



Facultad de Ciencias de la Salud

Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e
Inmunología y Microbiología Médica

Estudio cinematográfico de parámetros morfológicos del pre-embrión humano

Tesis Doctoral

Raquel Herrer Saura

Directores de Tesis:

Dr. Juan Antonio García-Velasco.

Dr. Marcos Meseguer Escrivá

Madrid, 2015

Prof. Juan Antonio García-Velasco, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Cirugía, Psicología, Medicina Preventiva y Salud Pública e Inmunología Microbiología Médica, de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Rey Juan Carlos en Madrid, y Co-Director del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) en Madrid.....

CERTIFICA:

Dña. Raquel Herrero Saura, Licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección la memoria que presenta con el título "Estudio cinematográfico de parámetros morfológicos del pre-embrión humano", que reúne los requisitos para ser defendida ante el tribunal oportuno y poder optar al grado de Doctora en Ciencias de la Salud

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 25 de Octubre de 2015.



Fdo. Prof. Juan Antonio García-Velasco



Dr. Marcos Meseguer Escrivá, Doctor Europeo en Ciencias Biológicas, Máster en Métodos de Investigación y supervisor científico de Equipo IVI

CERTIFICA:

Dña. Raquel Herrer Saura, licenciada en Farmacia, ha realizado bajo mi dirección la memoria que presenta con el título "Estudio cinematográfico de parámetros morfológicos del pre-embrión humano", que reúne los requisitos para ser defendida ante el tribunal oportuno y poder optar al grado de Doctora en Ciencias de la Salud.

Y para que conste así a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 14 de Octubre de 2015.

Fdo. Dr. Marcos Meseguer Escrivá

A handwritten signature in blue ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom, positioned below the typed name.

Esto no hubiera sido posible si.....

El Dr. García-Velasco no hubiera dicho sí a la dirección de la tesis. Sé lo ocupado que estás, dentro y fuera del IVI, así que te agradezco de todo corazón la ayuda. El Dr. Meseguer no hubiera dicho sí a la dirección de la tesis. El tiempo es algo que tampoco te sobra, así que gracias por dedicarme todo el que he necesitado para la elaboración de este proyecto.

Mis compañeras de laboratorio no hubieran arrimado el hombro como una sola persona para aligerarme de cargas y que me pudiera dedicar en cuerpo y alma a la tesis. Gracias a Vanesa, por ayudarme con las figuras. A Belén, por los tratamientos estadísticos. A Beatriz por el apoyo incondicional, te echamos mucho de menos. Y a Pilar, por estar ahí siempre, por organizarme la pedazo de sorpresa de miles de fotos en mi despacho con toda la gente que quiero dándome ánimos. No lo olvidaré. Gracias.

Mis “Alegres Comadres de Windsor” Concha, Maza, Ana y Rosabel no me hubieran apoyado, como hacen siempre. Mil gracias por los ánimos, me siento afortunada de teneros. Gracias Concha porque siempre ves lo mejor de cada situación. Gracias Maza, porque tu humor negro es único. Gracias Ana, porque tu sinceridad se agradece en cada momento. Y Rosabel, gracias por simplificar la vida a lo que realmente es importante.

Mi “Tribu”, Gurrú, Avilés, Amparo, Menchu, Lisa, Diana, Pepa, Aguililla, Loles....tantos años también de compartir cosas, tantas risas cada vez que recordamos las viejas aventuras...y las nuevas....la nueva aventura, a Colorado Spring!.

Mi amiga Carmen y mi amigo Jose no hubieran estado ahí, animándome. Tu tesis es mi libro de cabecera, Carmenchu. No tengo palabras tampoco para describir los que suponéis para nosotros. Sois de esos amigos que estáis siempre. Qué suerte tuve al encontraros en el camino de la vida, aprendo de vosotros a diario. Prometo ocuparme de Candela mucho más a partir de ahora, siento no haber estado todo lo disponible que me gustaría. Candelita, prepárate que ahí va tu tía Rachel!

Mis suegros, Jaime y Mari, no me hubieran animado también. Jaime, te echamos de menos. Y mis cuñados y familias, lo celebraremos...

Nada hubiera sido posible si.....

Mis padres no se hubieran dedicado a darnos a mi hermano y a mí todas las oportunidades del mundo para crecer como personas. Ahora que tengo hijos, miro hacia atrás y me doy cuenta de los sacrificios que habéis hecho por nosotros, de la educación en el respeto que nos habéis transmitido y de la libertad que nos habéis dado al dejarnos tomar

nuestras propias decisiones; de estar ahí siempre, para felicitarnos por los aciertos y consolarnos por las equivocaciones. Y sobre todo, por el amor infinito que seguimos recibiendo.

Mi hermano Fernando (y único) y la estupenda familia que ha formado, no hubiera compartido conmigo los momentos importantes, os quiero un montón. Sé que siempre que te necesito estás, y aunque no te lo diga con frecuencia, te quiero mucho, brother.

Mi Ramiro no me hubiera dicho que sí, no sé cuántos años juntos llevamos ya....desde el principio tú eres la base sólida que me sujeta a la realidad, porque si fuera por mí estaría siempre en las nubes. Gracias por estar ahí de forma incondicional, por los 3 enanos estupendos que tenemos y por la vida, que poco a poco va pasando, con lo bueno y con lo malo, pero juntos.

Mis hijos, María, Claudia y Jacobo no me hubieran preguntado continuamente: “¿Cómo vas con tu libro, mami?” Lo único que siento de haber llevado a cabo este proyecto es el tiempo que os he robado a vosotros. Pero os compensaré, lo prometo. Empiezo por orden de aparición:

María, nada hubiera sido posible si no hubieras venido. Gracias por tu comprensión, aunque entiendo que a veces ha sido difícil.

Claudia, tú apareciste de repente, sin pensar. Sé que para ti ha sido duro también, y quiero agradecerte los cariños que me haces, que me ayudan un montón.

Jacobo, qué decir de ti....gracias por tus ocurrencias de niño de 5 años (casi 6, no te enfades).

Y gracias a todas las personas que de forma directa o indirecta han contribuido a que este trabajo vea la luz

ÍNDICE

Resumen.....I
Abreviaturas.....	.II
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	
1. INTRODUCCIÓN. Estado actual de la reproducción asistida en cuanto al número de embriones a transferir.....	1
1.1-MODIFICACIÓN DE LA LEGISLACIÓN VIGENTE.....	2
1.2- TRABAJO REALIZADO POR LA COMUNIDAD CIENTÍFICA Y CLINICA.....	4
1.2.1- Establecimiento de grupos de pacientes que se pueden beneficiar de eSET.....	5
1.2.1.1- Pacientes de ovocitos propios.....	5
1.2.1.2- Pacientes de donación de ovocitos.....	5
1.2.2- Tasa acumulada de gestación.....	6
1.2.3- Concienciación de los pacientes.....	7
1.3- SELECCION EMBRIONARIA. EL BLASTOCISTO.....	8
1.4- NUEVAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN EMBRIONARIA: TIME-LAPSE.....	11
1.4.1- Tecnología time-lapse.....	12
1.4.1.1- Ventajas del time-lapse.....	13
1.4.1.2- Limitaciones del time-lapse.....	13
1.4.2- Parámetros cinéticos tempranos de viabilidad embrionaria.....	14
1.4.2.1- De ovocito a cigoto.....	16
1.4.2.2- Primera división mitótica o división temprana.....	17

1.4.2.3- Estadios tempranos de division: d+2 y d+3.....	17
1.4.2.3.1- Tiempos de división.....	17
1.4.2.3.2- Intervalos de división y sincronía celular.....	20
1.4.3 Modelos predictivos de formación de blastocisto e implantación.....	21
1.4.4- Aneuploidías y análisis morfocinético.....	24
1.4.5- Time lapse y blastocisto.....	25
1.4.6- Parámetros cinéticos de no viabilidad embrionaria.....	26
1.4.7- Otras aplicaciones de time-lapse.....	26
1.5- NUEVOS ASPECTOS DE DESARROLLO: CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO.....	27
1.5.1- Formación del blastocisto.....	29
1.5.2- Eclosión o hatching.....	30
1.5.2.1- Acción enzimática.....	30
1.5.2.2- Acción mecánica. Ciclos de contracción y expansión.....	31
1.5.3- Mecanismos propuestos de contracción y expansión.....	32
1.5.4- Resumen.....	35
1.6- NUEVOS ASPECTOS DE DESARROLLO: VACUOLAS.....	36
1.6.1- Endocitosis mediada por receptor.....	37
1.6.1.1- Alteraciones en endocitosis.....	39
1.6.1.2- Endocitosis y reproducción.....	40
1.6.2- Fagocitosis y autofagia.....	41
1.6.2.1- Alteraciones en autofagia.....	45
1.6.2.2- Autofagia y reproducción.....	46
1.6.3- Vacuolas en reproducción.....	48
1.6.3.1- Vacuolas en espermatozoides.....	48

1.6.3.2- Vacuolas en ovocitos.....	48
1.6.3.2.1- Vitrificación de ovocitos.....	53
1.6.3.3- Vacuolas en embriones.....	54
1.6.3.3.1- Clasificación de ovocitos y embriones vacuolados en la práctica clínica.....	55
1.6.4- Resumen.....	57
2. HIPÓTESIS.....	5
	9
3. OBJETIVOS.....	61
 EXPERIMENTAL	
4. MATERIAL Y METODOS.....	62
4.1- Diseño experimental.....	62
4.1.1- Estimulación ovárica de pacientes y donantes de ovocitos.....	64
4.1.2- Preparación endometrial de pacientes y receptoras de ovocitos.....	64
4.1.3- Aspiración folicular e ICSI.....	64
4.1.4- Criopreservación de ovocitos.....	65
4.1.5- Preparación de las muestras seminales.....	65
4.1.6- Cultivo embrionario.....	65
4.1.7- Transferencia embrionaria y evaluación de gestación.....	66
4.1.8- Clasificación embrionaria mediante análisis de time-lapse.....	66
4.1.8.1- Parámetros morfológicos.....	66
4.1.8.2- Parámetros cinéticos.....	67
4.1.9- Selección de los embriones a transferir.....	68
4.1.10- Criterios de exclusión.....	68

4.2- Evaluación de la contracción de blastocisto.....	68
4.3- Evaluación de las vacuolas.....	70
4.4- SERIE 1: Contracción de blastocisto.....	72
4.5- SERIE 2: Validación de los datos de la Serie 1. Evaluación de vacuolas.....	72
4.5.1- Validación de datos de contracción de la serie 1.....	72
4.5.2- evaluación de vacuolas.....	73
4.6- Análisis estadístico.....	73
5- RESULTADOS.....	75
5.1- SERIE 1. Evaluación de la contracción de blastocisto.....	75
5.2- SERIE 2. Validación de la contracción del blastocisto.	
Evaluación de vacuolas.....	80
5.2.1- Validación de la contracción del blastocisto.....	80
5.2.2- Vacuolas.....	84
5.2.2.1- Distribución de la aparición de vacuolas.....	84
5.2.2.1.1- Primera aparición de vacuolas.....	84
5.2.2.1.2- Aparición de vacuolas sucesivas.....	86
5.2.2.2- Evaluación de calidad embrionaria.....	88
5.2.2.3- Resultados de gestación, implantación y RNV.....	89
5.2.2.4- Vacuolas en estadio de blastocisto.....	90
5.2.2.5- Embriones vacuolados entre 62-100 h.....	92
5.2.2.5.1- Tamaño de las vacuolas.....	92
5.2.2.5.1.1- Tasa de blastocisto general.....	92
5.2.2.5.1.2- Tasa de blastocisto de buena calidad.....	92
5.2.2.5.1.3- Tasa de implantación embriones KID.....	93
5.2.2.5.2- Número de células vacuoladas.....	93

6- DISCUSION.....	94
7- CONCLUSIONES.....	103
8- BIBLIOGRAFIA.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

➤ FIGURA 1. Marcadores tempranos de time-lapse utilizados para predecir resultados clínicos	15
➤ FIGURA 2. Marcadores tardíos de time-lapse utilizados para predecir resultados clínicos.....	16
➤ FIGURA 3. Intervalos de división y sincronía celular.....	20
➤ FIGURA 4. Clasificación jerárquica de embriones (Meseguer et al., 2011).....	23
➤ FIGURA 5. Ejemplos de clasificación de blastocistos.....	29
➤ FIGURA 6. Procesos de endocitosis en la célula.....	37
➤ FIGURA 7. Morfología vacuolar en endodermo de ratón.....	40
➤ FIGURA 8. Formación y maduración de autofagosomas en células de mamífero.....	42
➤ FIGURA 9. Ultraestructura de vacuolas autofágicas en fibroblastos de ratón embrionario.....	43
➤ FIGURA 10. Modulación de la autofagia mediada por mTOR.....	44
➤ FIGURA 11. Vacuolas en ovocitos.....	49
➤ FIGURA 12. Ovocito vacuolado y vesiculado en exceso.....	51
➤ FIGURA 13. Fancsoyits et al, 2011. Fotografías de la cohorte ovocitaria.....	53
➤ FIGURA 14. Vacuolas en ovocitos vitrificados.....	54
➤ FIGURA 15. Criterio ASEBIR de clasificación de vacuolas en embriones tempranos....	56
➤ FIGURA 16. Endocitosis y reproducción.....	57
➤ FIGURA 17: Esquema de diseño de trabajo.....	63
➤ FIGURA 18. Medición de la contracción de blastocistos.....	69
➤ FIGURA 19. Ejemplo 1 de medición de la contracción.....	69
➤ FIGURA 20. Ejemplo 2 de medición de la contracción.	69
➤ FIGURA 21. Medición de vacuolas.....	70
➤ FIGURA 22. Localización de vacuolas en el blastocisto.....	71
➤ FIGURA 23. Ejemplo de localización de vacuolas en el blastocisto.....	71

ÍNDICE DE TABLAS

- **TABLA 1.** Comparación de las medias entre división embrionaria e implantación con respecto al consenso de evaluación embrionaria ALPHA-ESHRE.....18
- **TABLA 2.** Clasificación de blastocistos según Grupo Interés Embriología ESHRE.....27
- **TABLA 3.** Clasificación embrionaria de blastocistos según ASEBIR.....28
- **TABLA 4.** Características descriptivas de pacientes que presentaron al menos un blastocisto transferido contraído frente a aquellas que no presentaron contracción.....75
- **TABLA 5.** Parámetros propios de los ciclos de FIV para pacientes que presentaron al menos un blastocisto transferido contraído frente a aquellas que no presentaron contracción.....76
- **TABLA 6.** Características morfológicas de los embriones que presentan al menos una contracción en el estadio de blastocisto comparados con aquellos sin contracción observada.....77
- **TABLA 7.** Parámetros morfocinéticos de los grupos de estudio.....77
- **TABLA 8.** Datos de gestación e implantación de transferencias con embriones contraídos frente a no contraídos.....78
- **TABLA 9.** Análisis de regresión logística de cómo afecta la contracción de blastocisto, el tipo de ciclo, el origen de ovocitos, la edad (donantes y pacientes), número de ovocitos mii, morfología y eclosión del blastocisto a la implantación embrionaria.....79
- **TABLA 10.** Datos de gestación y nacidos vivos de transferencias con embriones contraídos frente a no contraídos (SERIE 2).....81
- **TABLA 11.** Tiempo y duración de la contracción entre embriones KID+ y KID - (SERIE 2).....81
- **TABLA 12.** Relación entre calidad embrionaria y tiempo de inicio de contracción (KID) (SERIE 2).....83
- **TABLA 13.** Diferencia entre embriones KID- Y KID+ en las sucesivas vacuolizaciones.....87
- **TABLA 14.** Datos de tasa de blastocisto, blastocisto de buena calidad y descartados de embriones vacuolados frente a no vacuolados.....88
- **TABLA 15.** Tasas de gestación, implantación y rnv de embriones no vacuolados frente a vacuolados.....89
- **TABLA 16.** Tasa de implantación embriones kid en función de veces en las que se vacuolan.....89
- **TABLA 17.** Tiempo de aparición de la primera vacuola.....90
- **TABLA 18.** Kid en función del tiempo de aparición de la primera vacuola.....90

- **TABLA 19.** Embriones kid vacuolados. Comparación de la tasa de implantación en función de si en estadio de blastocisto presenta vacuolas o no.....90
- **TABLA 20.** Tasa de blastocisto en función del diámetro de las vacuolas entre 62-100 h.....92
- **TABLA 21.** Tasa de blastocisto de buena calidad en función del diámetro de las vacuolas entre 62-100 h.....92
- **TABLA 22.** Tasa de implantación KID en función del diámetro de las vacuolas entre 62-100h.....93

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

- **GRAFICO 1.** Evolución de la tasa de gestaciones múltiples en Europa2
- **GRAFICO 2.** Registro SEF. Evolución de la política de transferencia embrionaria.....3
- **GRAFICO 3.** Ejemplo de t5 en función de los grupos de estudio.....19
- **GRAFICO 4.** Ejemplo de cc2 (t2-t3) en función de los grupos de estudio..... 21
- **GRÁFICO 5.** Comparación de la tasa de implantación entre blastocistos KID no
contraídos frente a contraídos.....80
- **GRAFICO 6.** Calidad del blastocisto en función del tiempo de inicio de la contracción..82
- **GRAFICO 7.** Distribución de la primera aparición de vacuolas en los embriones
analizados.....84
- **GRÁFICO 8.** Distribución de la aparición de vacuolas en los embriones transferidos....85
- **GRÁFICO 9.** Distribución de la aparición de vacuolas en función de embriones KID – y
KID +.....86
- **GRAFICO 10.** Distribución de la aparición de vacuolas sucesivas en todos los
embriones.....86
- **GRAFICO 11.** Distribución de la aparición de vacuolas sucesivas en los embriones
transferidos.....87
- **GRAFICO 12.** Calidad de embriones transferidos en función de si presentan vacuolas o
no.88
- **GRAFICO 13.** Distribución de vacuolas en el blastocisto.....91
- **GRÁFICO 14.** Tasa de blastocisto, blastocisto ok e implantación en función del número
de células vacuoladas.....93

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Los avances, tanto en el campo de la Medicina Reproductiva como en la investigación relacionada con Reproducción Humana, han hecho que la tasa de éxito, medida como la consecución de un embarazo, haya aumentado significativamente desde que se consiguió el primer nacimiento por FIV en 1978 (Steptoe & Edwards, 1978). Como contrapartida, la tasa de gestaciones múltiples también se ha incrementado de forma notable, suponiendo un factor de riesgo tanto para la paciente que se somete a este tipo de tratamientos, como para los bebés resultantes.

Está documentado que en estos casos de gestaciones múltiples hay mayor probabilidad de cesárea, prematuridad, bajo peso al nacer, complicaciones en el parto y muerte perinatal (Ricciarelli et al., 2013; Sunderam et al., 2014). Dichas complicaciones son independientes de si se trata de gestaciones conseguidas de forma natural o asistida, pero el impacto de estas últimas es sustancialmente mayor. Si bien la incidencia de embarazos múltiples en estos últimos años ha ido disminuyendo, como veremos más adelante, el registro de datos de partos en Estados Unidos (EEUU) hasta el año 2011 (Sunderam et al., 2014), mostró que aproximadamente la mitad de los nacidos vivos por RA procedían de partos múltiples (46%), frente a solamente un 3% en la población general. El riesgo de prematuridad que describen es de 5 y 7 veces mayor en gestaciones gemelares y múltiples respectivamente, cuando se comparan con embarazos únicos de RA. En el caso del Registro Europeo (ESHRE: European Society of Human Reproduction and Embryology) de los datos correspondientes al año 2010 (Kupka et al., 2014), el riesgo de parto pre-término antes de 28 semanas se incrementa por 3 en gemelares y hasta por 13 en triples.

Otro aspecto a tener en cuenta es el elevado coste económico de las gestaciones múltiples (Law et al., 2015), puesto que se deben contemplar no solamente los gastos inmediatos de la hospitalización materna y posible cuidado intensivo de los neonatos, sino también los costes de vida y cuidados de futuras enfermedades crónicas, rehabilitación y educación especial. En EEUU, la media del gasto hospitalario que supone el parto y tratamiento posterior de una gestación única es de unos 9000 dólares, mientras que un parto de gemelos cuesta 20000 y se incrementa a 153000 en triples (Sunderam et al., 2014).

La única forma de disminuir las gestaciones múltiples es transferir un menor número de embriones en cada ciclo de FIV. Incluso en aquellos casos en los que la calidad embrionaria no es excelente, la transferencia de más embriones siempre implica un aumento en la tasa de gestaciones múltiples (Matorras et al., 2014).

En estos últimos años, numerosos esfuerzos se han realizado para conseguir disminuir este efecto colateral no deseado propio de los tratamientos de RA.

1.1- MODIFICACIÓN DE LA LEGISLACIÓN VIGENTE.

