varía dependiendo de la evolución del embrión, con valores mayores conforme va evolucionando el embrión correctamente justo hasta estadios previos a la implantación (89). Pero hasta la fecha no se había estudiado ambas combinaciones, el consumo de oxígeno observando a su vez las divisiones del embrión, siendo estos últimos datos muy útiles por la posibilidad de usar ambas combinaciones para la mejora en la selección embrionaria.

### ***Consumo de oxígeno embrionario y velocidad de división***

Respecto al consumo de oxígeno según la velocidad de división, hemos encontrado un menor consumo de oxígeno en embriones más lentos, y por tanto, fuera de los rangos óptimos de división, confirmando la teoría planteada en apartados anteriores, donde embriones con un mayor consumo de oxígeno

tienen una mayor velocidad de división (dentro de los rangos), y por tanto, tienen más posibilidades de implantar. Como hemos comentado en el apartado anterior, estos resultados también coinciden con los resultados encontrados por el grupo de Magnuson et al (72), quienes observaron mayores consumos en los embriones que se desarrollaban más rápidamente y llegaban hasta blastocisto. Datos más recientes confirman la teoría de que embriones que están fuera de los rangos óptimos de división, y por tanto, tardan más tiempo en alcanzar los parámetros morfocinéticos descritos en el artículo del grupo de Meseguer (134), alcanzan en menor porcentaje el estadio de blastocisto (157)(158). El hecho de que los embriones más lentos se desarrollen en menor porcentaje hasta el estadio de blastocisto, y por otro lado, si los embriones que consumen más oxígeno alcanzan más rápidamente el estadio de blastocisto, de alguna manera, estos datos nos están diciendo que embriones que van más lentos consumen menos oxígeno, tienen menos opciones de desarrollarse y por tanto de implantar.

### ***Consumo de oxígeno embrionario y tasas de embarazo e implantación.***

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran como el consumo de oxígeno está relacionado con el desarrollo del embrión, lo cual tiene un efecto directo en la implantación embrionaria y en el resultado final de embarazo de la paciente. En el apartado anterior, se demostró que las tasas de consumo de oxígeno eran mayores en los ovocitos que daban lugar a embriones que implantaban, comparadas con aquellos ovocitos que daban lugar a embriones que no implantaban. Cuando hemos analizado el consumo de oxígeno

embrionario, también hemos observado un mayor consumo de oxígeno en embriones que dan lugar a embarazo y que implantan más. Otros grupos de trabajo han encontrado datos que difieren de los nuestros (105)(80), encontrando rangos de consumo de oxígeno intermedios donde se conseguían los mayores porcentajes de gestación (0.78-1.10 nl/h), pero la n estudiada era muy pequeña, y además los datos analizados eran en bovinos. Por tanto, podemos concluir, a partir de los resultados obtenidos, que el consumo de oxígeno embrionario varía en función de la implantación, siendo mayor en los embriones que dan lugar a embarazo y por tanto, que implantan, comparado con los que no.

### ***Consumo de oxígeno en cuartiles, tasas de gestación e implantación.***

Tal y como se ha demostrado anteriormente, los consumos de oxígeno varían según el estadio del embrión. Cuando hemos analizado estos consumos en las 4 fases distintas viendo la implantación y la gestación, hemos observado que el consumo de oxígeno es superior durante todas las fases embrionarias para aquellos embriones que logran implantar, y por tanto, dan lugar a gestación. Además a partir de la última fase o cuartil (>52 horas post ICSI), es decir, en estadios embrionarios más evolucionados (embriones con 6-8 células), las diferencias en el consumo de oxígeno entre embriones que generan embarazo e implantan, y los que no, son mayores. Si el consumo de oxígeno observado durante todo el desarrollo embrionario es mayor para aquellos embriones que implantan y dan lugar a embarazo, incrementándose las diferencias sobre todo en la última fase (cuando los embriones tienen un

mayor número de células), podríamos considerar estos datos como un nuevo posible factor de selección embrionaria basado en este incremento. Además recientes estudios relacionados con el time-lapse (134, 150) muestran que eventos, como el momento en que se produce la división a 5 células es un factor e indicador muy importante a tener en cuenta para la implantación embrionaria, por tanto, parece que la posible distinción entre embriones con posibilidad de implantar o no, podría ser mejorada mediante eventos de división celular que ocurren de forma más tardía detectada a través de time-lapse( en 5 células), o bien, mediante el análisis del consumo de oxígeno justo antes de realizar la transferencia embrionaria en día 3 de evolución( en torno a las 6 células) .