La legislación en cuanto al número de embriones a transferir se ha modificado a la baja en numerosos países, aunque no en todos. En EEUU, por ejemplo, la ley establece un número máximo de 5 embriones (Frith & Blyth, 2014), aunque durante los últimos años se han publicado diferentes recomendaciones enfatizando la necesidad de reducir el número de gestaciones múltiples, especialmente las triples y superiores (Gianaroli et al., 2012; Kissin et al., 2015; Kupka et al., 2014).

En cuanto a Europa, se puede decir que en general, las legislaciones existentes son bastante restrictivas, aunque es cierto que todavía hay grandes diferencias entre países. El último registro publicado de la ESHRE de datos del año 2010 (Kupka et al., 2014) muestra que los países nórdicos y Bélgica transfieren un solo embrión en más de un 50% de los ciclos, llegando incluso a superar el 70% en Suecia. Sin embargo, países como Bulgaria, Grecia o Italia, transfieren tres o más embriones en la mitad de los casos. El reciente cambio en la legislación italiana, que permite criopreservar embriones, probablemente conduzca a una disminución en este porcentaje. Como resultado, a lo largo de estos años ha habido una considerable disminución en la incidencia de embarazos triples (GRAFICO 1).

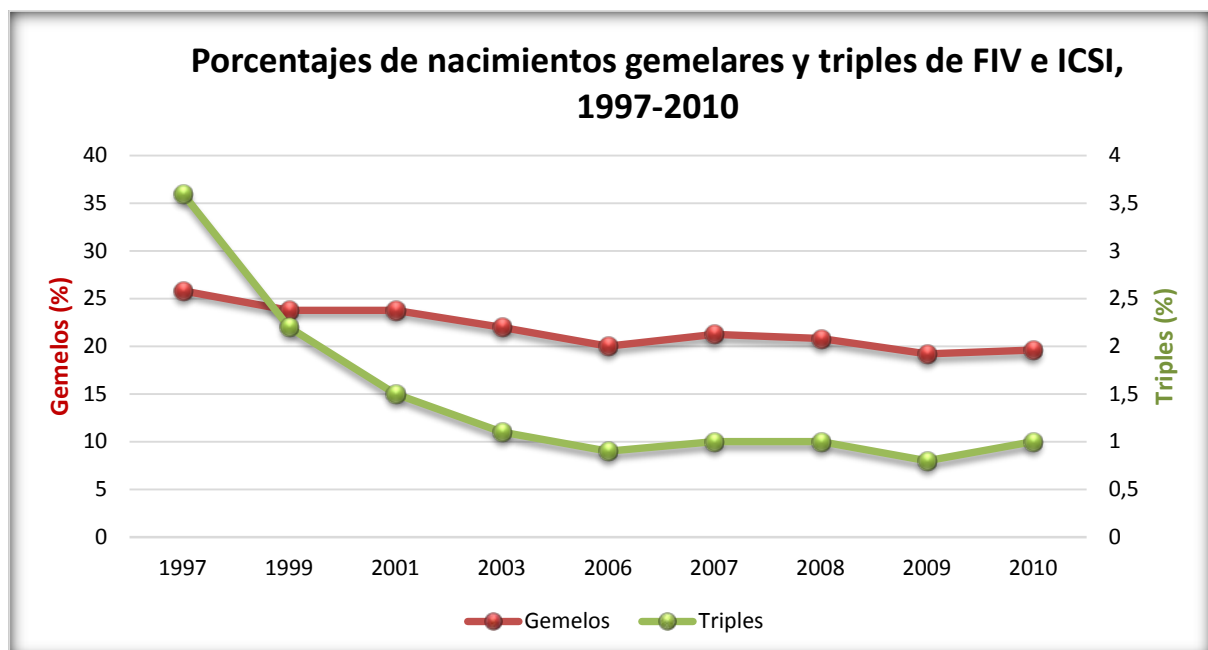


GRÁFICO 1. Evolución de la tasa de gestaciones múltiples en Europa (Kupka et al., 2014)

En España, la ley actual permite un máximo de tres embriones a transferir («BOE núm. 180 Martes 27 julio 2004 27179», 2004). El último registro de la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) del año 2013, muestra la evolución de la política de transferencia embrionaria en nuestro país (GRÁFICO 2)(SEF, 2013). La media de embriones transferidos por transfer en 2013 fue de 1.8, tanto en ovocitos propios como donados. La tasa de gestación gemelar de un 22.6% en propios y de un 29.8% en donación, y la de triples de un 2,7% en ovocitos propios y 6.7% en donación, cuando se transfieren 3 embriones.

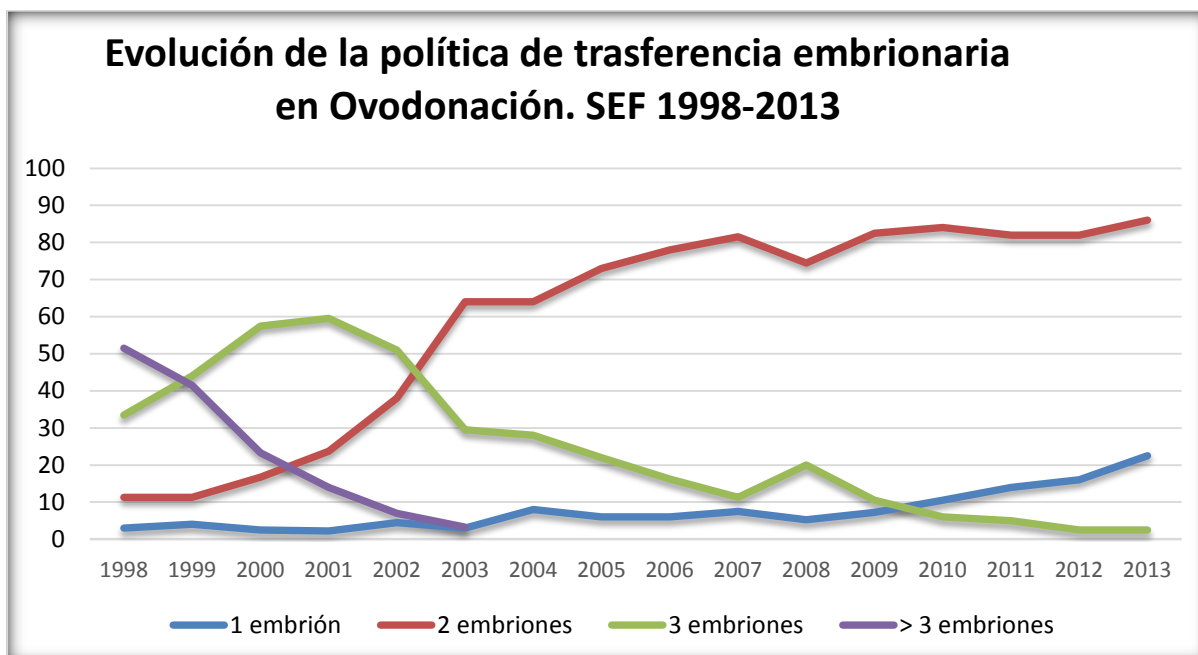
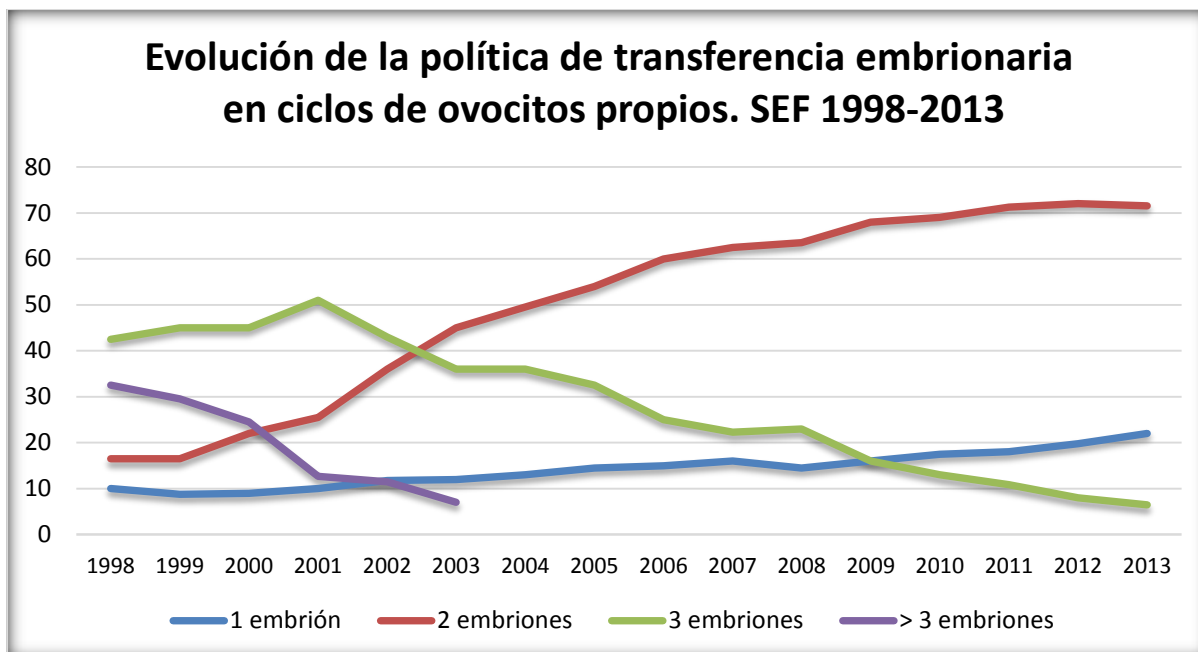


GRAFICO 2. Registro SEF. Evolución de la política de transferencia embrionaria (SEF, 2013).

Como se puede observar en las gráficas, la tendencia a transferir 3 embriones va disminuyendo gradualmente, hasta un 6.8% en ovocitos propios y un 2.6% en donados. El porcentaje de transferencias de dos embriones se sitúa por encima del 70% en ambos casos (71,5% en propios y 75.8% en donados). En cuanto a la transferencia de un embrión (SET), hay una tendencia al alza, que ya supera el 20%. Es especialmente notable el incremento de SET en los ciclos de donación de óvulos durante los últimos 4 años. De todos modos, seguimos lejos del 50% anteriormente citado para otros países europeos.

1.2- TRABAJO REALIZADO POR LA COMUNIDAD CIENTÍFICA Y CLÍNICA.

La comunidad clínica también está muy concienciada con favorecer las gestaciones únicas en los tratamientos de RA. De hecho, al revisar la bibliografía, aproximadamente un 25% de los trabajos que hablan de la relación entre FIV y gestaciones múltiples se han publicado en los últimos 5 años.

Como hemos visto anteriormente, la transferencia de 3 o más embriones está disminuyendo de forma considerable, por lo que la gestación múltiple, entendida como 3 o más sacos, también lo hace. Sin embargo, la tasa de embarazo gemelar se mantiene estable a lo largo del tiempo.

Las diferentes sociedades de Reproducción Humana son conscientes de que el reto actual es disminuir los elevados porcentajes de gestaciones múltiples que se derivan de los tratamientos de FIV. Además de seguir trabajando para que la transferencia de 3 o más embriones llegue a ser anecdótica, el verdadero hándicap estriba en conseguir que la transferencia electiva de un único embrión sea la práctica clínica de elección en aquellos casos donde sea posible. Desde estas organizaciones se han escrito diferentes artículos advirtiendo del riesgo de las gestaciones múltiples y estableciendo una serie de recomendaciones para prevenirlas (American Society for Reproductive Medicine, ASRM, 2012; Cabello et al., 2010; Gianaroli et al., 2012; Kupka et al., 2014).

Especial mención merece la Sociedad Británica de Fertilidad (BFS), que en unión a la autoridad competente, ayudó a redactar una ley donde todos los centros autorizados a realizar tratamientos de FIV se comprometieron a reducir sus tasas de múltiples, hasta conseguir un objetivo global de no más de un 10% en un plazo de 3 a 4 años (The British Fertility Society, 2011). Para conseguirlo, se nombró un comité de especialistas, que ayudaron a las clínicas a desarrollar estrategias de mejora de la práctica clínica y potenciación de eSET y se marcaron objetivos anuales máximos de gestaciones múltiples, desde un 24% para el año 2009 a un 15% en el 2011.

Numerosos trabajos se han publicado analizando diferentes aspectos de los ciclos de FIV que permitan implementar la transferencia electiva de un embrión sin disminuir por ello la probabilidad de embarazo. Los más importantes, a juicio de esta revisora, son: encontrar los grupos de pacientes que se pueden beneficiar de eSET; valorar otras fórmulas cuando se habla de tasa de éxito, como la tasa acumulada de gestación; concienciar a los pacientes de los grandes beneficios de estas políticas; y finalmente mejorar en lo posible la selección embrionaria, combinando los criterios clásicos con las nuevas tecnologías.

1.2.1- ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS DE PACIENTES QUE SE PUEDEN BENEFICIAR DE eSET.

1.2.1.1- PACIENTES DE OVOCITOS PROPIOS.

En general se propone que pacientes menores de 35 años, que se someten a primeros y segundos ciclos de FIV, con buena calidad embrionaria y buen pronóstico de embarazo, son las candidatas ideales para la transferencia de un solo embrión (Kissin et al., 2015; Luke et al., 2015). Se consideran factores excluyentes: mala calidad embrionaria, elevado Índice de Masa Corporal (IMC), edad avanzada, y factores múltiples de infertilidad (Gianaroli et al., 2012; Luke et al., 2015).

Las últimas recomendaciones del grupo de Interés de Salud Embrionaria de la SEF (4ª Reunión Nacional de los Grupos De Interés, Málaga 2013) para estas pacientes son:

- Desaconsejan la transferencia de 3 embriones.
- Candidatas a SET: Pacientes menores de 38 años, primer o segundo ciclo de FIV, y al menos 3 embriones de buena calidad en D3 o 2 en D5.

1.2.1.2- PACIENTES DE DONACIÓN DE OVOCITOS.

La aplicación de políticas de eSET en este tipo de pacientes es esencial, puesto que generalmente se trata de mujeres de edad avanzada, a las que se transfieren embriones de máxima calidad, por lo que el riesgo de gestación múltiple es muy elevado, así como la posibilidad de sufrir complicaciones obstétricas y perinatales (Kissin et al., 2015). De hecho, el principal factor predictivo para la gestación múltiple en los ciclos de donación de óvulos es la calidad embrionaria (Clua et al., 2010).

Cuando se comienzan a aplicar las políticas de eSET frente a Transferencia de Dos Embriones (DET) en este grupo de pacientes, y se comparan de forma retrospectiva las transferencias realizadas antes y después de la implementación de las mismas, se confirma que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a tasa de gestación

evolutiva (36,8% eSET vs 45,8% DET, NS), y que además el riesgo de embarazo gemelar disminuye de forma radical de un 29% a un 10% (Soderstrom-Anttila, 2003).

Estudios prospectivos randomizados comparando la transferencia de eSET vs DET, en pacientes con buen pronóstico de embarazo, con al menos 5 embriones y 2 de ellos de buena calidad, muestran los mismos resultados, aunque en este caso la tasa de gemelares cuando se transfieren dos embriones asciende a un 47% (Clua et al., 2015).

Las últimas recomendaciones del grupo de Interés de Salud Embrionaria de la SEF (4ª Reunión Nacional de los Grupos De Interés, Málaga 2013) para estas pacientes son:

- Desaconsejan la transferencia de 3 embriones.
- Candidatas a SET: Primer o segundo ciclo, y al menos 3 embriones de buena calidad en D3 o 2 en D5.

1.2.2- TASA ACUMULADA DE GESTACIÓN.

Tradicionalmente se ha hablado de resultados en cuanto a tasa de gestación refiriéndose únicamente a las transferencias realizadas en el mismo ciclo en el que se ha estimulado a la paciente, comúnmente llamadas “transferencias en fresco”. La razón fundamental es que la transferencia de embriones criopreservados no ofrecía las mismas posibilidades de embarazo.

Sin embargo, en los últimos años se ha producido uno de los avances más espectaculares en RA dentro del campo de la criopreservación, tanto de ovocitos como de embriones en todos sus estadios. La **vitrificación** (Kuwayama, 2007) se ha erigido como la técnica de elección en la mayoría de los laboratorios de FIV, debido fundamentalmente a las elevadas tasas de supervivencia y viabilidad ovocitaria y embrionaria. De hecho, los resultados de gestación e implantación son actualmente equiparables a los conseguidos en ciclos con transferencia en fresco. Brevemente, el protocolo de vitrificación se basa en la utilización de elevadas concentraciones de crioprotector (generalmente etilenglicol (EG), dimetil sulfóxido (DMSO) y sacarosa) unido a una rampa ultrarrápida de congelación, sumergiendo las pajuelas en nitrógeno líquido directamente.

Desde la introducción de la vitrificación, diferentes autores han confirmado que la tasa acumulada de gestación de eSET en fresco seguida de un transfer de embriones vitrificados, tiene la misma probabilidad de embarazo que la transferencia en fresco de dos embriones, y disminuye significativamente la incidencia de gemelares (Gianaroli et al., 2012).

Rodríguez-Barredo y colaboradores, diseñan un estudio prospectivo observacional en pacientes de ovocitos propios, menores de 35 años, y con buena calidad embrionaria (Rodríguez Barredo et al., 2012), donde las pacientes elegían transferencia electiva de un embrión o de dos. La tasa acumulada de gestación fue similar en los dos grupos (66% eSET vs 69% DET). Gracias a esta estrategia, la incidencia de embarazo gemelar disminuyó un 27% (de un 26.6% en DET a un 7,2% en eSET). Hay que destacar que las tasas de gemelares en las transferencias de embriones congelados fueron de un 20% aproximadamente en ambos grupos. Es decir, en el grupo de eSET la media de embriones transferidos aumentó debido a los ciclos de embriones vitrificados.

Otro estudio prospectivo y randomizado analiza estos mismos datos comparando la transferencia en fresco de dos embriones frente a eSET en fresco y su subsecuente eSET congelado, en pacientes de ovocitos propios menores de 38 años, con buen pronóstico clínico, y sin tener en cuenta la calidad embrionaria (López-Regalado et al., 2014). La tasa de gestación acumulada es similar en ambos grupos, y los embarazos dobles disminuyen de un 26.4% en DET a un 0% en doble eSET. Los mismos resultados se obtienen cuando se establece un modelo predictivo de gestación gemelar en función del número de embriones transferidos, y evaluando diferentes parámetros, como causa de infertilidad, IMC, etc (Luke et al., 2015). En este estudio, además, la tasa de nacidos vivo es similar o incluso un poco mejor en las transferencias sucesivas de un embrión.

Por tanto, cada vez son más los autores que proponen una nueva definición de ciclo de FIV, como herramienta adicional para potenciar los ciclos de eSET. El ciclo de Fecundación In Vitro debería definirse como: *“un ciclo ovárico estimulado seguido de transferencias consecutivas de un embrión hasta que se consigue gestación o se utilizan todos los embriones criopreservados”* (Johnston, Gusmano, & Patrizio, 2014).

1.2.3- CONCIENCIACIÓN DE LOS PACIENTES.

También los profesionales de R.A. desempeñan un papel protagonista para concienciar a los pacientes de que el objetivo fundamental de estos tratamientos es conseguir “un niño sano en casa”.

Debido a los elevados costes económicos que supone someterse a un ciclo de FIV, y al cansancio psicológico que el proceso conlleva, muchas parejas ven atractiva la idea del embarazo gemelar, como una forma rápida de culminar sus deseos de ser padres. En estos últimos años, diferentes campañas de concienciación se han llevado a cabo, desde las sociedades clínicas y científicas hasta las propias clínicas de RA, para que cambien de idea.

Los principales aspectos en los que se deben basar estas campañas son (The British Fertility Society, 2011):

- eSET en pacientes de buen pronóstico tienen una gran posibilidad de conseguir un niño sano en casa.
- Las tasas de éxito se mantienen si tenemos en cuenta la tasa acumulada de gestación y de niño nacido.
- Los riesgos obstétricos y perinatales son mucho menores cuando el embarazo es único.

Es cierto además, que la idea de transferir un solo embrión se acepta mejor cuando la pareja se somete a su primer ciclo de FIV. Si bien tanto la tasa acumulada de gestación, como los resultados obstétricos y perinatales son mejores cuando se transfiere un embrión en dos ciclos de FIV consecutivos, solamente un 16.9% de los pacientes que comienzan un segundo ciclo de FIV eligen eSET, frente a un 67.6% que lo hacen en el primero (Gremeau et al., 2012).

Actualmente no todas las parejas son candidatas a eSET. Se necesitan más estudios para incluir nuevos grupos de pacientes a las políticas de transferencia electiva de un solo embrión, para que en un futuro la gestación gemelar ya no suponga una complicación asociada a los tratamientos de RA.

1.3- SELECCION EMBRIONARIA. EL BLASTOCISTO.