En líneas generales, este estudio ha mostrado como la medición del consumo de oxígeno de los ovocitos es un método seguro, rápido y simple, no viéndose afectado el subsecuente desarrollo embrionario.

Los resultados de este estudio también sugieren que la medición del consumo de oxígeno mediante microsensores sería útil para la cuantificación de la calidad embrionaria, y por tanto, podría ser usado como nuevo método de selección embrionaria basado en el consumo de oxígeno durante los 3 primeros días de desarrollo embrionario.

Los resultados encontrados muestran que el consumo de oxígeno podría ser usado como un nuevo parámetro o herramienta para la identificación de embriones con mayor potencial de desarrollo y de implantación, debiendo realizar el análisis del consumo justo inmediatamente antes de la transferencia embrionaria(a partir de las 52.2 horas post-ICSI).De esta manera podríamos

mejorar la selección embrionaria, aunque siempre en combinación con la evaluación morfológica convencional.

En resumen, este trabajo demuestra que las tasas de consumo de oxígeno analizadas durante los 3 primeros días de desarrollo se correlacionan de forma positiva con calidad e implantación embrionaria.

## 7. CONCLUSIONES

1) Las estimulaciones ováricas mediante gonadotrofinas del tipo FSHr da lugar a la obtención de ovocitos con un mayor consumo de oxígeno, comparadas con aquellas a base de hMG o combinaciones de ambas (hMG + FSH).

Asimismo, altas dosis de estradiol y de gonadotrofinas en el momento de la administración de la hCG (para desencadenar la ovulación), dan lugar a ovocitos con un menor consumo de oxígeno.

2) Los diferentes dimorfismos ovocitarios no afectan al consumo de oxígeno ovocitario, encontrando niveles similares según la morfología observada. Sin embargo hemos observado un mayor consumo de oxígeno en aquellos ovocitos que fecundan correctamente, así como en aquellos ovocitos que dan lugar a embriones que implantan.

3) De forma generalizada se concluye que:

a) Existe un mayor consumo de oxígeno en embriones que presentan una mejor evolución o desarrollo, comparado con aquellos que no evolucionan favorablemente.

b) Existe un mayor consumo de oxígeno en embriones que dan lugar a embarazo, y por tanto, que implantan.

4) De forma más específica se concluye que:

a) Hemos observado diferencias en el consumo de oxígeno según el estadio del embrión, por tanto, podemos hablar de la existencia de un consumo de oxígeno tiempo-dependiente, con una tendencia a la disminución de éste conforme se va desarrollando el embrión.

b) Las mayores diferencias observadas en el consumo de oxígeno entre aquellos embriones de mejor calidad, y por tanto, más posibilidad de implantar y los de peor, y por tanto, con menor opción de desarrollo y de implantar, las observamos en estadíos evolutivos embrionarios a partir de 5 células de desarrollo o a partir de 52.2 horas post ICSI.

c) Respecto a la citocinesis, hemos observado un mayor consumo de oxígeno durante la primera división embrionaria (fase activa), disminuyendo el consumo en el periodo de interfase (fase inactiva).

Este mayor consumo de oxígeno en la citocinesis se magnifica cuando los embriones implantan, de modo que, para aquellos embriones implantados se observa un pico de consumo de oxígeno en el momento de la división, prácticamente inexistente en cambio para aquellos embriones que no implantan.

d) Cuando nos fijamos en los rangos óptimos de división con mayor implantación, hemos observado un mayor consumo de oxígeno en aquellos embriones que realizan las divisiones dentro de los rangos, mientras que aquellos que se dividen más lentamente, no cumpliendo los rangos, presentan un menor consumo de oxígeno.

e) También hemos observado un mayor consumo de oxígeno cuanto mayor es el ritmo de división celular, mientras que aquellos de ritmo más lento cursan con un menor consumo.