La clasificación embrionaria es la herramienta más potente de la que actualmente disponen los laboratorios de FIV para seleccionar los embriones viables. En el caso de eSET, es fundamental identificar qué embrión va a dar lugar a un niño sano en casa. Sólo de este modo la tasa de gestación de las transferencias únicas irá en aumento, y con ella la confianza de los clínicos para recomendarlas y la de los pacientes para elegir las.

En este sentido, la **transferencia en estadio de blastocisto** se plantea ya como una estrategia efectiva a incluir en las políticas de eSET.

Los primeros trabajos publicados a finales de los 90, plantearon el cultivo a Día 5 de desarrollo (**D+5**, siendo DÍA 0 el día de la aspiración folicular) como alternativa a las bajas tasas de gestación e implantación de los embriones de Día 2 (**D+2**) o Día 3 (**D+3**) (Gardner et al., 1998; Marek et al., 1999; Schoolcraft & Gardner, 2000). Un mayor conocimiento de los requerimientos necesarios para el crecimiento de los embriones tuvo como consecuencia inmediata la mejora de los laboratorios de FIV y la aparición de medios de cultivo de nueva generación, que hicieron posible el desarrollo embrionario completo (Gardner et al., 1998).

Paralelamente se observó que se necesitaba transferir un número menor de blastocistos para conseguir los mismos o incluso mejores resultados de gestación que las transferencias de embriones tempranos (Ebner et al, 2003; Gardner et al., 1998; Marek et al., 1999; Schoolcraft & Gardner, 2000).

Incluso la transferencia de un solo blastocisto en pacientes de buen pronóstico presenta las mismas tasas de gestación que cuando se transfieren dos, entre el 60 y el 70% (Criniti et al., 2005; Styer et al, 2008). Sin embargo, con la transferencia única, la incidencia de gemelares decrece espectacularmente desde valores superiores al 50% a un 3%.

Numerosos artículos y meta-análisis se han publicado comparando la transferencia en D+3 frente a D+5. Se puede decir que, a igualdad de número de embriones transferidos, la tasa de nacido vivo y gestación por ciclo iniciado es mayor con blastocistos (Papanikolaou et al., 2008; Wang & Sun, 2014). Como contrapartida, también el porcentaje de cancelación aumenta significativamente (Glujovsky et al, 2012; Papanikolaou et al., 2008).

Sin embargo, la tasa de gestación acumulada es mayor en las transferencias realizadas en estadios tempranos (Glujovsky et al., 2012). Al revisar los artículos incluidos en esta revisión, se observa que hay una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de embriones congelados a favor de D+2 y D+3, debido probablemente a la variabilidad en la tasa de formación de blastocisto entre los diferentes trabajos, que oscila entre un 28% y un 60%. Este hecho, junto con la baja tasa de supervivencia encontrada en las transferencias de blastocistos criopreservados (27%), debido probablemente a los protocolos de congelación lenta que se utilizan, podría haber condicionado los resultados. Los mismos autores señalan que futuros estudios en los que se incluya la vitrificación de blastocisto como método de criopreservación efectivo en este estadio, podría tener un impacto positivo en la tasa de gestación acumulada.

Uno de los requisitos que la mayoría de artículos tienen en cuenta para incluir pacientes en el programa de cultivo a blastocisto, es que tiene que haber un número mínimo de embriones de buena calidad en D+3. En contraposición, hay trabajos que defienden que esta premisa no es necesaria para conseguir los mismos resultados de gestación clínica y nacido vivo por transferencia y por ciclo iniciado (Stoop et al., 2011).

Algunos autores mantienen la idea de que embriones que no alcanzan el estadio de blastocisto en cultivo podrían haber dado lugar a gestaciones viables si se hubieran transferido en estadios tempranos, aunque no hay artículos publicados que sustenten esa teoría (Grifo et al, 2014). Sin embargo, sí se ha estudiado que la tasa de aneuploidías de embriones de calidad óptima en D+3 es de un 59% frente a un 35% en blastocistos

(Staessen et al., 2004), por lo que el riesgo de transferir embriones aneuploides en D+3 es más elevado. Es más, en pacientes donde se transfieren blastocistos expandidos, la posibilidad de elegir un embrión euploide aumenta de un 41,3% en D+3 a un 65% en D+5. En pacientes mayores de 35 años, de hecho, tanto la tasa de gestación clínica (54,8%) como la tasa acumulada de gestación (58%) son estadísticamente mayores en TD+5 cuando se comparan con D+3 (29% y 25,8% respectivamente) (Fernández-Shaw et al, 2015). Puesto que la incidencia de anomalías cromosómicas en embriones está asociada a la edad materna, entre otras, la transferencia de blastocisto podría aumentar la probabilidad de tener un niño sano en casa en estas pacientes especialmente.

Otro factor en contra del cultivo a D+5 es la mayor tasa de cancelación de la transferencia porque los embriones no llegan a alcanzar el estadio de blastocisto. Sin embargo, cuando las condiciones de laboratorio son adecuadas y se aplican protocolos de estimulación correctos, esta posibilidad ocurre en menos del 5% de los casos (Fernández-Shaw et al., 2015; Papanikolaou et al., 2005), y como se ha dicho anteriormente, no quiere decir que realizando la transferencia en D+3 se hubiera conseguido un embarazo evolutivo. Cuando la tasa de blastocisto de un laboratorio supera el 50%, la probabilidad de que un cigoto no alcance dicho estadio disminuye significativamente (Papanikolaou et al., 2008).

En cuanto al valor predictivo de formación de blastocisto y/o implantación en función de parámetros de estadios tempranos, se puede decir que actualmente no hay ningún score embrionario o algoritmo que sea efectivo al 100% (Balaban et al., 2011; Ebner et al., 2003). Teniendo en cuenta el patrón de nucleolos en los pronúcleos (PN), solamente un 46% de cigotos preseleccionados como los mejores llegaron a blastocisto, y un 28% se bloquearon a lo largo del cultivo (Zollner et al, 2002). Respecto a factores predictivos de blastocisto en embriones tempranos, un 50% de los embriones que se transferirían en D+3 no se eligen en D+5 y un 30% detienen su desarrollo (Rijnders & Jansen, 1998).

Con estos datos, las sociedades científicas han incluido la transferencia única de blastocisto como estrategia efectiva para disminuir la incidencia de gemelares y mantener la tasa de gestación (Gianaroli et al., 2012; The British Fertility Society, 2011). Por un lado, todos los parámetros del cultivo embrionario in vitro son evaluados, por lo que disponemos de más información a la hora de seleccionar el mejor blastocisto; y por otro, parece ser que las características tardías de los parámetros embrionarios presentan más sensibilidad y especificidad en la predicción de implantación (Balaban et al., 2011). Hay que tener en cuenta también, que la transferencia en D+5 se realiza de forma más cronológicamente ajustada a la ventana de implantación (Fanchin et al., 2001; Papanikolaou et al., 2008).

Revisando la evolución de las gestaciones gemelares desde que la ley turca del 2010 obligara a la transferencia de un único embrión en pacientes de ovocitos propios, (Esinler et al, 2014) se confirma que hay una disminución drástica gracias a la aplicación de esta política. De hecho, encuentra que la tasa de gestación es similar cuando se compara DET con eSET de blastocisto, pero si se realiza eSET en D+3 la tasa de gestación disminuye.

Por tanto, la transferencia electiva de un blastocisto puede ser la clave para mantener las posibilidades de embarazo y disminuir las gestaciones gemelares, siempre y cuando se disponga de un sistema de cultivo secuencial óptimo, que asegure un elevado porcentaje de blastocistos y un programa de criopreservación con tasas de supervivencia máximas para este estadio embrionario.

1.4- NUEVAS TÉCNICAS DE SELECCIÓN EMBRIONARIA: TIME-LAPSE.

La videograbación del desarrollo embrionario es una técnica utilizada desde hace muchos años (Lewis & Gregory, 1929), aunque su uso ha sido básicamente experimental. El primer trabajo acerca de estudios de time-lapse en embriones humanos fue publicado en 1997 (Payne et al, 1997). Desde entonces, se han desarrollado nuevos sistemas de bioinformática y cinematografía para incluirlos dentro de los incubadores de cultivo de los laboratorios de FIV, y en muy pocos años han pasado a tener una relevancia clínica importante.

Básicamente, la Microscopía Time-Lapse (MTL) actual es una herramienta de estudio no invasiva, que proporciona información morfológica, dinámica y cuantitativa de las sucesivas divisiones y eventos que ocurren a lo largo del desarrollo embrionario. Los embriones son cultivados en presencia de un sistema de imagen, que captura fotografías en intervalos definidos (desde 5 a 20 minutos) a lo largo de un periodo específico de tiempo. A través de un software, estas imágenes individuales se procesan en una secuencia de time-lapse, transformándose en una película continua. De esta forma, la clasificación morfológica clásica se aúna con la cinética de división celular, en una nueva selección morfo-cinética.

1.4.1-TECNOLOGÍA TIME-LAPSE

Se han diseñado diferentes sistemas de cinematografía (Aparicio et al, 2013):

1. El incubador se construye alrededor del microscopio (Tokay-hit, Japón). Utilizado más para investigación, debido a su calidad de imagen, flexibilidad y diferentes posibilidades de medir parámetros. Sin embargo, no es adecuado para uso clínico debido a las condiciones sub-óptimas de cultivo.

2. El microscopio se inserta en un incubador.

Mantienen las condiciones de cultivo óptimas.

2.1- Prymo-vision™ (Cryoinnovations, Vitrolife).

2.2- Eeva (Auxogyn). Mediante imagen de campo oscuro captura las imágenes para analizar cuantitativamente la información del potencial de desarrollo del embrión de D+2, y seleccionar directamente los embriones de mejor pronóstico, basándose en los trabajos de Wong (Wong et al., 2010).

3. Un solo instrumento incorpora todas las aplicaciones (incubador+sistema de imágenes)

3.1- Biostation-Nikon (Japón): muy útil para avanzados proyectos de investigación, puesto que cuenta con numerosas opciones de imagen, incluso imágenes fluorescentes.

3.2- Embryoscope™ (Unisense Fertilitech, Dinamarca): Designado para uso clínico. Tiene capacidad para adquirir datos de hasta 72 embriones al mismo tiempo, y utiliza un software de análisis de imagen en el que todos los eventos embrionarios considerados se pueden interpretar fácilmente.

Los primeros trabajos publicados analizaron la “seguridad” del nuevo sistema. Los embriones cultivados de este modo están expuestos a la luz cada vez que se obtienen las imágenes digitales, pudiendo sufrir un estrés añadido que ocasione una disminución en la posibilidad de desarrollo. Sin embargo, estudios realizados en este sentido, dividiendo los ovocitos de una misma paciente entre observación convencional y cinematográfica, concluyeron que no hay diferencias en cuanto a la tasa de fecundación, desarrollo embrionario en D+2, D+3 y D+5, tasa de gestación e implantación (Cruz et al., 2011; Kirkegaard et al, 2012; Nakahara et al., 2010).

1.4.1.1- VENTAJAS DEL TIME-LAPSE.

La clasificación morfológica convencional sigue siendo el método fundamental para la evaluación embrionaria. Los parámetros más utilizados son: número de células, simetría y

fragmentación. Sin embargo, este tipo de categorización es estática, puesto que corresponde a momentos puntuales en el desarrollo embrionario, y conlleva una mayor subjetividad, ya que depende en gran medida del evaluador. Con MTL, la cantidad de información que se obtiene es mucho mayor y más objetiva y se pueden identificar eventos dinámicos irregulares, como reabsorción de fragmentos, divisiones anómalas o fallos en citocinesis (Aguilar et al., 2014; Aparicio et al., 2013; Hardarson et al., 2002; Wong et al., 2010).

Otros datos dinámicos que se pueden cuantificar por MTL son: formación y desaparición de los PN, tiempo exacto de cada división celular y duración de las diferentes citocinesis (Meseguer et al., 2011; Payne et al., 1997; Wong et al., 2010). De este modo, la evaluación embrionaria es más completa y puede mejorar las tasas de éxito de los ciclos de FIV.

La capacidad de MTL de mantener las condiciones de cultivo estables durante todo el tiempo de adquisición de datos es otra ventaja indiscutible de estos sistemas, puesto que no hay que sacar los embriones del incubador para evaluarlos. Variaciones de pH y temperatura pueden tener efectos adversos en el desarrollo de los mismos.

Como ventajas secundarias se puede decir que se reduce la manipulación de estas muestras, y supone un menor gasto de medios, fungibles y gases. En cuanto a la gestión del trabajo diario del laboratorio de FIV, estos sistemas ayudan a optimizar el tiempo y los recursos, puesto que no hace falta un horario estricto para evaluar los embriones.

1.4.1.2- LIMITACIONES DEL TIME-LAPSE

1- Limitaciones técnicas: los embriones se pueden mover a lo largo del cultivo y pueden generarse burbujas de aire que hagan que se pierda la imagen durante algún tiempo.

2- Limitaciones metodológicas: Se considera tiempo cero (t0) a la media del tiempo en la que se ha realizado el ICSI, y no el momento exacto en el que se microinyecta cada ovocito. Además, los intervalos de toma de imágenes oscilan entre 5 a 20 minutos, por lo que los tiempos de división no son absolutos, sino que se engloban en un rango.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que la cinética embrionaria varíe en función del tipo de medio de cultivo empleado (Ciray et al, 2012). Sin embargo, hay artículos que no encuentran diferencias (Basile et al, 2013). Otros factores que pueden variar los resultados son: el cultivo de embriones a bajas concentraciones de Oxígeno (O₂), la técnica de

fecundación empleada, el día en el que se realiza la transferencia, etc (Kaser & Racowsky, 2014). Hay que destacar que las variables cinéticas que más oscilan son los tiempos de división celular, no los intervalos que duran las citocinesis.

1.4.2- PARÁMETROS CINÉTICOS TEMPRANOS DE VIABILIDAD EMBRIONARIA

Los parámetros cinéticos hacen que la selección embrionaria sea mucho más potente (Dal Canto et al., 2012), puesto que dos embriones de 4 células en un mismo ciclo, que pueden parecer semejantes en una observación convencional, son sustancialmente diferentes en una evaluación dinámica, dependiendo de cómo y cuándo han sido sus divisiones celulares.

En las FIGURAS 1 y 2 se muestra un resumen de los eventos cinéticos analizados en las diferentes publicaciones. Las columnas a color muestran los parámetros que se repiten con más frecuencia.

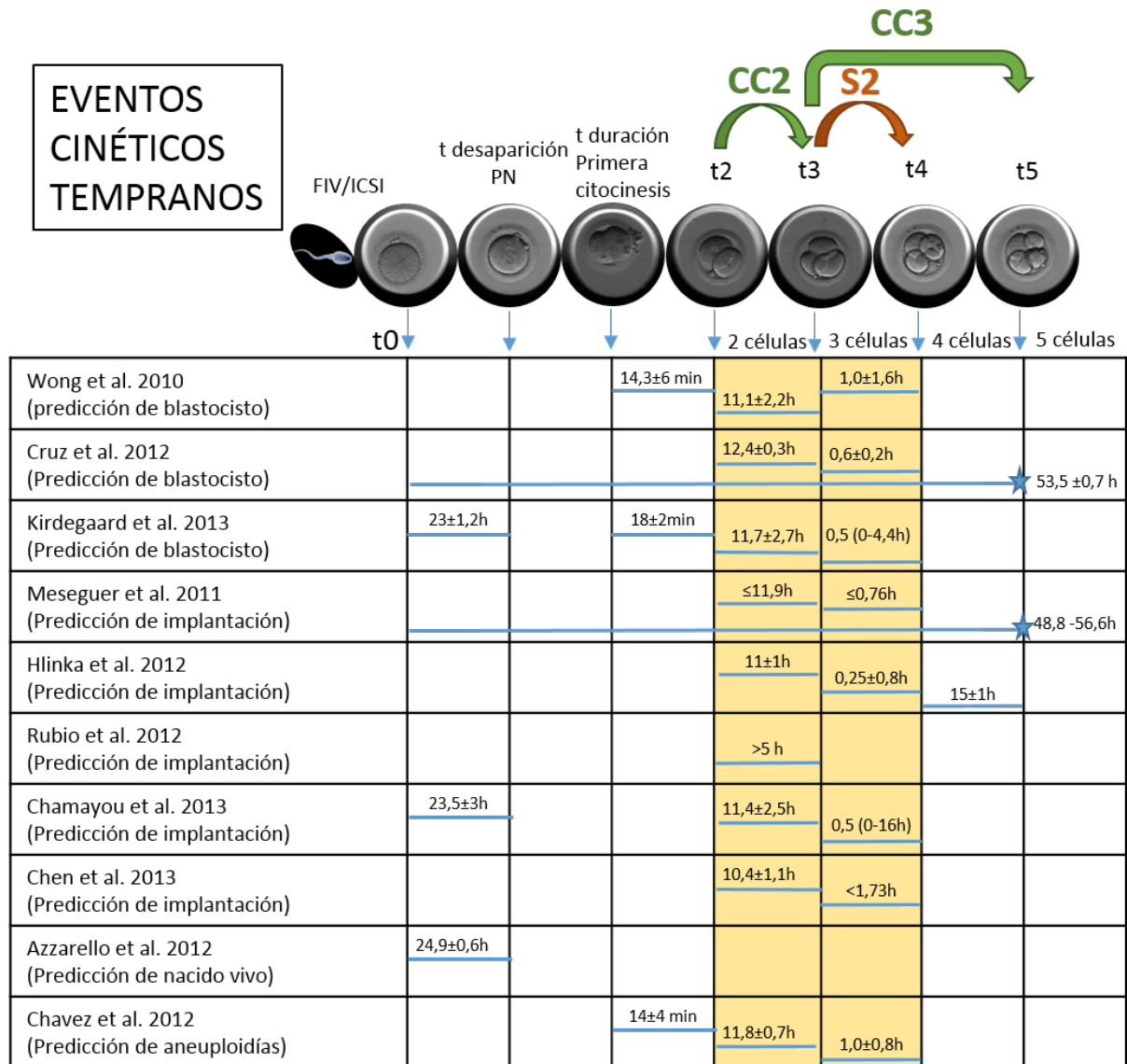


FIGURA 1. Marcadores tempranos de time-lapse utilizados para predecir resultados clínicos (modificado de Kaser y Racowsky, 2014). T0: Tiempo de ICSI.

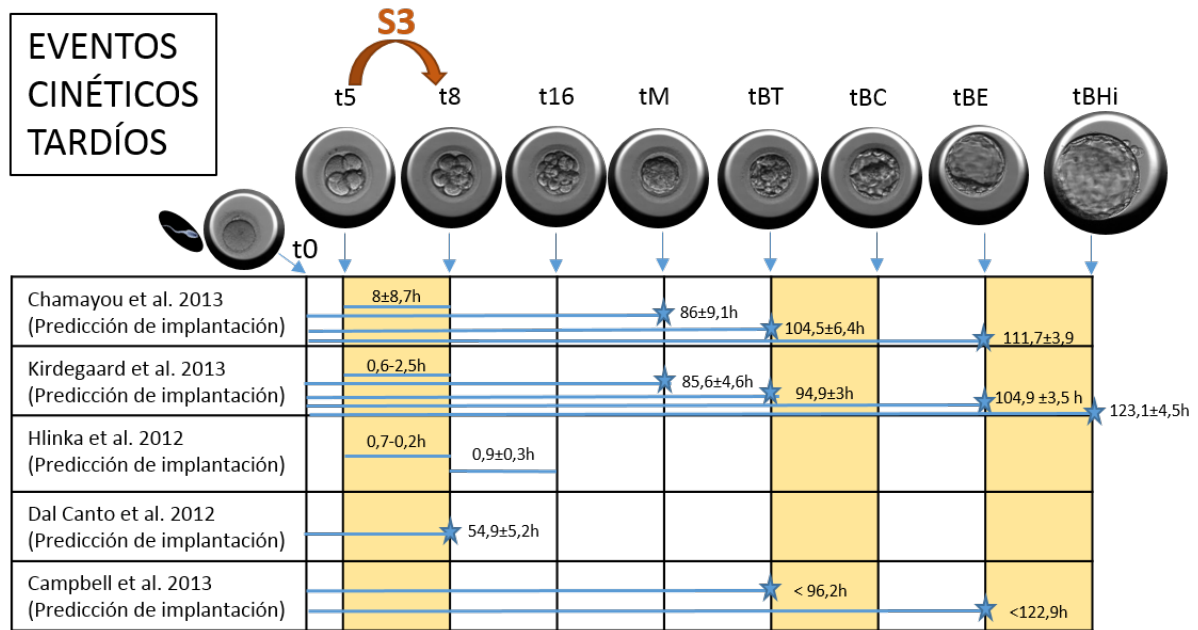


FIGURA 2 Marcadores tardíos de time-lapse utilizados para predecir resultados clínicos (modificado de Kaser y Racowsky, 2014). t0: Tiempo de ICSI.

Desarrollando los parámetros cinéticos identificados por time-lapse como predictores de desarrollo embrionario e implantación, podemos encontrar:

1.4.2.1- DE OVOCITO A CIGOTO.

El primer trabajo publicado con time-lapse (Payne et al., 1997) reflejó que embriones de buena calidad parecían proceder de ovocitos con tiempo uniforme desde el ICSI a la desaparición de pronúcleos (PN), y tendían a exhibir ondas citoplasmáticas con periodicidad ligeramente más larga.

Estudios posteriores de MTL evaluando la aparición, singamia y desaparición de los PN no encuentran diferencias entre embriones que implantan y aquellos que no lo hacen (Chamayou et al., 2013; Kirkegaard et al, 2013). Sin embargo, los resultados obtenidos por Azzarello sí muestran que el tiempo de desaparición de los PN es significativamente mayor en aquellos embriones que resultan en un niño nacido (24,9 vs 23,3 h) y que la desaparición de los mismos antes de 20,45 h implica no implantación o aborto (Azzarello et al, 2012). En este sentido, otros autores han encontrado que la capacidad de implantación disminuye en aquellos cigotos en los que los PN desaparecen antes de 22,2 h o después de 25,9h tras ICSI, así como cuando ocurre una rápida extrusión del 2º Corpúsculo Polar (CP) (1-3,2h) (Aguilar et al., 2014).

En cuanto al patrón de nucleolos y PN, los autores sugieren evaluarlo justo antes de que desaparezcan, al ser un proceso dinámico. También parece que una asincronía en el tiempo de desaparición de los PN puede afectar al desarrollo embrionario. Sin embargo, ningún artículo refleja relación entre patrón de PN e implantación.

Parece ser por tanto que las variables dinámicas propias de estos estadios no tienen gran poder de predicción de implantación, aunque patrones demasiado rápidos o demasiado lentos en la desaparición de PN podrían considerarse como factores negativos.

1.4.2.2- PRIMERA DIVISIÓN MITÓTICA O DIVISIÓN TEMPRANA.

Con las técnicas de time-lapse se ha correlacionado la División Temprana (DT) positiva (primera división mitótica entre 25-27 h post microinyección) con un mayor número de células en D+2 (4 ó más), así como con mejores tasas de implantación si la aparición de los núcleos del embrión de 2 células es sincrónica (Lemmen et al, 2008).

Uno de los nuevos parámetros aparecidos con MTL es la duración de la primera división mitótica (Wong et al., 2010); es decir, el tiempo que transcurre desde el inicio del surco de división del cigoto hasta la escisión completa de las 2 células. Se ha relacionado positivamente con la formación de blastocisto, pero no con la implantación (Kirkegaard et al., 2013). Sin embargo, en muchas ocasiones no se puede medir correctamente, debido a que los intervalos de tiempo en los que se toman las imágenes para time-lapse suelen ser de unos 15-20 minutos, y este proceso dura escasamente 30.

Al igual que la desaparición temprana de PN, parece ser que cuando el cigoto se divide a 2 células antes de 24,3 h, presenta menores tasas de implantación (Meseguer et al., 2011).

1.4.2.3- ESTADIOS TEMPRANOS DE DIVISION: D+2 Y D+3.

Con los sistemas time-lapse se abre un nuevo método de evaluación de los embriones, porque se puede medir cuándo ocurren las diferentes divisiones y cuánto duran los ciclos celulares.

1.4.2.3.1- TIEMPOS DE DIVISIÓN.

Sabemos que determinados estadios a tiempos concretos tienen mejores tasas de formación de blastocisto e implantación, pero ahora podemos conocer el momento en el que se ha de producir cada división embrionaria. Analizando un total de 9530 embriones de ciclos de ICSI, Herrero y colaboradores midieron los tiempos medios en los que los embriones se dividen a 2, 3, 4, 5, 8 células (t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_8), así como t_M (tiempo de

observación de Mórula) y tB (tiempo de observación de blastocisto) y los relacionaron con división a 8 células, formación de blastocisto e implantación. Observaron que durante las primeras divisiones (t2, t3, t4) la mayoría de los embriones se dividen en un rango estrecho de tiempo, mientras que en las mitosis posteriores (t5, t6, t7, t8) hay una mayor dispersión de datos, probablemente debido a la presencia de embriones de diferente calidad y al comienzo del imprinting genómico. Los resultados obtenidos se muestran en la TABLA 1.

Variable	Media de observación time-lapse (embriones sin división directa)	Media de observación time-lapse (implantación)	Tiempos de observación recomendados (ALPHA-ESHRE)
t2	26.4	25.8	26 ± 1
t4	39.7	38.6	44 ± 1
t8	58.7	57.1	68 ± 1
tM	89.3	85.1	92 ± 2
tB	104.1	102.0	116 ± 2

TABLA 1. Comparación de las medias entre división embrionaria e implantación con respecto al consenso de evaluación embrionaria ALPHA-ESHRE. *Nota: datos expresados en horas post-ICSI. Herrero. Morphokinetic characteristics of embryo. Fertil Steril 2013.*

Varios trabajos han relacionado los tiempos de división tempranos con la formación de blastocisto en general y/o con la tasa de blastocisto de buena calidad, encontrando que un desarrollo rápido favorece el desarrollo óptimo a D+5 (Chamayou et al., 2013; Desai et al., 2014; Hashimoto et al., 2012; Herrero et al., 2013). Parece ser que la división lenta en estadios tempranos compromete más el desarrollo hasta D+3, mientras que tiempos demasiado rápidos a 8 células favorecen el bloqueo embrionario posterior. Los autores concluyen por tanto que parámetros tempranos (t2, t3, t4) están relacionados con el desarrollo hasta D+3, y se necesitan además t5 y t8 para predecir la formación de blastocisto (Herrero et al., 2013). Otros autores concluyen que embriones que se bloquean en estadios avanzados de desarrollo se dividen hasta 6 células con una cinética similar a embriones que se desarrollan a blastocisto, pero se produce un retraso significativo en t8 (Dal Canto et al., 2012). De todos modos, todavía no se ha encontrado un modelo reproducible y con elevados porcentajes de sensibilidad y especificidad que, teniendo en

cuenta los tiempos de división de eventos tempranos de desarrollo embrionario, prediga la formación de blastocisto.

Las divisiones celulares son todavía más rápidas cuando se relacionan con implantación (Dal Canto et al., 2012; Desai et al., 2014; Herrero et al., 2013). Se puede decir por tanto, que la capacidad del embrión de alcanzar el estadio de blastocisto, expandirse e implantar está asociada a cada vez menores tiempos de división durante los primeros ciclos de mitosis, como se muestra en el GRÁFICO 3. Estos autores concluyen que las divisiones de 2 a 8 células ocurren progresivamente antes que los tiempos de observación consensuados por la comunidad científica, y recomiendan revisarlos. El tiempo de división t_5 se ha postulado como un parámetro dinámico fundamental para predecir implantación (Meseguer et al., 2011). Sin embargo, otros artículos no encuentran diferencias (Chamayou et al., 2013; Kirkegaard et al., 2013).

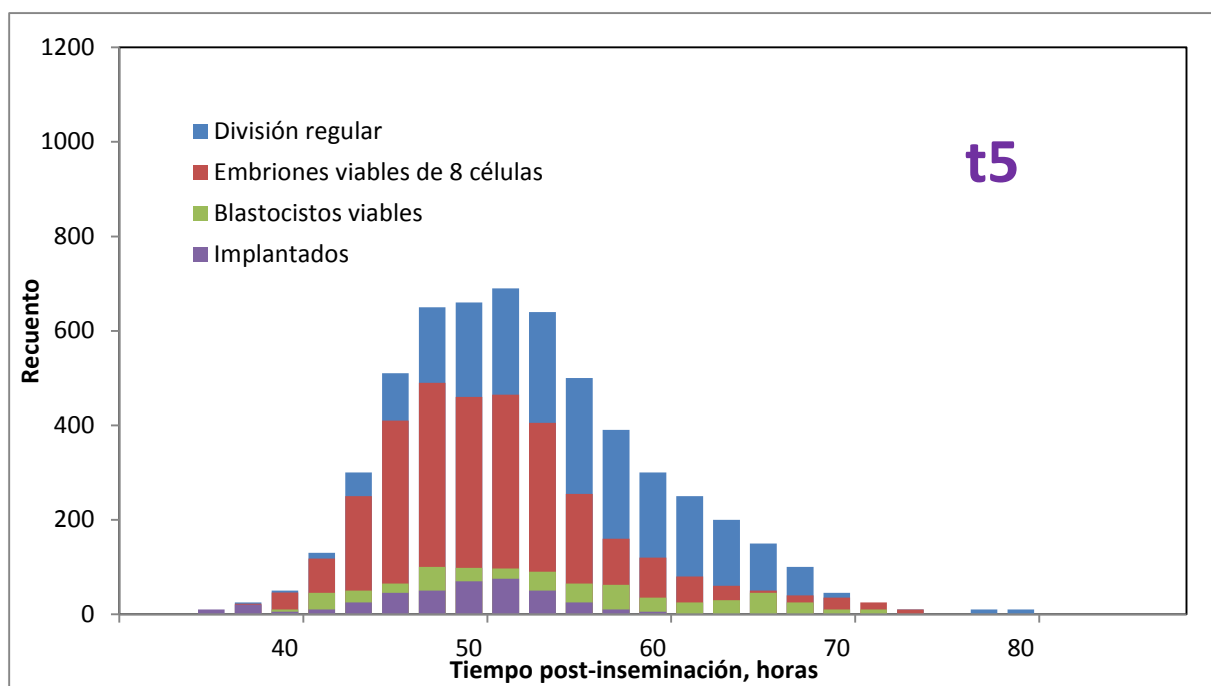


GRÁFICO 3. Ejemplo de t_5 en función de los grupos de estudio (Herrero et al., 2013)

En función de los artículos publicados, se puede decir que los tiempos exactos de división celular no son absolutos, si bien hay una tendencia a definir intervalos similares. Estas diferencias pueden deberse a numerosos factores, como condiciones de cultivo, tipo de ciclo, etiología, edad materna, etc, como se ha comentado en el punto 1.4.1.2.

1.4.2.3.2- INTERVALOS DE DIVISIÓN Y SINCRONÍA CELULAR.

Otro parámetro dinámico que se ha estudiado es el tiempo que dura cada división mitótica, especialmente el intervalo entre 2-3 células, 3-4, 4-5 y 5-8. A lo largo de la división embrionaria temprana, se pueden definir dos tipos de ciclos: el que corresponde a un ciclo celular de división, como $cc2=t3-t2$ y $cc3=t5-t3$; y los ciclos que reflejan la sincronía entre células, como transición de 2 a 4 células ($s2= t4-t3$) o de 4 a 8 ($s3=t8-t5$) (FIGURA 3)

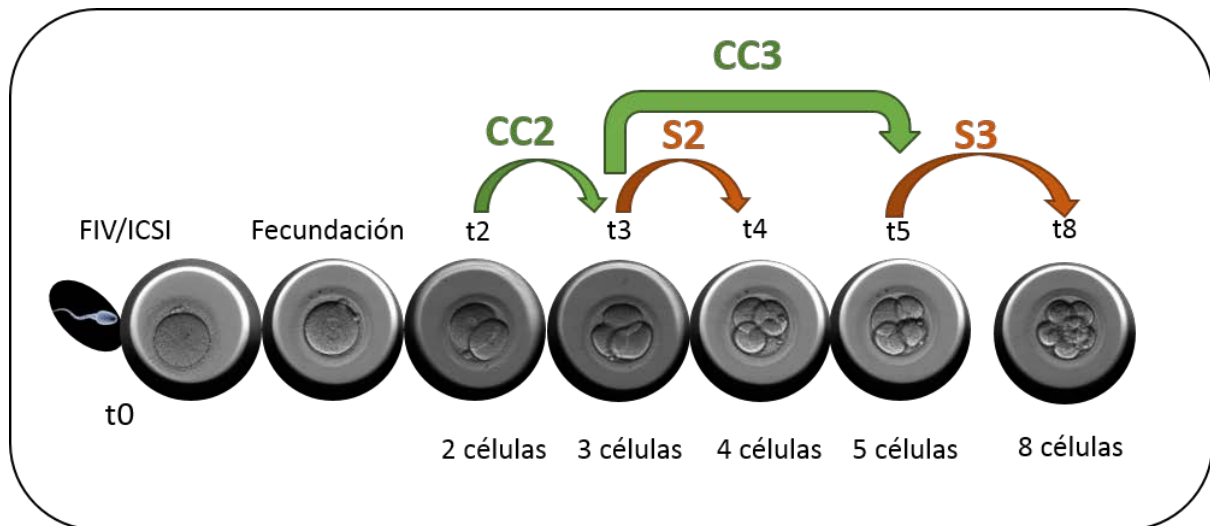


FIGURA 3. Intervalos de división y sincronía celular.

La duración de $cc2$ ($t3-t2$) es ligeramente menor (11.6h) que la de $cc3$ ($t5-t3$) (13.6h). Sin embargo, $s2$ ($t4-t3$) es mucho más corta (0.75h) que $s3$ ($t8-t5$) (7.02h) (Herrero et al., 2013). Los autores atribuyen este hecho a las posibles diferencias acumuladas en la duración de los ciclos celulares entre embriones, o al resultado de las diferencias en términos de competencia de gametos que pueden influir en los mecanismos de control del ciclo celular y en los genes responsables de la citocinesis (Wong et al., 2010).

Los eventos dinámicos de las primeras 48 horas de cultivo correlacionados positivamente con la formación de blastocisto son **cc2 y s2** (Cruz et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013; Milewski et al., 2015; Wong et al., 2010). Otros artículos incluyen parámetros medidos en D+3, como **s3 (t8-t5)** para ajustar aún más la predicción tanto de blastocisto como de blastocisto de buena calidad (Chamayou et al., 2013; Dal Canto et al., 2012; Desai et al., 2014; Hashimoto et al., 2012). De hecho, el uso de Eeva en combinación con la clasificación morfológica clásica en D+3 aumenta hasta en un 38% la habilidad de identificar embriones que se van a desarrollar de forma óptima a D+5 (Conaghan et al., 2013), disminuyendo además la variabilidad intraobservador.

En cuanto a parámetros relacionados con implantación medidos por time-lapse, los resultados son más controvertidos. Parece ser que marcadores dinámicos de formación de blastocisto difieren de los que predicen implantación, puesto que también la duración de los ciclos de división se va reduciendo en aquellos embriones con mayor capacidad de implantar (Dal Canto et al., 2012; Hashimoto et al., 2012; Herrero et al., 2013). En el GRÁFICO 4 se puede apreciar esta distribución de los datos para cc2 (t3-t2).

Las variables **cc2**, **s2** y **cc3** se correlacionan positivamente con implantación (Chamayou et al., 2013; Meseguer et al., 2011), aunque otros autores no encuentran diferencias en ningún parámetro dinámico observado (Desai et al., 2014; Kirkegaard et al., 2013).

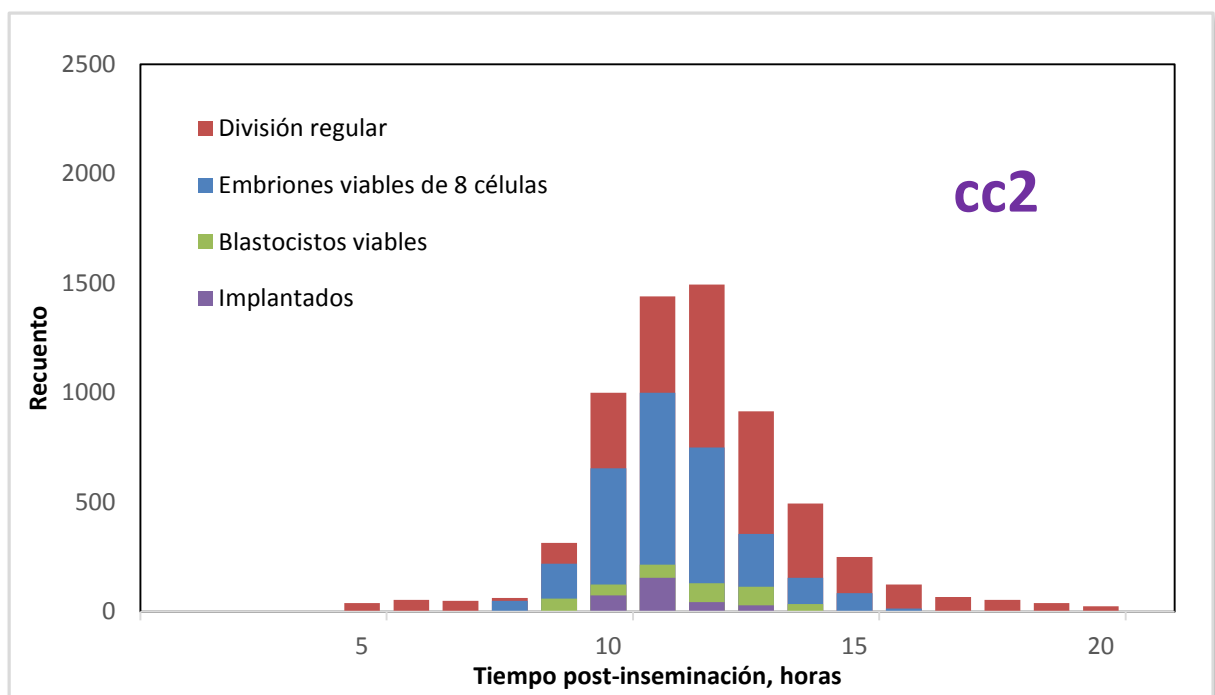


GRAFICO 4. Ejemplo de cc2 (t2-t3) en función de los grupos de estudio (Herrero et al., 2013)

1.4.3- MODELOS PREDICTIVOS DE FORMACIÓN DE BLASTOCISTO E IMPLANTACIÓN.

Dos trabajos fundamentales se han publicado como modelos de predicción de formación de blastocisto e implantación, en función de los eventos dinámicos de división de embriones tempranos: los de Wong en 2010 y Meseguer en 2011.

En 2010, Wong y colaboradores estudian 242 cigotos descongelados de FIV combinando MTL y tecnologías de expresión génica (Wong et al., 2010). Un 39% de los 100 embriones cultivados a D+5-6, alcanzan el estadio de blastocisto. En cuanto a los registros

cinéticos, encuentran 3 parámetros que son fundamentales para el desarrollo embrionario completo:

PARÁMETRO 1: DURACIÓN DE LA PRIMERA CITOCINESIS: 14.3 ± 6.0 min.

PARÁMETRO 2: TIEMPO ENTRE PRIMERA Y SEGUNDA MITOSIS ($cc2=t3-t2$): 11.1 ± 2.2 h.

PARÁMETRO 3: SINCRONÍA ENTRE SEGUNDA Y TERCERA MITOSIS ($s2=t4-t3$): 1.0 ± 1.6 h.

En función de estos datos, establecen un **algoritmo de predicción de formación de blastocisto** que presenta una sensibilidad del 94% y una especificidad del 93%, de manera que todos los embriones cuyos tiempos de división entran dentro de los valores: 0-33 min para el **parámetro 1**, 7.8-14.3h para el **parámetro 2** y 0-5.8 h para el **parámetro 3** alcanzan el estadio de blastocisto. Los embriones bloqueados presentan patrones de citocinesis aberrantes, necesitan más tiempo para completar las divisiones celulares y los procesos de reabsorción de fragmentos raramente se producen. Además, cuando el desarrollo se detiene antes de 8 células, el perfil de expresión génica es anómalo, lo que indica problemas en la reserva materna de mRNA, y apoya la teoría de estos autores de que el destino de los embriones puede ser predeterminado en el desarrollo temprano. Este modelo no se puede aplicar a resultados de implantación, puesto que en el trabajo los blastocistos resultantes no se transfieren. Tampoco hacen referencia los autores a ninguna clasificación de la calidad embrionaria en D+5.

Otros estudios también encuentran al menos una variable similar para predecir la formación de blastocisto (Cruz et al., 2012; Dal Canto et al., 2012; Hashimoto et al., 2012; K Kirkegaard et al., 2013).

Los parámetros morfocinéticos muestran una gran simetría y pequeña dispersión en el grupo de embriones que llegan a D+5 (Milewski et al., 2015). Para estos autores, la utilización de t_2 , t_5 y $cc2$ en un score combinado predice la formación de blastocisto hasta en un 90% (AUC=0.806 (95% C.I.:0.747-0.864). Sin embargo, al igual que Wong, no diferencia entre buena o mala calidad embrionaria.

Cetinkaya y colaboradores sí estudian la formación de blastocisto de buena calidad, y encuentran que el mejor el mejor valor predictivo en D+3 es la sincronía entre t_2-t_8 , alcanzando un 80% de éxito (Cetinkaya et al., 2015).