## 8. Referencias Bibliográficas

## References

1. Leridon H. Studies of fertility and fecundity: comparative approaches from demography and epidemiology. *C R Biol* 2007;330:339-46.
2. Kuivasaari-Pirinen P, Raatikainen K, Hippelainen M, Heinonen S. Adverse Outcomes of IVF/ICSI Pregnancies Vary Depending on Aetiology of Infertility. *ISRN Obstet Gynecol* 2012;2012:451915.
3. Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB. The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol Hum Reprod* 2009;15:271-7.
4. Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, *et al*. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int J Fertil Womens Med* 2000;45:314-20.
5. Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, *et al*. Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum Reprod* 2005;20:138-46.
6. Roudebush WE. Role of platelet-activating factor in reproduction: sperm function. *Asian J Androl* 2001;3:81-5.
7. Khalil MR, Rasmussen PE, Erb K, Laursen SB, Rex S, Westergaard LG. Homologous intrauterine insemination. An evaluation of prognostic factors based on a review of 2473 cycles. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:74-81.
8. Michelmann HW. Minimal criteria of sperm quality for insemination and IVF therapy. *Int J Androl* 1995;18 Suppl 2:81-7.
9. Dinelli L, Courbiere B, Achard V, Jouve E, Deveze C, Gnisci A, *et al*. Prognosis factors of pregnancy after intrauterine insemination with the husband's sperm: conclusions of an analysis of 2,019 cycles. *Fertil Steril* 2014;101:994-1000.
10. Erdem A, Erdem M, Atmaca S, Korucuoglu U, Karabacak O. Factors affecting live birth rate in intrauterine insemination cycles with recombinant gonadotrophin stimulation. *Reprod Biomed Online* 2008;17:199-206.
11. Antman AM, Politch JA, Ginsburg ES. Conversion of high-response gonadotropin intrauterine insemination cycles to in vitro fertilization results in excellent ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* 2002;77:715-20.
12. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
13. Balmaceda JP, Schwarze JE. Further improvement in IVF outcome may need more than consistency in ovarian stimulation. *Reprod Biomed Online* 2006;13:156-7.
14. Macklon NS, Geraedts JP, Fauser BC. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. *Hum Reprod Update* 2002;8:333-43.
15. Evers JL. Female subfertility. *Lancet* 2002;360:151-9.
16. French DB, Sabanegh ES, Jr, Goldfarb J, Desai N. Does severe teratozoospermia affect blastocyst formation, live birth rate, and other clinical outcome parameters in ICSI cycles? *Fertil Steril* 2010;93:1097-103.
17. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 6:9-23.
18. Patrizio P, Sakkas D. From oocyte to baby: a clinical evaluation of the biological efficiency of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;91:1061-6.

19. Kovalevsky G, 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;84:325-30.
20. Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2005;17:283-8.
21. Pinborg A. IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum Reprod Update* 2005;11:575-93.
22. Lieberman B. An embryo too many? *Hum Reprod* 1998;13:2664-6.
23. Stromberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnstrom O, Koster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *Lancet* 2002;359:461-5.
24. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, *et al.* Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008;23:756-71.
25. Lambalk CB, van Hooff M. Natural versus induced twinning and pregnancy outcome: a Dutch nationwide survey of primiparous dizygotic twin deliveries. *Fertil Steril* 2001;75:731-6.
26. Reubinoff BE, Samueloff A, Ben-Haim M, Friedler S, Schenker JG, Lewin A. Is the obstetric outcome of in vitro fertilized singleton gestations different from natural ones? A controlled study. *Fertil Steril* 1997;67:1077-83.
27. Cobo A, Bellver J, Domingo J, Perez S, Crespo J, Pellicer A, *et al.* New options in assisted reproduction technology: the Cryotop method of oocyte vitrification. *Reprod Biomed Online* 2008;17:68-72.
28. Cobo A, de los Santos MJ, Castello D, Gamiz P, Campos P, Remohi J. Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril* 2012;98:1138,46.e1.
29. Hohmann FP, Macklon NS, Fauser BC. A randomized comparison of two ovarian stimulation protocols with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist cotreatment for in vitro fertilization commencing recombinant follicle-stimulating hormone on cycle day 2 or 5 with the standard long GnRH agonist protocol. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:166-73.
30. Melo M, Bellver J, Garrido N, Meseguer M, Pellicer A, Remohi J. A prospective, randomized, controlled trial comparing three different gonadotropin regimens in oocyte donors: ovarian response, in vitro fertilization outcome, and analysis of cost minimization. *Fertil Steril* 2010;94:958-64.
31. Veleva Z, Vilska S, Hyden-Granskog C, Tiitinen A, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer in women aged 36-39 years. *Hum Reprod* 2006;21:2098-102.
32. Levens ED, Whitcomb BW, Hennessy S, James AN, Yauger BJ, Larsen FW. Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2008;90:2138-43.
33. Cobo A, Meseguer M, Remohi J, Pellicer A. Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial. *Hum Reprod* 2010;25:2239-46.
34. Garrisi GJ, Chin AJ, Dolan PM, Nagler HM, Vasquez-Levin M, Navot D, *et al.* Analysis of factors contributing to success in a program of micromanipulation-assisted fertilization. *Fertil Steril* 1993;59:366-74.

35. Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online* 2010;20:510-5.
36. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril* 2009;92:157-62.
37. Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, *et al.* Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum Reprod* 2008;23:2818-25.
38. Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, *et al.* Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2009.
39. Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, *et al.* Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2008;23:2806-12.
40. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, *et al.* In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9-17.
41. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Bosch E, Mercader A, Vidal C, *et al.* Preimplantation genetic screening using fluorescence in situ hybridization in patients with repetitive implantation failure and advanced maternal age: two randomized trials. *Fertil Steril* 2013;99:1400-7.
42. Rubio C, Buendia P, Rodrigo L, Mercader A, Mateu E, Peinado V, *et al.* Prognostic factors for preimplantation genetic screening in repeated pregnancy loss. *Reprod Biomed Online* 2009;18:687-93.
43. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, *et al.* The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001;16:2357-61.
44. Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril* 1999;72:599-603.
45. Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, *et al.* Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod Biomed Online* 2003;7:336-41.
46. Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, *et al.* Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod* 2004;19:649-54.
47. Konc J, Kanyo K, Cseh S. Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with polscope. *J Assist Reprod Genet* 2004;21:349-53.
48. Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003;9:237-49.
49. Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simon C, Remohi J, *et al.* The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003;18:2413-9.

50. Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, *et al.* Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum Reprod* 1999;14:2588-95.
51. Kattera S, Chen C. Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 2004;19:294-9.
52. Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001;16:2177-81.
53. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum Reprod* 2000;15:2634-43.
54. Munne S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998;4:842-55.
55. Aguilar J, Motato Y, Escriba MJ, Ojeda M, Munoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. *Reprod Biomed Online* 2014;28:475-84.
56. Devreker F, Englert Y. In vitro development and metabolism of the human embryo up to the blastocyst stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;92:51-6.
57. Devreker F, Hardy K, Van den Bergh M, Vannin AS, Emiliani S, Englert Y. Amino acids promote human blastocyst development in vitro. *Hum Reprod* 2001;16:749-56.
58. Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, *et al.* Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod* 2002;17:999-1005.
59. Leese HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction* 2012;143:417-27.
60. Lane M, Gardner DK. Selection of viable mouse blastocysts prior to transfer using a metabolic criterion. *Hum Reprod* 1996;11:1975-8.
61. Dominguez F, Pellicer A, Simon C. The human embryo proteome. *Reprod Sci* 2009;16:188-90.
62. Overstrom EW, Benos DJ, Biggers JD. Synthesis of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase by the preimplantation rabbit blastocyst. *J Reprod Fertil* 1989;85:283-95.
63. Mtango NR, Harvey AJ, Latham KE, Brenner CA. Molecular control of mitochondrial function in developing rhesus monkey oocytes and preimplantation-stage embryos. *Reprod Fertil Dev* 2008;20:846-59.
64. Leese HJ. What does an embryo need? *Hum Fertil (Camb)* 2003;6:180-5.
65. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004;128:269-80.
66. Dumollard R, Duchen M, Carroll J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 2007;77:21-49.
67. Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G, Swann K, Duchen M, Carroll J. Sperm-triggered [Ca<sup>2+</sup>] oscillations and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* 2004;131:3057-67.
68. Van Blerkom J. Mitochondria in early mammalian development. *Semin Cell Dev Biol* 2009;20:354-64.

69. Trimarchi JR, Liu L, Smith PJ, Keefe DL. Noninvasive measurement of potassium efflux as an early indicator of cell death in mouse embryos. *Biol Reprod* 2000;63:851-7.
70. BOELL EJ, NICHOLAS JS. Respiratory metabolism of the mammalian egg. *J Exp Zool* 1948;109:267-81.
71. FRIDHANDLER L, HAFEZ ES, PINCUS G. Developmental changes in the respiratory activity of rabbit ova. *Exp Cell Res* 1957;13:132-9.
72. Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L, Nilsson L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum Reprod* 1986;1:183-4.
73. Nilsson BO, Magnusson C, Widehn S, Hillensjo T. Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocysts. *J Embryol Exp Morphol* 1982;71:75-82.
74. Benos DJ, Balaban RS. Energy requirements of the developing mammalian blastocyst for active ion transport. *Biol Reprod* 1980;23:941-7.
75. Manes C, Lai NC. Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J Reprod Fertil* 1995;104:69-75.
76. Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol Reprod Dev* 1996;44:476-85.
77. Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2000;62:1866-74.
78. Sturmey RG, Leese HJ. Energy metabolism in pig oocytes and early embryos. *Reproduction* 2003;126:197-204.
79. Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Lovendahl P, Greve T, Callesen H. Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum Reprod* 2007;22:558-66.
80. Lopes AS, Greve T, Callesen H. Quantification of embryo quality by respirometry. *Theriogenology* 2007;67:21-31.
81. Wilding M, Coppola G, Dale B, Di Matteo L. Mitochondria and human preimplantation embryo development. *Reproduction* 2009;137:619-24.
82. Lopes AS, Lane M, Thompson JG. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. *Hum Reprod* 2010.
83. Scott L, Berntsen J, Davies D, Gundersen J, Hill J, Ramsing N. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Human oocyte respiration-rate measurement--potential to improve oocyte and embryo selection? *Reprod Biomed Online* 2008;17:461-9.
84. Urner F, Sakkas D. Involvement of the pentose phosphate pathway and redox regulation in fertilization in the mouse. *Mol Reprod Dev* 2005;70:494-503.
85. Urner F, Sakkas D. Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction* 2003;125:17-26.
86. Dumollard R, Hammar K, Porterfield M, Smith PJ, Cibert C, Rouviere C, *et al.* Mitochondrial respiration and Ca<sup>2+</sup> waves are linked during fertilization and meiosis completion. *Development* 2003;130:683-92.
87. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Inner mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ), cytoplasmic ATP content and free Ca<sup>2+</sup> levels in metaphase II mouse oocytes. *Hum Reprod* 2003;18:2429-40.

88. Pantaleon M, Ryan JP, Gil M, Kaye PL. An unusual subcellular localization of GLUT1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod* 2001;64:1247-54.
89. Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ito-Sasaki T, Abe H, Morimoto Y. Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod* 2011;26:3366-71.
90. Baart EB, Macklon NS, Fauser BJ. Ovarian stimulation and embryo quality. *Reprod Biomed Online* 2009;18 Suppl 2:45-50.
91. Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, *et al.* Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2007;22:980-8.
92. Clement P. Consequences of stimulation on oocyte quality. *Gynecol Obstet Fertil* 2007;35:890-7.
93. Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:3431-3.
94. Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reprod Biomed Online* 2006;12:608-15.
95. Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* 2006;12:507-12.
96. Krisher RL. The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci* 2004;82 E-Suppl:E14-23.
97. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinis S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72:240-4.
98. Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997;12:1267-70.
99. Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. *Reprod Biomed Online* 2007;14:40-8.
100. Yakin K, Balaban B, Isiklar A, Urman B. Oocyte dysmorphism is not associated with aneuploidy in the developing embryo. *Fertil Steril* 2007;88:811-6.
101. Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001;16:909-17.
102. Bavister BD, Squirrell JM. Mitochondrial distribution and function in oocytes and early embryos. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 2:189-98.
103. Houghton FD, Leese HJ. Metabolism and developmental competence of the preimplantation embryo. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2004;115 Suppl 1:S92-6.
104. Reynier P, May-Panloup P, Chretien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, *et al.* Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 2001;7:425-9.
105. Lopes AS, Larsen LH, Ramsing N, Lovendahl P, Raty M, Peippo J, *et al.* Respiration rates of individual bovine in vitro-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensors system. *Reproduction* 2005;130:669-79.

106. Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Lovendahl P, *et al.* Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology* 2007;68:223-36.
107. Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol Hum Reprod* 2008;14:667-72.
108. Seli E, Vergouw CG, Morita H, Botros L, Roos P, Lambalk CB, *et al.* Noninvasive metabolomic profiling as an adjunct to morphology for noninvasive embryo assessment in women undergoing single embryo transfer. *Fertil Steril* 2010;94:535-42.
109. Botros L, Sakkas D, Seli E. Metabolomics and its application for non-invasive embryo assessment in IVF. *Mol Hum Reprod* 2008;14:679-90.
110. Hardarson T, Ahlstrom A, Rogberg L, Botros L, Hillensjo T, Westlander G, *et al.* Non-invasive metabolomic profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 2012;27:89-96.
111. Garrido N, Zuzuarregui JL, Meseguer M, Simon C, Remohi J, Pellicer A. Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates. *Hum Reprod* 2002;17:3142-8.
112. Garrido N, Meseguer M, Bellver J, Remohi J, Simon C, Pellicer A. Report of the results of a 2 year programme of sperm wash and ICSI treatment for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus serodiscordant couples. *Hum Reprod* 2004;19:2581-6.
113. Bellver J, Ayllon Y, Ferrando M, Melo M, Goyri E, Pellicer A, *et al.* Female obesity impairs in vitro fertilization outcome without affecting embryo quality. *Fertil Steril* 2010;93:447-54.
114. Vernaev V, Reis Soares S, Budak E, Bellver J, Remohi J, Pellicer A. Clinical factors associated with the outcome of oocyte donation. *Gynecol Obstet Fertil* 2007;35:1015-23.
115. Remohi J, Gartner B, Gallardo E, Yalil S, Simon C, Pellicer A. Pregnancy and birth rates after oocyte donation. *Fertil Steril* 1997;67:717-23.
116. Remohi J, Gutierrez A, Cano F, Ruiz A, Simon C, Pellicer A. Long oestradiol replacement in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 1995;10:1387-91.
117. Meseguer M, de los Santos MJ, Simon C, Pellicer A, Remohi J, Garrido N. Effect of sperm glutathione peroxidases 1 and 4 on embryo asymmetry and blastocyst quality in oocyte donation cycles. *Fertil Steril* 2006;86:1376-85.
118. Soares SR, Troncoso C, Bosch E, Serra V, Simon C, Remohi J, *et al.* Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4399-404.
119. Abdalla HI, Brooks AA, Johnson MR, Kirkland A, Thomas A, Studd JW. Endometrial thickness: a predictor of implantation in ovum recipients? *Hum Reprod* 1994;9:363-5.
120. Noyes N, Hampton BS, Berkeley A, Licciardi F, Grifo J, Krey L. Factors useful in predicting the success of oocyte donation: a 3-year retrospective analysis. *Fertil Steril* 2001;76:92-7.
121. Shapiro H, Cowell C, Casper RF. The use of vaginal ultrasound for monitoring endometrial preparation in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 1993;59:1055-8.

122. Borini A, Bianchi L, Violini F, Maccolini A, Cattoli M, Flamigni C. Oocyte donation program: pregnancy and implantation rates in women of different ages sharing oocytes from single donor. *Fertil Steril* 1996;65:94-7.
123. Escriba MJ, Bellver J, Bosch E, Sanchez M, Pellicer A, 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;86:92-7.
124. Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N, Meseguer M. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fertil Steril* 2011;96:618,623.e2.
125. Budak E, Garrido N, Soares SR, Melo MA, Meseguer M, Pellicer A, *et al.* 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;88:342-9.
126. Meseguer M, Garrido N, Remohi J, Pellicer A, Simon C, Martinez-Jabaloyas JM, *et al.* Testicular sperm extraction (TESE) and ICSI in patients with permanent azoospermia after chemotherapy. *Hum Reprod* 2003;18:1281-5.
127. Rubio C, Minguez Y, De Los Santos MJ, Ruiz A, Romero J. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Front Biosci* 1997;2:f1.
128. Melo MA, Meseguer M, Garrido N, Bosch E, Pellicer A, Remohi J. The significance of premature luteinization in an oocyte-donation programme. *Hum Reprod* 2006;21:1503-7.
129. Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote* 1995;3:283-8.
130. Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1992;7:379-90.
131. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, *et al.* Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 2006;85:371-83.
132. Meseguer M, Martinez-Conejero JA, O'Connor JE, Pellicer A, Remohi J, 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;89:1191-9.
133. Zweig MH, Campbell G. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993;39:561-77.
134. Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod* 2011;26:2658-71.
135. Valbuena D, Martin J, de Pablo JL, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Increasing levels of estradiol are deleterious to embryonic implantation because they directly affect the embryo. *Fertil Steril* 2001;76:962-8.
136. Mitwally MF, Bhakoo HS, Crickard K, Sullivan MW, Batt RE, Yeh J. Estradiol production during controlled ovarian hyperstimulation correlates with treatment outcome in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 2006;86:588-96.