En 2011, Meseguer y colaboradores (Meseguer et al., 2011) desarrollan un **algoritmo predictivo de implantación** para transferencias de D+3 en ciclos de pacientes

de ovocitos propios, analizando un total de 247 embriones transferidos con implantación conocida (FIGURA 4).

El algoritmo de estos autores se basa en una **primera selección morfológica** de los embriones. Aquellos no viables se clasifican como **F**. La clasificación **E** corresponde a los que presentan asimetría severa en el estadio de 2 células, división directa de cigoto a 3 células, y/o multinucleación en el estadio de 4 células.

Después de estos dos procesos se aplican los 3 criterios dinámicos que según estos autores son predictivos de implantación:

PARÁMETRO 1: TIEMPO DE DIVISIÓN A 5 CÉLULAS (t_5): 48.8-56.6h

PARÁMETRO 2: TIEMPO ENTRE PRIMERA Y SEGUNDA MITOSIS ($cc_2=t_3-t_2$): $\leq 11.9h$.

PARÁMETRO 3: SINCRONÍA ENTRE SEGUNDA Y TERCERA MITOSIS ($s_2=t_4-t_3$): ≤ 0.76

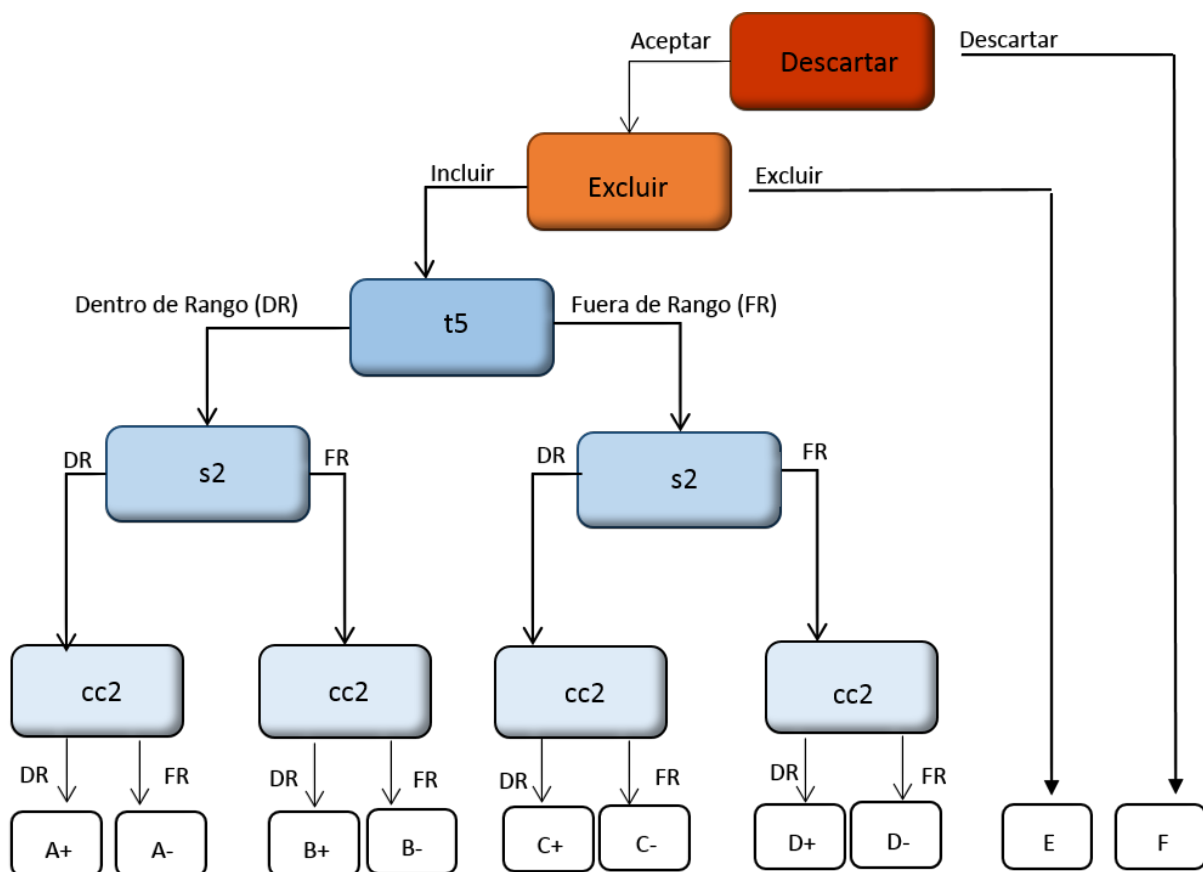


FIGURA 4. Clasificación jerárquica de embriones (Meseguer et al., 2011)

Aplicando los 3 parámetros predictivos de implantación a la formación de blastocisto, se confirma que en los intervalos óptimos establecidos para t5, cc2 y s2 hay mayor proporción de blastocistos y de blastocistos de buena calidad que fuera de ellos (Cruz et al., 2012). Se concluye también en este estudio que los tiempos de desarrollo se acortan a medida que mejora la calidad embrionaria.

Este mismo grupo comprobó que la tasa de gestación clínica en curso mejora un 16.9% por transferencia en los ciclos que utilizan la selección morfocinética, frente a la valoración morfológica de los incubadores tradicionales (Meseguer et al., 2012; Rubio et al., 2014). Los datos reflejan el incremento de los resultados clínicos como consecuencia de una mayor estabilidad en las condiciones de cultivo, así como de la implementación de un sistema de selección embrionaria en D+2 y D+3 más efectivo.

1.4.4- ANEUPLOIDÍAS Y ANÁLISIS MORFOCINÉTICO.

Hay varios artículos que utilizan MTL para intentar seleccionar embriones cromosómicamente normales. Parece ser que solamente un 30% de embriones aneuploides se encuentran dentro de los valores de división óptimos hasta el estadio de 4 células (Chavez et al., 2012). El resto se caracterizan por una gran variabilidad en los ciclos celulares, presentando además mayor incidencia de fragmentos que contienen material genético y que pueden persistir o reabsorberse a lo largo del desarrollo embrionario. Variaciones en el tiempo de desaparición de PN, t2, t5, CC2, CC3 y t5-t2 reflejan anomalías cromosómicas (Basile et al., 2014; Chawla et al., 2015). Otros estudios no encuentran diferencias en estadios tempranos, pero sí en el inicio de compactación, blastulación y tiempo de expansión del blastocisto (Campbell et al., 2013), que es más lento en embriones genéticamente incorrectos.

Sin embargo, otros artículos no hallan este valor predictivo de aneuploidías en los eventos dinámicos de desarrollo embrionario (Kramer et al., 2014; Yang et al., 2014). De hecho, los intentos por encontrar un algoritmo que relacione dinámica embrionaria con anomalías cromosómicas han dado una probabilidad de éxito no muy alta (AUC 0.634; 95% C.I 0.581-0.687) (Basile et al., 2014).

Podemos concluir pues, que con los datos actuales la clasificación morfocinética que proporcionan las técnicas de time-lapse no es suficiente para pronosticar que un embrión sea euploide o no, por lo que no debería considerarse como un reemplazo de las técnicas de screening genético preimplantacional. Sin embargo, la combinación de las dos técnicas sí proporciona mejores tasas de gestación e implantación cuando se comparan ciclos de

biopsia embrionaria en D+3 donde la mitad de los ovocitos se cultivó en un incubador convencional y la otra mitad en uno cinematográfico (Yang et al., 2014).

1.4.5- TIME LAPSE Y BLASTOCISTO.

Existen pocos artículos que estudien parámetros dinámicos más allá de D+3 (Cruz et al., 2012; Desai et al., 2014; Herrero et al., 2013; Storr et al., 2015), debido probablemente a que uno de los objetivos fundamentales de los diferentes trabajos ha sido intentar predecir la formación de blastocisto, blastocisto de buena calidad y embrión que implanta, en un intento de equiparar los resultados clínicos de las transferencias de embriones tempranos con las realizadas en D+5. Otra posible razón es que la medición exacta de parámetros como compactación o expansión del blastocisto no es tan objetiva como los publicados hasta la fecha, por lo que establecer modelos predictivos de implantación puede resultar complicado.

Los resultados obtenidos en los artículos mencionados señalan de nuevo que tiempos de división más rápidos favorecen la llegada a mórula, blastocisto, blastocisto de buena calidad y embrión que implanta.

Parece ser que los parámetros tempranos de desarrollo no son capaces por sí mismos de predecir qué embrión va a implantar con la suficiente especificidad y sensibilidad. Además, en estos estadios de hasta 5 células, los embriones son gobernados fundamentalmente por el genoma materno, así que es cuestionable que sean representativos de una correcta evolución, puesto que la activación del genoma embrionario humano ocurre más tarde (Herrero & Meseguer, 2013).

Tampoco los parámetros cinéticos tempranos hasta el estadio de 2 células son iguales dependiendo de si la técnica de fecundación es FIV o ICSI. Según los artículos publicados, la cinética inicial de los ovocitos de FIV es más lenta que la de ICSI, debido muy probablemente al decalaje que supone la entrada del espermatozoide en el ovocito, frente a la introducción directa del mismo en la microinyección (Cruz et al., 2013; Dal Canto et al., 2012), aunque después los tiempos se equiparan.

Como se ha explicado anteriormente en la **sección 1.3**, la transferencia embrionaria en D+5 es una herramienta importante en las transferencias de un único embrión. Hay autores que proponen aplicar los parámetros cinéticos conocidos a la selección del mejor blastocisto para transferir (Dal Canto et al., 2012). En relación a los eventos dinámicos anómalos, el cultivo a blastocisto puede ayudar a decidir si el embrión es finalmente viable o no (Stecher et al., 2014).

1.4.6- PARÁMETROS CINÉTICOS DE NO VIABILIDAD EMBRIONARIA.

- **CICLOS CORTOS DE DIVISIÓN:** La duración de un ciclo celular suele ser de unas 10-12 h, tiempo suficiente para la duplicación del DNA y citocinesis posterior. Tiempos cortos de división pueden estar relacionados con distribución anormal de DNA entre las blastómeras o errores en su replicación. Con los sistemas de time-lapse se pueden identificar divisiones anómalas en los embriones que se corresponden con una disminución significativa de llegada a blastocisto e implantación (Kirkegaard et al., 2013; Meseguer et al., 2011; Rubio et al., 2012).

1.4.7- OTRAS APLICACIONES DE TIME-LAPSE.

Con MTL podemos además cuantificar y medir otros eventos dinámicos que ocurren en el desarrollo embrionario, y que suelen modular la clasificación o score asignado a un embrión en base a sus características morfológicas.

El volumen que ocupan los **fragmentos** en el embrión y su distribución es uno de los 3 pilares básicos de cualquier clasificación embrionaria convencional (Balaban et al., 2011; *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir*, 2015). Con MTL Se puede ajustar mejor la clasificación embrionaria en función de la aparición y reabsorción de fragmentos (Hardarson et al., 2002).

La **compactación** celular es otro evento dinámico que ocurre en el desarrollo embrionario. Estudios de time-lapse muestran que la compactación temprana (antes de 8 células) es indicador de baja probabilidad de desarrollo óptimo a D+5 (18,8% tasa de blastocisto de buena calidad), y está relacionada con mayor número de células multinucleadas, debido a la asincronía en la división celular por fallos en la citocinesis (Iwata et al., 2014). El 86,1% de embriones comienzan a compactar a partir de 8 células, y es en este estadio donde más frecuentemente comienza (22,6%). La tasa de blastocisto de buena calidad en este grupo de embriones es de un 49.5%.

Con este nuevo método para evaluar calidad embrionaria, se pueden también abordar otros aspectos de la morfología que hasta ahora eran relativamente complicados de valorar, debido por un lado a su aparición en momentos muy puntuales del desarrollo, y por otro a que su comportamiento dinámico los hace difíciles de clasificar correctamente. En este trabajo vamos a analizar dos de estos nuevos aspectos: la **contracción del blastocisto** y la **aparición de vacuolas**.

1.5- NUEVOS ASPECTOS DEL DESARROLLO: CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO.

Los blastocistos se clasifican en función del grado de expansión de la cavidad o blastocele y de la calidad morfológica de las células de la Masa Celular Interna (MCI) y del Trofoectodermo (TF). En la TABLA 2 se muestra la clasificación recomendada por la ESHRE.

	GRADO	CLASIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN	
Estado de desarrollo	1		Temprano	
	2		Blastocisto	
	3		Expandido	
	4		Hatched/hatching	
MCI	1	BUENA	Prominente, fácilmente distinguible. Con muchas células compactadas y muy unidas entre sí	
	2	MEDIA	Facilmente discernible, con muchas células unidas pero no tan compactas	
	3	POBRE	Difícilmente discernible, con pocas células	
TF	1	BUENA	Muchas células que forman un epitelio cohesionado	
	2	MEDIA	Pocas células que forman un epitelio menos cohesionado	
	3	POBRE	Muy pocas células	

TABLA 2. Clasificación de blastocistos según Grupo Interés Embriología ESHRE (Balaban et al. 2011).

Esta clasificación está tomada de la que inicialmente sugirieron Schoolcraft y Gardner, que contemplan además dos grados más en función del estado de expansión: los **blastocistos tipo 5**, o haciendo hatching (BHi) son aquellos en los que la cavidad o blastocele es mayor que el volumen original del embrión, y el TF se hernia a través de una brecha en la zona pelúcida (ZP); y los **blastocistos tipo 6**, o blastocistos hatched son aquellos en los que el blastocisto ha salido completamente de la ZP.

En el último Cuaderno de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) de Criterios de Valoración Morfológica de Ovocitos, Embriones

Tempranos y Blastocistos Humanos, también se propone una clasificación similar pero utiliza letras en lugar de números (TABLA 3).

D+4	D+5			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta (MC)	Desde: "Iniciando la expansión"	A	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
	Hasta: "Eclosionando"	B	A	A
			B	B
			C	C
			D	D
	C	C	A	A
			B	B
C			C	
D	D	A,B,C o D	D	
		D	D	
Blastocisto temprano o cavitado (ZP gruesa)				C
Mórula no compacta	Mórula			D

CATEGORÍA	TAMAÑO MCI (µm ²)	COHESIÓN
A	3800-1900	Compacta
B	3800-1900	No compacta
C	1900	Indiferente
D	Signos de degeneración	
Excluidos	Degenerada	

CATEGORÍA	DESCRIPCIÓN DEL TF
A	Homogéneo, cohesionado y muchas células
B	Homogéneo, menos células
C	Pocas células
D	Signos de degeneración
Excluidos	Degenerado

TABLA 3. Clasificación embrionaria de blastocistos según ASEBIR (*Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos* | Asebir 2015)

En la FIGURA 5 se pueden ver algunos ejemplos de clasificación de blastocistos.

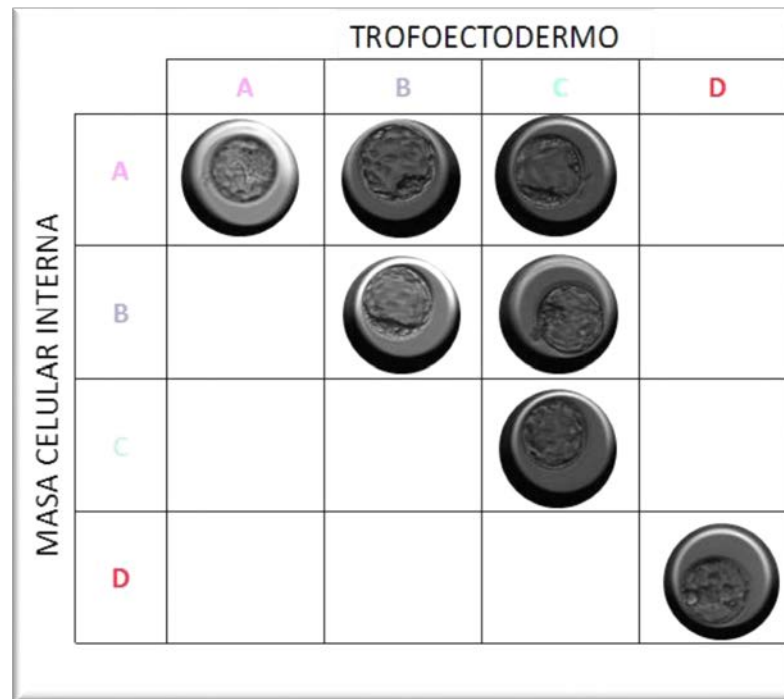


FIGURA 5. Ejemplos de clasificación de blastocistos. Fotografías tomadas en IVI Zaragoza.

1.5.1- FORMACIÓN DEL BLASTOCISTO.

La formación del blastocisto está regulada por la expresión de varias familias de genes específicas que codifican polaridad y uniones celulares, citoesqueleto y canales transportadores de iones y agua, y cuyo primer objetivo es la diferenciación de las células periféricas del embrión para constituir el TF, primer epitelio del desarrollo embrionario (Watson et al, 2004).

Así, el primer evento importante en este proceso es la compactación en el estadio de mórula. Se caracteriza por una mayor superficie de contacto célula-célula debido al aumento de las uniones adherentes (cadherinas), desmosomas y tight junctions. Las **cadherinas** son proteínas transmembrana mediadas por Ca^{2+} , que se unen en su porción extracelular a dímeros semejantes de las células adyacentes, y en su porción intracelular a los filamentos de actina del citoesqueleto mediante otras proteínas, las cateninas. De este modo, la adhesión entre células es más fuerte.

A partir de aquí, en las células periféricas del embrión comienzan a proliferar todavía más los complejos de unión, y se incrementan los canales de transporte de iones, como el mediado por la enzima Na^{+}/K^{+} -ATPasa, que intercambia Na^{+} intracelular por K^{+} extracelular, manteniendo la presión osmótica y el potencial eléctrico de membrana. Se cree

que estas bombas ayudan a la formación del blastocisto aumentando la concentración salina y favoreciendo por tanto la introducción de agua mediante ósmosis (Baltz et al. 1997). En este momento, pequeñas cavidades de fluido semejante al del espacio perivitelino se van formando entre las células periféricas y las centrales.

En los últimos años, otro sistema de introducción de agua se está postulando como fundamental para la formación del blastocelo. Es el facilitado por las **Acuaporinas (ACP)**, o canales de agua, y está formado por una familia de pequeñas proteínas integrales de membrana, que facilitan el paso rápido y pasivo de grandes cantidades de agua (Watson et al, 2004; Xiong et al. 2013). Además, ACP3 y ACP7 regulan también el transporte de glicerol, sustrato necesario para la glicolisis y la producción de ATP.

1.5.2- ECLOSIÓN O HATCHING.

La palabra eclosión o “hatching” hace referencia al proceso in vitro mediante el cual, el fluido de la cavidad va aumentando a medida que lo hace el número de células, y la combinación de estas dos características provoca el aumento progresivo de tamaño del blastocisto, con el consecuente y progresivo adelgazamiento de la ZP y su ruptura en un punto, probablemente facilitada por la acción de alguna enzima. El embrión se extruye a través de este orificio, dejando la ZP intacta (Vajta et al, 2010). Esta secuencia de eventos durante el hatching in vitro ha sido descrita en numerosas especies, incluyendo el ratón (Cole 1967), vaca (Massip y Mulnard 1980; Niimura et al. 2010), mono y humano (Seshagiri et al. 2009).

Se puede decir, pues, que hay dos mecanismos que ocurren paralelamente para conseguir la eclosión del blastocisto: una acción enzimática y otra mecánica.

1.5.2.1- ACCIÓN ENZIMÁTICA.

A diferencia de otras especies animales comentadas anteriormente, el hatching de los embriones de hámster es relativamente diferente: los blastocistos expandidos se contraen y la ZP sufre un adelgazamiento gradual, seguido por un proceso de disolución global que concluye cuando desaparece totalmente (Gonzales y Bavister 1995). Esta disolución completa de la ZP indica que hay factores de lisis producidos por el embrión, independientemente de que también haya proteasas uterinas que actúen in vivo, como las catepsinas (Sireesha et al. 2008).

Las células del TF poseen proyecciones citoplasmáticas (TEPs) que están en contacto directo con la ZP y se han encontrado también en otras especies, como en humanos. La función de las TEPs no está clara. Se piensa que juegan un papel importante

en el punto de extrusión, puesto que el foco inicial de lisis en los embriones de hámster ocurre en la parte de la ZP asociada a TEPs. Podrían funcionar como transportadoras y liberadoras de las lisinas que degradan la ZP (Seshagiri et al. 2009).

1.5.2.2- ACCIÓN MECÁNICA. CICLOS DE CONTRACCIÓN Y EXPANSIÓN.