137. Kosmas IP, Kolibianakis EM, Devroey P. Association of estradiol levels on the day of hCG administration and pregnancy achievement in IVF: a systematic review. *Hum Reprod* 2004;19:2446-53.
138. Lee FK, Lai TH, Lin TK, Horng SG, Chen SC. Relationship of progesterone/estradiol ratio on day of hCG administration and pregnancy outcomes in high responders undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2009;92:1284-9.
139. Arslan M, Bocca S, Arslan EO, Duran HE, Stadtmauer L, Oehninger S. Cumulative exposure to high estradiol levels during the follicular phase of IVF cycles negatively affects implantation. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:111-7.
140. Rubio C, Mercader A, Alama P, Lizan C, Rodrigo L, Labarta E, *et al.* Prospective cohort study in high responder oocyte donors using two hormonal stimulation protocols: impact on embryo aneuploidy and development. *Hum Reprod* 2010;25:2290-7.
141. Munoz M, Cruz M, Humaidan P, Garrido N, Perez-Cano I, Meseguer M. Dose of recombinant FSH and oestradiol concentration on day of HCG affect embryo development kinetics. *Reprod Biomed Online* 2012.
142. Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, *et al.* Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil Steril* 2008;90:1692-700.
143. De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1996;11:595-7.
144. Torner H, Brussow KP, Alm H, Ratky J, Pohland R, Tuchscherer A, *et al.* Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 2004;61:1675-89.
145. Nagai S, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Kasai T, Yokota S, *et al.* Oocyte mitochondria: strategies to improve embryogenesis. *Hum Cell* 2004;17:195-201.
146. Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995;10:415-24.
147. Dumollard R, Campbell K, Halet G, Carroll J, Swann K. Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes. *Dev Biol* 2008;316:431-40.
148. Van Blerkom J. Intrafollicular influences on human oocyte developmental competence: perfollicular vascularity, oocyte metabolism and mitochondrial function. *Hum Reprod* 2000;15 Suppl 2:173-88.
149. Van Blerkom J, Bell H, Weipz D. Cellular and developmental biological aspects of bovine meiotic maturation, fertilization, and preimplantation embryogenesis in vitro. *J Electron Microscop Tech* 1990;16:298-323.
150. Meseguer M, Santiso R, Garrido N, Garcia-Herrero S, Remohi J, Fernandez JL. Effect of sperm DNA fragmentation on pregnancy outcome depends on oocyte quality. *Fertil Steril* 2010.
151. Shoubridge EA, Wai T. Mitochondrial DNA and the mammalian oocyte. *Curr Top Dev Biol* 2007;77:87-111.
152. Thompson JG, Partridge RJ, Houghton FD, Cox CI, Leese HJ. Oxygen uptake and carbohydrate metabolism by in vitro derived bovine embryos. *J Reprod Fertil* 1996;106:299-306.

153. Harvey AJ. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci* 2007;98:113-28.
154. Harvey PM, Thompson MB. Energetics of emergence in the cicadas, *Cyclochila australasiae* and *Abricta curvicosta* (Homoptera: Cicadidae). *J Insect Physiol* 2006;52:905-9.
155. Agung B, Otoi T, Abe H, Hoshi H, Murakami M, Karja NW, *et al.* Relationship between oxygen consumption and sex of bovine in vitro fertilized embryos. *Reprod Domest Anim* 2005;40:51-6.
156. Boostanfar R, Jain JK, Slater CC, Tourgeman DE, Francis MM, Paulson RJ. The prognostic significance of day 3 embryo cleavage stage on subsequent blastocyst development in a sequential culture system. *J Assist Reprod Genet* 2001;18:548-50.
157. Cruz M, Garrido N, Herrero J, Perez-Cano I, Munoz M, Meseguer M. Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online* 2012.
158. Canto MD, Coticchio G, Renzini MM, Brambillasca F, De Ponti E, Fadini R. Time-lapse videomicroscopy as a tool to predict the development of human embryos to the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2011;96:S108-.