Como se ha indicado anteriormente, la presión mecánica al formarse el blastocele y aumentar el volumen del blastocisto hace que la ZP adelgace, favoreciendo así el hatching. Sin embargo, no es el único proceso físico que ocurre. Los ciclos de **contracción y expansión del TF** parece ser que también ayudan al afinamiento de la ZP y extrusión del embrión, aunque es cierto que no en todos los blastocistos ocurre, y en unas especies parecen ser más importantes que en otras.

La presencia de contracción en blastocistos de mamífero fue reportada por primera vez por Lewis y Gregory. Monitorizaron blastocistos de conejo en cultivo durante 8 días por cinematografía time-lapse, y encontraron que los blastocistos se contraían y re-expandían de forma repetida durante todo el tiempo de observación, excepto en el estadio de blastocisto temprano. (Lewis y Gregory 1929).

Utilizando el sistema de video time-lapse se ha podido constatar que un elevado número de embriones que alcanzan el estadio de blastocisto experimentan una o más contracciones del blastocele, produciendo una separación total o parcial entre las células del trofoectodermo y la ZP (Cole 1967; Glass et al, 1973; Massip y Mulnard 1980; Niimura 2003; Niimura et al. 2010)

Se ha visto que en el ratón, al igual que en el conejo, el proceso de hatching va acompañado de una serie de contracciones y expansiones (Cole 1967). Al igual que en blastocistos humanos, la contracción es muy rápida, sólo ocupa unos 4-5 minutos, mientras que la expansión dura unas 2-3h. Los mismos resultados se obtuvieron al colapsar embriones in vivo y medir el tiempo de contracción y expansión (Glass et al, 1973). Los blastocistos de ratón se contraen entre 4 a 15 veces durante 18 h en cultivo, con la peculiaridad de que una contracción fuerte, que oculta el blastocele por completo, va precedida de 3 ó 4 contracciones más débiles (Cole 1967).

Estos resultados se corresponden con los obtenidos por Niimura et al (Niimura 2003). Los datos de time-lapse muestran que los blastocistos de ratón sufren repetidas contracciones de diferente grado de intensidad, durante el estadio de BE desde las 10 horas tras a la formación del blastocele, siendo el número de contracciones mayor durante el proceso de hatching. El tiempo requerido de re-expansión es mayor cuanto más fuerte es la contracción. Niimura distingue dos tipos de contracción: una débil (menor del 20% del

volumen del embrión) y otra más fuerte (mayor del 20%). Aquellos blastocistos que sufren consecutivas contracciones débiles eclosionan en su mayoría. Sin embargo, los que sufren contracciones fuertes o colapsos no consiguen extruir de la ZP. Estos autores concluyen que las contracciones débiles juegan un importante papel en el proceso de eclosión embrionario, mientras que las fuertes lo inhiben.

El tiempo de las contracciones débiles oscila entre 30 segundos a 6 minutos, mientras que el de las fuertes ocurre entre 20 segundos a 16 minutos. Los tiempos de re-expansión van de 75-440 min en las primeras y de 299-560 minutos en las segundas. Es decir, cuanto más grande es la contracción más tiempo se necesita para la expansión posterior, y probablemente más energía se consume, disminuyendo posiblemente la capacidad del embrión de eclosionar.

1.5.3- MECANISMOS PROPUESTOS DE CONTRACCIÓN Y EXPANSIÓN.

Los mecanismos celulares por los que se producen los ciclos de contracción y re-expansión de los blastocistos están por dilucidar. No parecen ser dependientes de la ZP, puesto que también ocurren en embriones a los que se ha retirado esta capa protectora de forma artificial (Cole 1967). Los procesos que en un principio se propusieron fueron: arrastre pasivo de agua, electro-ósmosis y pinocitosis (Mohr y Trounson 1982).

La **contracción** del blastocisto es un proceso rápido, que ocurre en minutos, siendo la pérdida de agua al menos 50 veces más rápida que la ganancia. Se ha sugerido que esta disminución repentina de líquido puede ser debida a un desgarro del blastocisto, pero semejante rotura no se ha descrito. Si los responsables son las bombas de iones, una brusca despolarización de la membrana celular podría justificar la salida masiva de fluido (Cole 1967). Los mismos autores sugieren que la señal para comenzar la contracción del blastocisto ocurre cuando las células del TF alcanzan una ratio superficie/volumen crítico. No se sabe sin embargo, si la pérdida de agua se realiza a través o entre las células.

Estudios de microscopía electrónica confirman la formación de crestas intercelulares entre las células del TF, también en blastocistos humanos (Mohr y Trounson 1982), y la presencia de tight junctions y desmosomas. Sin embargo, en el caso de blastocistos contraídos de ratón, se observan depresiones en las superficies de contacto entre dos células del TF, y las crestas intercelulares no aparecen (Niimura 2003). Esta pérdida de adhesión célula-célula podría ser otra causa de contracción, al favorecer la salida de fluido del blastocele.

La contracción de células endoteliales es inducida por la activación de **miosina de cadena ligera kinasa (MLCK)**, modulada por el calcio. En blastocistos de ratón, el cultivo

en presencia de un inhibidor de esta enzima produce mayor número de contracciones fuertes y un número menor de débiles cuando se compara con el grupo control, siendo además la tasa de blastocistos hatched significativamente menor (18,7% vs 43,3%, $p < 0,05$) (Niimura 2003). Se deduce por tanto que la permeabilidad entre las células del TF aumenta debido a la retracción de las mismas por la acción de actina y miosina, lo que provoca un flujo de salida del fluido de la cavidad, favoreciendo la contracción del blastocisto. No parece que la división celular de las células del TF sean las causantes de las contracciones, puesto que el ratio de división es mayor en el periodo pre-hatching.

Se sabe que los **filamentos de actina** presentes en el citoesqueleto son los responsables de la motilidad celular. En el caso de los blastocistos expandidos, la modificación de estos filamentos provoca la variación de la forma esférica de las células del TF a tubular, favoreciendo el movimiento (Lu et al. 2012).

El papel de los filamentos de actina y en las contracciones del hatching de embriones de ratón ha sido estudiado al cultivar embriones hasta el estadio de blastocisto en presencia de un inhibidor de Protein Kinasa A (PKA), que favorece la agrupación de los filamentos de actina en el citoplasma cortical (Suzuki y Niimura 2010). La tasa de blastocisto hatched fue significativamente menor que en el grupo control (17,2% vs 76,7%, $p < 0,05$), al igual que el porcentaje de los embriones que iniciaron hatching (21,9% vs 90,6%, $p < 0,05$). También el tiempo necesario para la formación de la abertura en la ZP (27,4h vs 6,5h, $p < 0,05$) y la consecución del hatching (43,3h vs 18,8h, $p < 0,05$) fue estadísticamente mayor en el grupo test.

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al número de contracciones fuertes en ambos grupos, pero sí en cuanto a las débiles, que fueron menores en el grupo tratado con inhibidor de PKA (4.19 veces frente a 2.41, $p < 0,05$).

La distribución de los filamentos de actina en las células del TF fue similar en ambos grupos; sin embargo, solamente un 12,7% de blastocistos del grupo test presentó marcaje fluorescente en la mayoría de sus células, frente a un 95% en el grupo control.

Estos resultados sugieren que los movimientos mediados por los filamentos de actina de las células del TF contribuyen a la eclosión del embrión, facilitando la protrusión a través del orificio de la ZP. Y que la escasa capacidad de los blastocistos tratados con inhibidores de actina de hacer hatching está relacionada con la menor frecuencia de las contracciones débiles, y con el mayor tiempo necesario para re-expandirse tras las contracciones fuertes.

El control del **calcio intracelular** (Ca^{2+}) también juega un papel importante en el movimiento de las células del TF. Los canales de K^+ de Pequeña Conductancia activados

por el Ca^{2+} (SK), y más concretamente el tipo SK3, median la motilidad celular incrementando la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), activando así las rutas de ensamblaje de actina. Se ha estudiado que SK3 se expresa en blastocistos humanos, y que sus niveles son mucho menores en blastocistos que no han hecho hatching frente a los que sí, sugiriendo que estos canales son fundamentales para la eclosión (Lu et al. 2012). De hecho, el proceso de hatching se bloquea en embriones de ratón tras la inhibición de SK3, mientras que la división embrionaria y la formación de blastocistos no se ve afectada. Por otro lado, estudios de inmunofluorescencia muestran que la localización de la proteína SK3 en el BE se encuentra mayoritariamente en la membrana celular del TF. El aumento en la conductancia de las células del TF en respuesta al aumento en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se debe a la activación del canal SK3, responsable de la salida de K^+ y de la hiperpolarización de la membrana. Esta salida de K^+ conlleva una salida de agua, y causa una disminución de volumen celular, que permite la retracción del extremo final de las células que migran (Lu et al. 2012).

La **re-expansión** del blastocisto, sin embargo, es un proceso lento, que suele tardar horas. En este caso, se produce una activación de los mecanismos fundamentales para la captación de agua, comunes a muchos embriones de mamífero. Estudios en conejo sugieren que la entrada de agua se produce por transporte activo, y por tanto secundario al movimiento de solutos (Cole 1967).

En este sentido, estudios realizados con inhibidores de transporte de Na^+ muestran que el tiempo de re-expansión es significativamente mayor que en los controles, por lo que hay una relación clara con el equilibrio osmótico y la polaridad de membrana (Niimura 2003). También la actividad de Na^+/K^+ -ATPasa es mayor en blastocistos contraídos que en expandidos, por lo que se deduce que la re-expansión ocurre por transporte activo y acumulación de Na^+ desde el TF al blastocele. Se piensa también que el Na^+ necesario para la re-expansión es transportado al interior de las células del TF a través de canales de Na^+ mediante el intercambio Na^+/H^+ desde el exterior del blastocisto (Niimura 2003).

1.5.4- RESUMEN.

La eclosión o “hatching” del blastocisto ocurre mediante dos mecanismos descritos en diferentes especies animales: la actividad enzimática y la contracción mecánica.

En la especie humana, el proceso de contracción no ocurre en todos los embriones, ni la intensidad de las contracciones es la misma. Así como el tiempo de contracción es muy rápido, la re-expansión suele tardar horas. No se conocen exactamente los mecanismos por los que ocurre este proceso, aunque se sospecha que la pérdida repentina de líquido del

blastocite puede ser debida a una brusca despolarización de la membrana y a la intervención de diferentes canales de iones, así como a la activación de miosina de cadena ligera y de los filamentos de actina.

No se conoce con exactitud la repercusión en la calidad embrionaria ni en las posibilidades de implantación de los embriones que se contraen durante el tiempo previo a la eclosión, aunque estudios realizados en ratón sugieren que las contracciones fuertes suponen un mayor gasto de energía y pueden afectar al desarrollo posterior.

1.6- NUEVOS ASPECTOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO: VACUOLAS

En el citoplasma de las células eucariotas se encuentran una serie de orgánulos delimitados por membranas internas, física y químicamente diferentes entre sí. Cada uno de ellos desempeña una serie de labores específicas y esenciales para la correcta funcionalidad de la célula.

Las vacuolas son uno de estos orgánulos con membrana. El término genérico “vacuola” se debe a su morfología transparente, hidrófila, que hace que parezca “vacía” (Wada, 2013). Sin embargo, a lo largo de la bibliografía se describen numerosos tipos y tamaños de vacuolas dependiendo de su origen, función y contenido. También se utiliza indistintamente el término vesícula y vacuola, aunque generalmente el primero se refiere a vacuolas de pequeño tamaño (de aproximadamente 0.5-1 μm).

Son orgánulos muy abundantes en la mayoría de las células vegetales, donde ocupan más del 90% del volumen celular, y en hongos.

Sin embargo, en células animales su tamaño es generalmente menor, aunque se han observado grandes estructuras vacuolares en tejidos altamente diferenciados, como el endodermo embrionario y el epitelio de absorción. Las vacuolas están implicadas fundamentalmente en los procesos de **transporte y digestión intracelular** (Wada, 2013).

Aunque las proteínas de transporte permiten el paso a través de las membranas celulares de un gran número de pequeñas moléculas polares, cuando se trata de macromoléculas como proteínas, polinucleótidos o polisacáridos, la célula tiene que “envolverlas” en vesículas/vacuolas, que se fusionan con la membrana plasmática para liberarlas al exterior (**exocitosis**), o introducirlas dentro de la célula (**endocitosis**) mediante el proceso inverso: la sustancia que debe ser ingerida se rodea progresivamente por una pequeña porción de membrana, que se invagina formando una vesícula/vacuola intracelular, y va madurando a medida que viaja a través del citoplasma, interaccionando además con otros orgánulos (FIGURA 6). Durante este proceso, las partículas ingeridas son

almacenadas o metabolizadas para conseguir los metabolitos y/o la energía suficiente que mantenga la viabilidad celular.

En función del tamaño de la vesícula formada se distinguen dos tipos de endocitosis: **pinocitosis**, o introducción de líquidos y solutos mediante pequeñas vacuolas, que se realiza de forma indiscriminada y **fagocitosis**, o ingestión de macropartículas en vacuolas de mayor tamaño. Hay un tercer tipo denominado **endocitosis mediada por receptor**, donde las moléculas se tienen que unir de forma específica a un receptor de membrana para introducirse dentro de la célula. (Alberts et al, 1987).

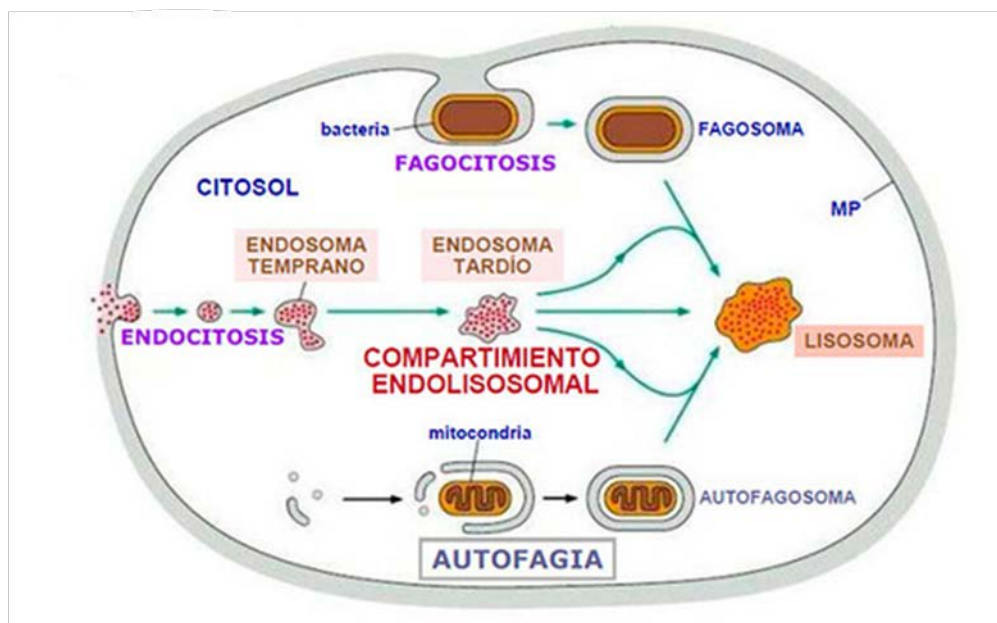


FIGURA 6. Procesos de endocitosis en la célula.

Un rasgo importante en este tipo de transporte es que las macromoléculas excretadas o ingeridas no se mezclan con otras macromoléculas o con los orgánulos de las células, puesto que se hallan confinadas en las vacuolas de transporte. Además, es un proceso dirigido, ya que cada vesícula se fusiona sólo con estructuras específicas de la membrana, asegurando así una transferencia correcta entre el exterior e interior celular. De hecho, algunas células almacenan los productos sintetizados en vacuolas secretoras, que solamente se liberan al exterior ante una señal extracelular determinada.

Un proceso muy similar ocurre entre compartimentos de una misma célula: en ese caso, las vesículas se forman por gemación a partir del Retículo Endoplasmático (RE) o del Aparato de Golgi (AG) y se fusionan con la membrana del orgánulo diana.

Dado que se sospecha que la presencia y formación de vacuolas visibles por microscopía óptica en los ovocitos y embriones se debe mayoritariamente a procesos de

endocitosis (Van Blerkom & Henry, 1992; Van Blerkom, 1990; Zamboni & Thompson, 1972), la revisión bibliográfica de este capítulo se va a basar en revisar dichos procesos.

1.6.1- ENDOCITOSIS MEDIADA POR RECEPTOR.

La vía endocítica mediada por receptor más caracterizada es la que utiliza la proteína **clatrina** para formar una cubierta poliédrica característica alrededor de las macromoléculas unidas a su receptor de membrana. Una vez esta vesícula se escinde al citosol gracias a la colaboración de una GTPasa llamada **dinamina** (y ocasionalmente a la actina citoplasmática), pierde su revestimiento de clatrina y sufre una serie de procesos madurativos, tanto en tamaño y morfología como en contenido, que le dan diferentes nombres: desde **Endosoma Temprano (EE Early Endosome)**, a **Cuerpo Multivesicular (MVB, Multivesicular Body)** o forma intermedia, y finalmente **Endosoma Tardío (LE, Late Endosome)**. A partir de aquí se pueden fusionar con **lisosomas** (Alberts et al, 1987) en zonas perinucleares. Durante este proceso el contenido de la vacuola endocítica se acidifica gradualmente, hasta que las enzimas hidrolíticas de los lisosomas terminan de metabolizar su contenido.

En el proceso de maduración del endosoma, las **proteínas RAB** (pequeñas GTPasas), junto con un tipo de lípidos, los **fosfoinosítidos (FIs)** crean subdominios altamente específicos, otorgando "identidad" a la membrana endosómica. De hecho, actúan como reguladores de las diferentes etapas de maduración y transporte. Así, el fosfatidil inositol 3-fosfato (**FtdIns(3)P**) es fundamental en los procesos endocíticos tempranos, por lo que su presencia es muy abundante en EE, mediada por la actividad de la fosfatidil inositol 3 kinasa (**PI3K**) (Wada, 2013). La **RAB-5** es la proteína característica del endosoma temprano.

La modificación de FtdIns(3)P mediante la fosfatidil inositol 3 fosfato 5 kinasa (PIP3K), que añade otro fosfato en la posición -5, forma el fosfatidil inositol 3,5 bifosfato (**FtdIns(3,5)P₂**), fundamental en los pasos posteriores de endocitosis. Esta reacción enzimática causa pérdida de RAB 5 entre otras proteínas, y favorece la acumulación de **RAB 7**, formándose el LE, que adquiere forma redonda u ovalada y aumenta de tamaño. Es decir, durante la maduración del endosoma, hay un intercambio progresivo de RAB-5 por RAB-7 (Wada, 2013). Otra característica del LE es que adquiere los complejos de anclaje para fusionarse con lisosomas o autofagosomas.

La especificidad de la fusión entre las membranas de diferentes compartimentos está controlada, principalmente, por las proteínas SNARE (*N-ethylmaleimide sensitive factor accessory-protein*, *SNAP*, *receptors*) (Wada, 2013), que son las responsables del anclaje y

la fusión de las vacuolas con su membrana diana. Las SNARE son proteínas integrales de membrana. En cada vacuola existe una proteína llamada v-SNARE (debido a su origen vesicular), que se une a las t-SNARE (target) de las membranas diana, formando unos complejos conocidos como *trans*-SNARE, los cuales inmovilizan, acercan y median la unión de las membranas involucradas. Se conoce como HOPS (*homotypic fusión and vacuole protein sorting*) al complejo involucrado en los procesos de anclaje de membrana, modulación de las RAB, y SNARE.

1.6.1.1- ALTERACIONES EN ENDOCITOSIS.

Las alteraciones de los procesos endocíticos en células de mamífero, tanto a nivel génico como proteico, lipídico y enzimático, se traducen generalmente en disfunciones en la formación de endosomas, deficiencias en la maduración de los mismos, y dificultad para fusionarse entre sí o con otras membranas, lo que provoca la acumulación de vacuolas de diferentes tipos y tamaños.

A nivel lipídico, estudios realizados en monocapas de células hepáticas incubadas con **inhibidores de la FtdIns(3)P**, característico de los endosomas tempranos, muestran la supresión de la proliferación celular y la formación de grandes vacuolas de hasta 20 μm , aparentemente vacías, que son concentración y tiempo de incubación dependientes (Matsunaga et al., 2008). También se aprecian pequeñas vesículas de unas 2 μm de diámetro, con partículas citoplasmáticas degradadas en su interior, que los autores sugieren podrían ser autolisosomas. Los procesos de fusión entre vacuolas de diferente tamaño son visibles mediante microscopía electrónica (ME).

La **pérdida** de la **enzima** responsable de la conversión de FtdIns(3)P a FtdIns(3,5)P₂, **PIP3KIII**, que modula la maduración de endosomas tempranos a endosomas tardíos, también altera gravemente la función endosómica. Uno de los fenotipos derivados de esta carencia es de nuevo la aparición de grandes vacuolas (Wada, 2013).

En cuanto a las proteínas implicadas en la maduración y organización de los endosomas, la alteración del **complejo HOPS** en levaduras tiene como resultado la fragmentación de grandes vacuolas y la deslocalización de proteínas vacuolares (Wada, 2013) (FIGURA 7). Estudios realizados en ratones knock-out para genes que regulan este proceso (*mVam2* o *rab 7*) concluyen que la carencia de estos factores de ensamblaje implica la muerte temprana en estadio de peri-gastrulación. Experimentos similares realizados en fibroblastos embrionarios muestran defectos severos en el transporte endocítico.

Alteraciones en los **lisosomas** también provocan acumulación de vacuolas en muchos tejidos, como hígado, páncreas, músculo y corazón en ratones deficientes de **LAMP-2** (proteína de membrana marcadora de lisosomas) (Matsunaga et al., 2008). También la sobreexpresión de **LGP85**, otra proteína lisosomal produce grandes vacuolas que podrían derivar de la fusión entre varios EE y LE respectivamente y de su unión final con lisosomas.

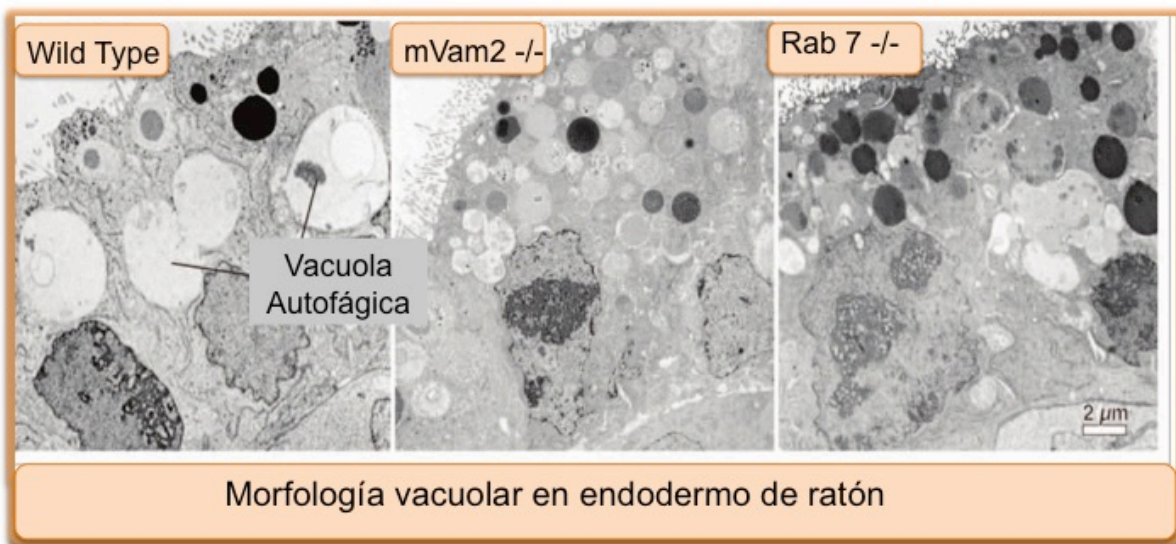


FIGURA 7. Morfología vacuolar en endodermo de ratón (Wada, 2013)

1.6.1.2- ENDOCITOSIS Y REPRODUCCIÓN.

La endocitosis supone un proceso imprescindible para el correcto funcionamiento de todas las células animales, y en el caso de las células reproductoras no es una excepción.

Estudios realizados en embriones de ratón han demostrado que la inhibición de **Dinamina 2** (GTP-asa implicada en la endocitosis mediada por receptor, así como en citocinesis en mitosis y migración celular) provoca bloqueo embrionario de 2 a 4 células, y de 8 células a mórula y blastocisto (Wang et al., 2015).

Durante la fecundación del óvulo se produce una importante reorganización de material citoplasmático y nuclear. En un primer momento, los cigotos dependen de las proteínas y mRNA maternos, pero después comienzan a expresar sus propios genes. Es entonces cuando el material propio del ovocito, como algunas proteínas de membrana, sufre un proceso de endocitosis mediada por clatrina y es degradado por lisosomas antes de la primera división mitótica (Sato & Sato, 2013). Utilizando *Caenorhabditis elegans* (*C. Elegans*) como modelo, estos autores encuentran que la mayoría de los procesos de endocitosis de ovocitos parecen tener una función de acúmulo de sustancias nutritivas, más

que de degradación de productos. Sin embargo, tras la fecundación, la actividad endocítica unida a lisosomas aumenta espectacularmente.

Estudios de microscopía confocal y electrónica realizados en blastocistos de ratón in vitro han demostrado que la incubación de los mismos durante un tiempo en presencia de insulina (que promueve la síntesis de proteínas y el desarrollo morfológico) aumenta significativamente el tamaño de las vesículas endocíticas hasta un 56% (el tamaño inicial es de unos 2,5 μm), localizándose exclusivamente además en las células de trofoectodermo (Dunlison GF1, et al, 1995).

Se sabe que los embriones de ratón introducen proteínas del suero materno mediante endocitosis no específica. Durante el estadio de blastocisto se produce un gran aumento de la actividad endocítica, registrándose un consumo de fluido extracelular equivalente a un 2.5% del volumen total del blastocisto por minuto. Es en este estadio donde el aparato endocítico del trofoectodermo madura y se organiza espacialmente desde la membrana apical. A medida que el embrión se sigue diferenciando, la endocitosis constituye un mecanismo fundamental para conseguir los nutrientes necesarios en su desarrollo dentro del útero (Dunlison GF1 et al., 1995). En este sentido, se han descrito grandes estructuras vacuolares situadas en la zona apical de las células del endodermo mediante estudios de microscopía electrónica. La carencia de proteínas del complejo HOPS o RAB 7 implica la no formación de estas vacuolas apicales, y la acumulación de formaciones de membrana que son positivas para marcadores endosómicos tempranos, pero no para LE. De hecho, el material introducido por endocitosis está bien delimitado en el citoplasma celular, pero su metabolismo es incompleto (Wada, 2013).

1.6.2- FAGOCITOSIS Y AUTOFAGIA.

Durante la fagocitosis, el **fagosoma** o vesícula que contiene la partícula fagocitada sigue un proceso de maduración en el que va adquiriendo su naturaleza digestiva. La membrana de los fagosomas recién formados es similar a la plasmática y su contenido, a los fluidos del espacio extracelular. Mediante la fusión con lisosomas va adquiriendo el pH ácido necesario para degradar las partículas ingeridas, además de enriquecer su contenido en hidrolasas ácidas (**fagosomas tardíos** y **fagolisosomas**).

Cuando la fagocitosis ocurre dentro de la célula se denomina **autofagia**. Se conocen 4 tipos de mecanismos autofágicos, dependiendo de la ruta de liberación del material citoplasmático al lumen del lisosoma (Eskelinen, 2005) :

1- Microautofagia: la propia membrana del lisosoma “secuestra” una porción del citoplasma.

2- Autofagia mediada por chaperoninas: Proteínas con una secuencia específica son transportadas desde el citoplasma al lumen lisosómico.

3- Crinofagia: Vesículas secretoras se fusionan directamente con lisosomas, degradando contenidos granulares.

4- Macroautofagia o autofagia simple: tras una determinada señal de inducción, la autofagia comienza cuando una membrana que se cree proviene del RE se va colocando alrededor de una porción de citosol y/u organelas, formando una vacuola de doble membrana que finalmente se cierra, englobándolas. Esta vacuola se llama **autofagosoma** y la membrana que la forma **fagóforo** o membrana de aislamiento de unas 0.5 μm de diámetro (Noda et al, 2009). Los autofagosomas se trasladan a la región perinuclear, donde sufren ahora un proceso de maduración que finaliza con la fusión con endosomas (**amfisoma**) y/o lisosomas (**autolisosomas**). Mientras la membrana externa continúa intacta para delimitar el proceso autofágico, tanto la membrana interna como su contenido son degradados por las hidrolasas lisosómicas y los productos resultantes son transportados de vuelta al citoplasma, donde se reutilizan para el metabolismo celular. (FIGURA 8). Este tipo de autofagia es el que se ha revisado en bibliografía.

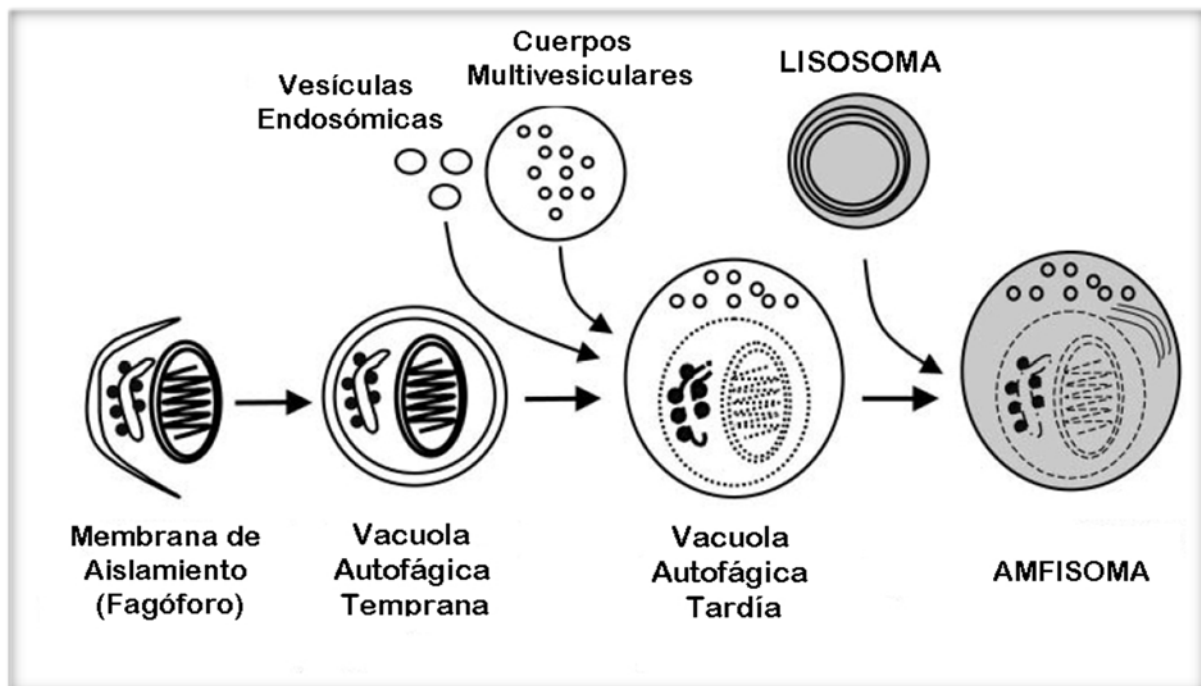


FIGURA 8. Formación y maduración de autofagosomas en células de mamífero (Eskelinen, 2005).

Mediante microscopía electrónica, las vacuolas autofágicas se distinguen porque contienen material del citosol (FIGURA 9). Morfológicamente se pueden clasificar en tempranas o tardías, dependiendo de si contienen organelas intactas o ya están parcialmente degradadas (Eskelinen, 2005).

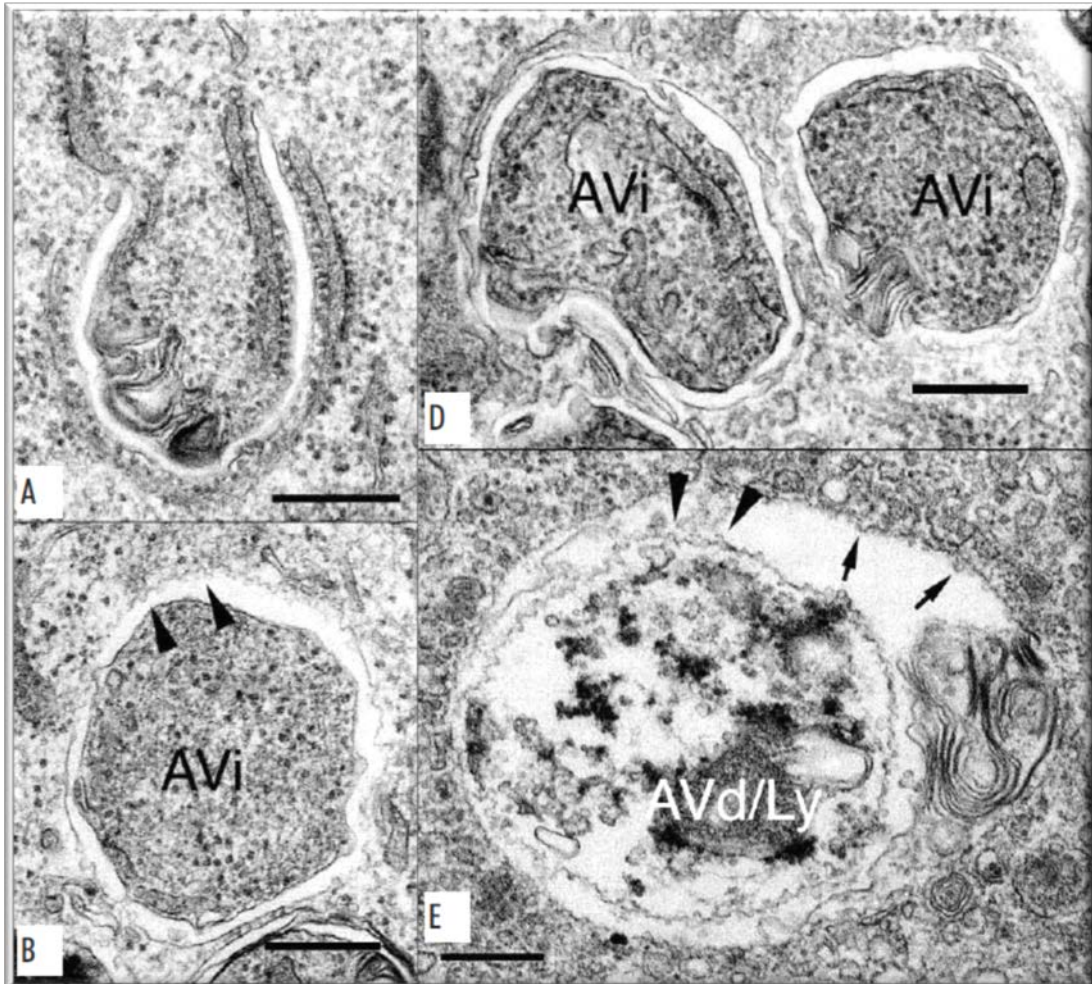


FIGURA 9. Ultraestructura de vacuolas autofágicas en fibroblastos de ratón embrionario. *AVi*: Vacuola autofágica temprana. *AVd/Ly*: Vacuola autofágica tardía. Barra: 0.4 μ m (Eskelinen, 2005).

Los principales **inductores de autofagia** en una célula son (Kanninen et al, 2013):

- Suplemento inadecuado de nutrientes y/o energía.
- Estrés metabólico.
- Hipoxia
- Insuficiencia en insulina o en factores de crecimiento.

- Componentes celulares implicados en la inducción de apoptosis (como Especies Reactivas de Oxígeno, ROS).

El principal regulador de este proceso en células de mamífero es una serina/treonina quinasa llamada **mTOR** (diana de rapamicina en células de mamífero), constituida por dos complejos multiproteicos: mTORC1 (regula síntesis de lípidos y proteínas) y mTORC2 (regula la organización del citoesqueleto). mTOR controla la disponibilidad de nutrientes y energía celular.

Una disminución en alguno de los inductores de autofagia arriba mencionados provoca el aumento intracelular del ratio AMP/ATP, y esta es la señal para que la **AMPK** (5'-AMP-proteinkinasa activada) fosforile y active **TsC2** (tuberina), que provoca una disminución en la función de mTOR y por tanto el comienzo de la autofagia, con la síntesis y activación de **proteínas Atg, LC3 y Beclin 1** (FIGURA 10), que se unen a la membrana externa del fagóforo y actúan para cerrarlo completamente (Eskelinen, 2005; Noda et al., 2009).

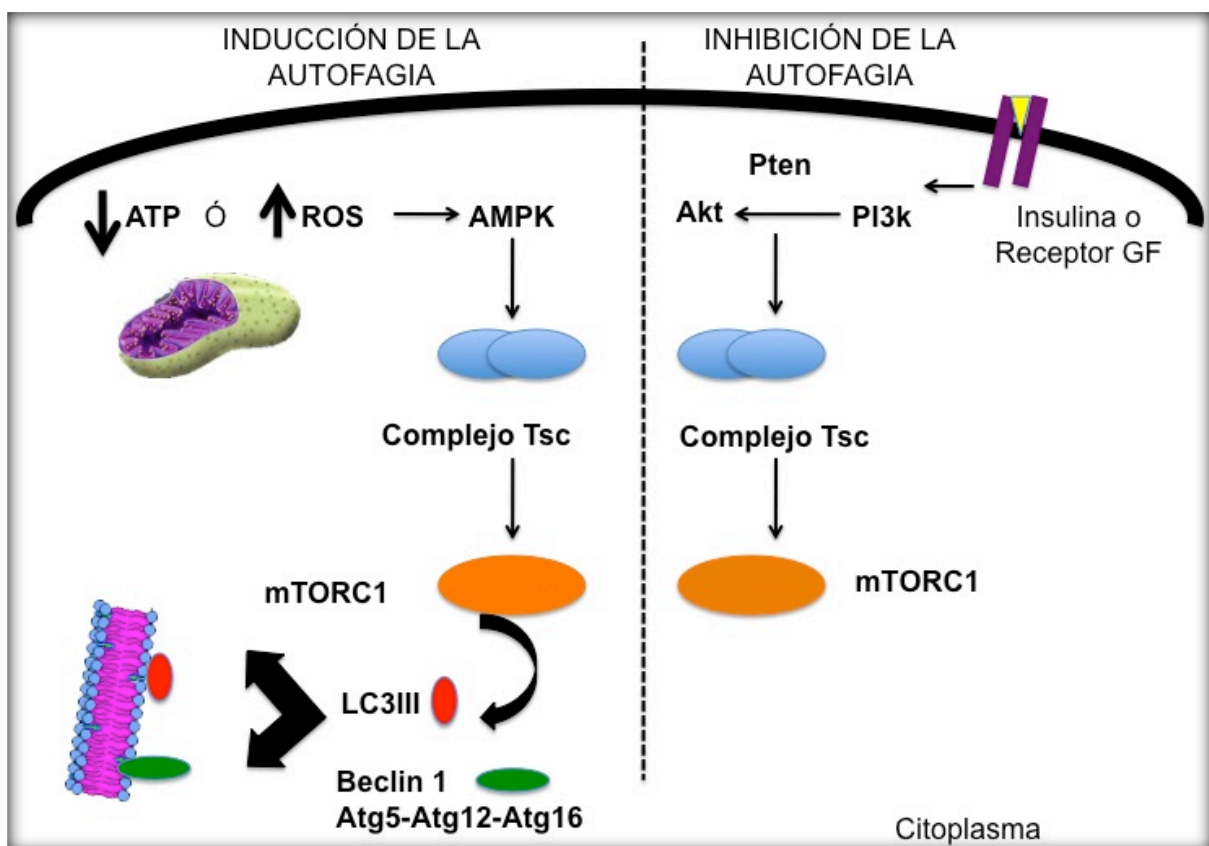


FIGURA 10. Modulación de la autofagia mediada por mTOR. (Kanninen et al., 2013).

La segunda ruta relacionada con mTOR es la mediada por la enzima **Fosfatidil Inositol 3 kinasa** (PI3K-Akt-mTOR), que se activa ante la presencia de insulina y factores

de crecimiento, los cuales favorecen la proliferación y crecimiento celular. Una segunda proteinkinasa llamada **Akt** (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 Akt) inhibe entonces la proteína **TsC2** (tuberina), que resulta en la activación de MTORC1 y la inhibición de la autofagia.

La biogénesis y unión del autofagosoma con otras estructuras también está regulados por el complejo HOPS (Eskelinen, 2005; Noda et al., 2009; Wada, 2013). A los genes que actúan en la codificación de proteínas para formar el autofagosoma se les conoce como Genes ATG (Autophagy Related Genes) (Lee et al, 2011).

El proceso de maduración del fagosoma es muy similar al del endosoma: hay un intercambio progresivo entre RAB-5 y RAB-7 y las proteínas SNARE son las encargadas principales de la fusión entre membranas.

Cuando el fagosoma se fusiona con el lisosoma (fagolisosoma), el pH citosólico disminuye aún más, provocando la activación de las hidrolasas ácidas que contiene y finalizando los procesos metabólicos.

1.6.2.1- ALTERACIONES EN AUTOFAGIA.

Los fallos en activación, ensamblaje y función de la ruta autofágica están implicados en un amplio espectro de enfermedades, entre las que se encuentran cardiopatías, enfermedades degenerativas, autoinmunes y cáncer.

Para las diferentes patologías asociadas a alteraciones en la formación de la membrana nuclear, los procesos autofágicos son fundamentales para degradar los componentes deficientemente formados. Los autofagosomas de estas células presentan diferentes tamaños, siendo a veces de mayor diámetro que el núcleo (5-10 μm). Estas vacuolas gigantes son relativamente raras en autofagia inducida por “hambre celular”, y se postula que se deben a que el tamaño de las moléculas a ingerir es grande (Park et al., 2009). Se han encontrado autofagosomas conteniendo material nuclear en células no cultivadas, por lo que es un mecanismo no asociado solamente a enfermedades de este tipo. Si se produce una inhibición de los procesos autofágicos la viabilidad de la célula disminuye, debido probablemente al aumento en anomalías nucleares.

Al igual que en la endocitosis, cuando se utilizan sustancias que inhiben la maduración de los fagosomas, se produce una acumulación de vacuolas en diferentes estadios madurativos, debido fundamentalmente a la interrupción en la fusión de sus membranas o a la alteración de su funcionalidad (Eskelinen, 2005).

1.6.2.2- AUTOFAGIA Y REPRODUCCIÓN.

Estudios realizados con ratones muestran que tanto la autofagia como la apoptosis están implicados en la muerte celular (Gawriluk et al., 2011) y que la primera parece constituir un mecanismo de supervivencia que mantiene la dotación de los folículos primordiales en reposo a lo largo de la vida reproductiva de la mujer, mediante la regulación de la actividad de mTORC1 (Kanninen et al., 2013). Se sabe que durante el desarrollo ovárico en neonatos, en experimentos realizados en ratón, el incremento de la actividad autofágica mediante la supresión de algunos de los factores implicados en la ruta de inhibición de mTOR, resulta en la formación de ovarios con menor número de células germinales, provocando infertilidad.

Podemos decir por tanto, que la autofagia está implicada en la supervivencia de las células primordiales germinales en el periodo prenatal y también en la reducción gradual de los folículos primordiales desde el nacimiento a la edad adulta en ratón (Lim & Song, 2014).

Teniendo en cuenta los resultados de los diferentes trabajos publicados, hay una modulación de los procesos de autofagia en función del estadio ovocitario y embrionario. Así, estudios realizados in vivo en ovocitos y embriones procedentes de ratonas transgénicas para un marcador de autofagia, el GFP-LC3 (Green Fluorescence Protein-LC3), apareadas con ratones no mutados, muestran que no hay presencia de LC3 en ovocitos MII (y por lo tanto no autofagosomas), y muy poca en aquellos no fecundados. Sin embargo, los cigotos sí presentan abundante marcaje, lo que sugiere que la fecundación es responsable de la activación de la autofagia. Sin embargo, cuando se activa la partenogénesis mediante estronio en ovocitos, la aparición de LC3 sigue un patrón similar al de los ovocitos fecundados, lo que lleva a los autores a pensar que son las oscilaciones en las concentraciones de Ca^{2+} intracelular las que podrían activar el proceso en este momento del desarrollo (Tsukamoto S1 et al, 2008). La autofagia comienza poco después de la entrada del espermatozoide, y se postula que actúa para eliminar algunas de sus organelas, como las mitocondrias (Kanninen et al., 2013). De hecho, embriones carentes de RAB-7 en *C. Elegans* transmiten mitocondrias de origen paterno y su mtDNA a la siguiente generación, demostrando que la autofagia está implicada en estos procesos de degradación en el cigoto (Sato & Sato, 2013).

Estudios realizados en embriones de ratón muestran una disminución evidente en la actividad de mTORC1 desde ovocito MII a cigoto, sugiriendo que esta podría ser la ruta que activa la autofagia. Sin embargo, encuentran que la inhibición química de mTORC1 en cigotos no implica un aumento en los procesos de autofagia, y su activación no supone tampoco un bloqueo de los mismos (Yamamoto et al, 2014), por lo que concluyen que existe una ruta específica de estimulación de la autofagia en el caso de embriones tempranos, y

sugieren la modulada por la enzima PI3K. La inhibición de esta enzima bloquea a su vez la activación de mTORC1 y por tanto favorece los procesos autofágicos.

En cuanto al desarrollo embrionario, este abundante marcaje de LC3 se mantiene hasta el estadio de 4 células (Lim & Song, 2014).

Durante el **desarrollo embrionario posterior** parece que hay un **descenso gradual** en la transcripción de genes relacionados con la **autofagia** que incluye los estadios de mórula y blastocisto. De hecho, la expresión de mRNA *Lc3* es elevada en cigoto, máxima en estadio de 2-4 células y gradualmente decrece desde mórula a blastocisto (Lee et al., 2011). El porqué de esta disminución entra dentro del campo de la especulación. Se ha sugerido que así se evita la destrucción de factores nucleares, cruciales para el desarrollo posterior, y que son liberados durante este periodo. Otra hipótesis que se maneja es que los mecanismos inmunitarios que se ponen en marcha para evitar el rechazo del embrión durante la implantación puedan modular de alguna manera los procesos metabólicos (Kanninen et al., 2013).

Por otro lado, los embriones generados por ratones knockout para las proteínas que forman los autofagosomas (Atg-5 y Beclin 1) se bloquean en el estadio de 4 a 8 células. Parece ser que hay una disminución en la síntesis de proteínas, que podría comprometer la división celular (Tsukamoto et al, 2008) y una discapacidad de eliminar células apoptóticas, aumentando los niveles de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) intracelulares y provocando por tanto la muerte celular (Kanninen et al., 2013).

A lo largo de estos años, los protocolos de cultivo en los laboratorios de FIV han evolucionado enormemente para procurar la mejor calidad embrionaria posible, y así garantizar unos buenos resultados en cuanto a gestación y tasa de niño en casa. Así, los medios de cultivo se suelen suplementar con antioxidantes para prevenir en lo posible el estrés oxidativo. La adición de inductores de autofagia podría actuar de la misma manera.

Tradicionalmente la autofagia se ha considerado una ruta destructiva de la célula. Pero nuevas investigaciones, sin embargo, apuntan a que puede tener un papel "protector", ya que anomalías de este proceso se traducen en enfermedades. De hecho, es un mecanismo de supervivencia importante durante tiempos cortos de "hambre" de la célula, puesto que mediante la degradación de algunos componentes no esenciales, obtiene nutrientes para realizar las reacciones biosintéticas vitales. Sin embargo, procesos autofágicos continuados en el tiempo conducen inevitablemente a la disminución en la viabilidad celular, por lo que hay un delicado equilibrio entre autofagia "constructiva" y "destructiva".

1.6.3- VACUOLAS EN REPRODUCCIÓN.

En la práctica clínica de un laboratorio de FIV es relativamente habitual encontrar vacuolas de múltiples tamaños y en cualquier estadio embrionario. La introducción de sistemas de time-lapse ha permitido además verificar que se trata de un proceso dinámico, puesto que hay vacuolas que aparecen y se mantienen en el tiempo, mientras que otras desaparecen con la misma rapidez con la que se han formado. También se aprecian procesos de fusión vacuolar a medida que avanza el desarrollo embrionario.

La mayoría de artículos científicos publicados que estudian vacuolas en reproducción humana se refieren a los gametos. Por tanto es difícil conocer los mecanismos por los que se originan y su repercusión real en el desarrollo embrionario e implantación. En esta parte del capítulo se revisa qué es lo que se sabe realmente de las vacuolas en reproducción.

1.6.3.1- VACUOLAS EN ESPERMATOZOIDES.

En los últimos años, una nueva técnica de ICSI permite seleccionar morfológicamente los espermatozoides a microinyectar mediante la utilización del **IMSI (Intracytoplasmic Morphologically Selected Sperm Injection)** (Bartoov et al 2001). Brevemente, la utilización de un microscopio invertido equipado con óptica Normarski de alta resolución permite examinar las organelas de los espermatozoides móviles a aumentos superiores a 6000x, y de este modo microinyectar aquellos que sean morfológicamente correctos. Uno de los parámetros que se tienen en cuenta a la hora de la selección espermática es la ausencia de vacuolas (Boitrelle et al., 2013).

1.6.3.2- VACUOLAS EN OVOCITOS.

Los dismorfismos citoplasmáticos del ovocito ocurren en los diferentes estadios de maduración perovulatoria, y pueden aumentar de forma severa tras fecundación o durante el cultivo prolongado. La presencia de vacuolas en el ovocito es uno de los dismorfismos citoplasmáticos más estudiados.

Ya en 1972 Zamboni y colaboradores (Zamboni & Thompson, 1972) estudiaron la morfología del ovocito humano durante la maduración "in vitro" de folículos procedentes de ovariectomías sufridas por diferentes desórdenes ginecológicos. En la mayoría de ovocitos analizados por microscopía electrónica, las organelas se distribuyen uniformemente a lo largo del citoplasma, aunque algunas lo hacen preferentemente en la zona perinuclear o subcortical. Así, las mitocondrias son numerosas y uniformemente distribuidas, al igual que los ribosomas, que aparecen en pequeños grupos. El RE está bien desarrollado, en forma

de túbulos cortos o sáculos irregulares, frecuentemente asociados a mitocondrias. El AG se encuentra confinado a las zonas perinucleares, mientras que los gránulos corticales se localizan casi exclusivamente en la superficie celular. En ovocitos maduros son muy abundantes y se disponen en varias capas.

Aquellos ovocitos que no completan la división meiótica presentan un patrón de degeneración donde es característica la aparición de vacuolas. Pueden ser abundantes y pequeñas o escasas y grandes, llegando a alcanzar frecuentemente el tamaño del núcleo. Estas grandes vacuolas, según el autor, están vacías de contenido y limitadas por una membrana con pocas y rudimentarias microvellosidades, y se suelen localizar en el ooplasma subcortical, liberando en ocasiones su contenido en el espacio perivitelino. El citoplasma de estos ovocitos vacuolados contiene grandes formaciones limitadas por una simple membrana con remanentes de organelas degeneradas. (FIGURA 11).

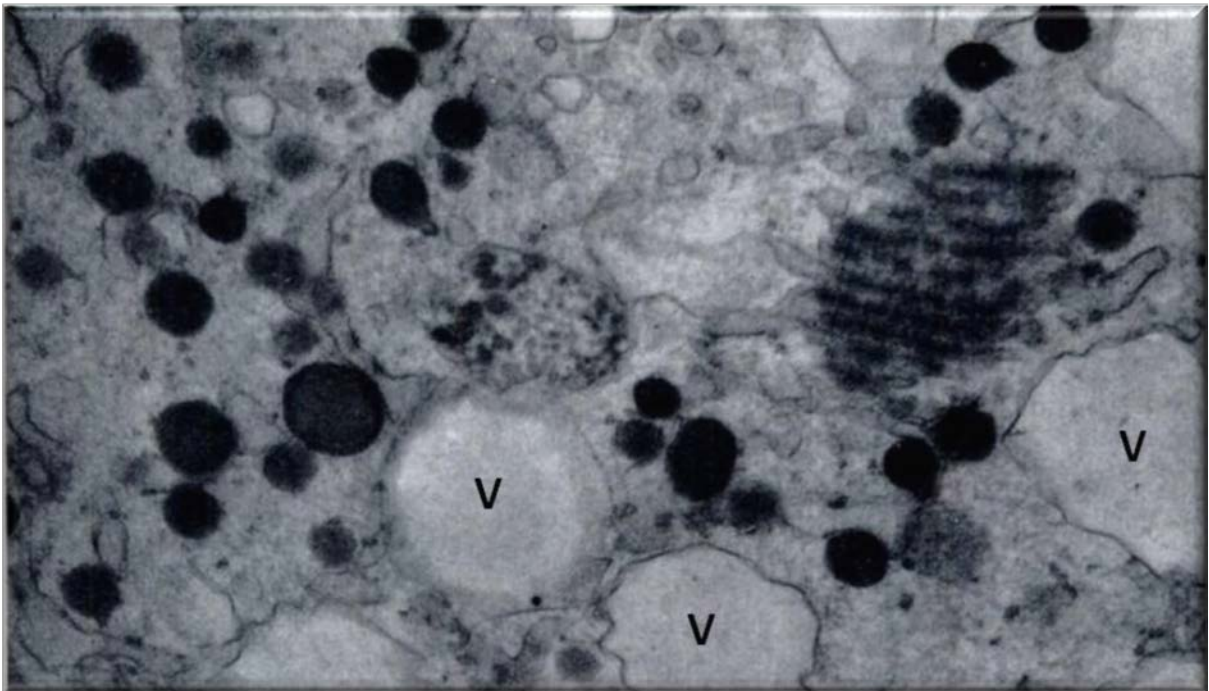


FIGURA 11. Vacuolas en ovocitos. V: *Vacuolas* (x17500). (Zamboni, L; Thompson, 1972).

Años más tarde, estudios microscópicos asocian el fallo de fecundación de FIV convencional con alteraciones en la estructura celular y organización citoplasmática de los ovocitos (Van Blerkom, 1990). Entre un 10 y un 15% de ovocitos MII presentan, entre otras, una concentración masiva de túbulos y vesículas procedentes presumiblemente del Retículo Endoplasmático Liso (REL), y una rápida internalización de fluido perivitelino mediante un proceso aberrante de endocitosis.

El análisis citogenético de aproximadamente 500 ovocitos MII (Van Blerkom & Henry, 1992) con algún dismorfismo citoplasmático, concluye que al menos la mitad de los ovocitos que lo presentan en fases tempranas de la maduración meiótica son aneuploides y su tasa de fallo de fecundación con FIV convencional es alta. Sin embargo, cuando estos defectos en el citoplasma aparecen a partir de Metafase I la tasa de anormales se equipara a la de los ovocitos MII sin dismorfismos (aproximadamente un 15%), al igual que el porcentaje de fecundación con FIV. Sin embargo, en estos casos hay un mayor bloqueo de desarrollo embrionario. Esta diferencia en frecuencia de aneuploidias se podría explicar porque las alteraciones citoplasmáticas ocurren tras la formación del huso metafásico.

También se aprecia la aparición de numerosas vacuolas endocíticas durante estadios tardíos de maduración, en particular durante el tiempo de extrusión del primer CP (Van Blerkom & Henry, 1992).

Por otro lado, se ha demostrado que la tasa de aneuploidías varía en función del tipo de alteración citoplasmática (Van Blerkom & Henry, 1992). En el caso de ovocitos vacuolados oscila entre un 3% y un 10%, al igual que en ovocitos sin dismorfismos. No parece por tanto que la presencia de vacuolas esté relacionada con una mayor aneuploidía en ovocitos, puesto que además el porcentaje de anomalías genéticas en el grupo de ovocitos dismórficos está alrededor del 30%. Sin embargo, la presencia de abundantes vacuolas hace que la tasa de bloqueo en cigoto sea elevada, debido probablemente a un fallo en establecer el plano de división adecuado o la incapacidad del citoplasma a completar la citocinesis. Los mismos autores señalan que el escaso número de ovocitos con esta característica (n=35) hace que las conclusiones a las que llegan sean algo especulativas.

Estos datos sugieren que tanto la maduración cromosómica como citoplasmática del ovocito humano, aunque se solapa en el tiempo, no tiene porqué ser dependiente una de otra, y que la formación del huso meiótico ocurre en presencia de un citoplasma anómalo, aunque en función del tipo y severidad del dismorfismo sí puede haber consecuencias en la estructura o estabilidad del mismo, originando asociaciones incompletas de los cromosomas, y por tanto un mayor riesgo de aneuploidías.

Sin embargo, para aquellos ovocitos con citoplasma vesiculado en exceso las anomalías aumentan a un 29-32% (FIGURA 12). Según estos autores, la presencia o no de dismorfismos ovocitarios es independiente del tipo de estimulación ovárica utilizada (Van Blerkom & Henry, 1992).

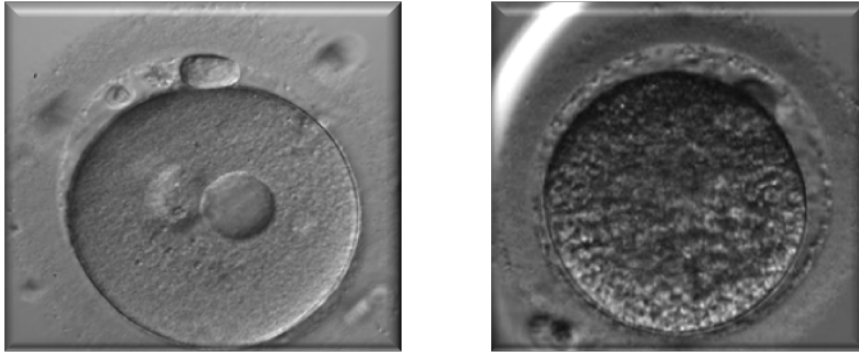


FIGURA 12. Ovocito vacuolado y vesiculado en exceso (Fotografías tomadas en IVI Zaragoza).

Numerosos artículos se han publicado estudiando la correlación entre fecundación, desarrollo embrionario e implantación de ovocitos con dismorfismos ovocitarios, especialmente desde la aparición de la microinyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), que podría de alguna manera minimizar el riesgo de fallo de fecundación en ovocitos dismórficos que se ha reportado con FIV convencional. Sin embargo, no hay muchos que hablen exclusivamente de vacuolas, y cuando lo hacen no especifican si se trata de una sola vacuola o varias, ni del tamaño de las mismas. De hecho, el porcentaje de ovocitos vacuolados varía de unos artículos a otros, desde un 12,4% (Alikani et al., 1995) hasta un 2% (Loutradis et al., 1999).

Los resultados obtenidos en cuanto a tasa de fecundación son también controvertidos: mientras unos no encuentran diferencias cuando se comparan con ovocitos citoplasmáticamente normales (Alikani et al., 1995; De Sutter, Dozortsev, Qian, & Dhont, 1996), otros sí (Rienzi et al., 2008; Rienzi, Vajta, & Ubaldi, 2011). En cuanto a la medición del tamaño de las vacuolas, se ha observado que cuando el diámetro de la vacuola en el ovocito supera los 14 μm de diámetro, la fecundación no ocurre (Ebner et al., 2005).

Los cigotos procedentes de FIV muestran significativamente menos vacuolas que los de ICSI (5.3% vs 11.6%, $p < 0.01$), aunque éstas no desaparecen durante el desarrollo posterior, mientras que el 28,6% de vacuolas detectadas en ovocitos de ICSI sí lo hacen. Ese fenómeno se atribuye a la creación de “vacuolas artificiales” derivadas de la propia técnica de ICSI, debido a la introducción de más PVP de la cuenta (Ebner et al., 2005).

Lo mismo ocurre cuando se trata de evaluar la calidad embrionaria de ovocitos vacuolados: hay artículos que establecen que la calidad embrionaria disminuye (Alikani et al., 1995; Rienzi et al., 2011) mientras que otros sostienen que no hay diferencias con

respecto a ovocitos normales (De Sutter et al., 1996; Loutradis et al., 1999; Rienzi et al., 2008).

En cuanto a las tasas de gestación e implantación, parece ser que hay una tendencia a que ovocitos dismórficos presentan tasas de gestación menores (20.8% vs 45.9% (Alikani et al., 1995) y mayor riesgo de aborto bioquímico y saco vacío. También Loutradis y colaboradores (Loutradis et al., 1999) encuentran menores tasas de gestación en ovocitos donde se combina la presencia de múltiples vacuolas, debrís en el espacio perivitelino y citoplasma oscuro (5.5% vs 29.4%). Pero ningún artículo relaciona exclusivamente gestación con vacuolas.

Por lo general, la presencia de ovocitos con una o varias vacuolas en una misma cohorte embrionaria es ocasional. Sin embargo, hay casos descritos donde esta anomalía es habitual en una paciente determinada. Fancsovits describe el caso de una pareja diagnosticada de oligoastenoteratozoospermia severa y obstrucción tubárica unilateral que se sometió a 5 ciclos de FIV/ICSI durante 2,5 años (Fancsovits et al, 2011). Se utilizaron protocolos largos de estimulación con Decapeptyl como agonista de la GnRH y FSH recombinante, obteniendo un total de 42 ovocitos, de los cuales el 32 fueron MII. 26 presentaron al menos una vacuola central, con un diámetro medio de 52.2 μm (rango 29,2-61 μm). Además de esta alteración citoplasmática, en muchos ovocitos el primer CP era alargado o fragmentado y la zona pelúcida inusualmente delgada. La tasa de fecundación global fue solamente de un 22% y la calidad embrionaria bastante pobre, pero en los 5 ciclos hubo al menos un embrión para transferir (FIGURA 13). En el último ciclo se consiguió una gestación, que resultó en un nacido vivo con doble riñón y uréter izquierdo solucionado al año mediante cirugía.

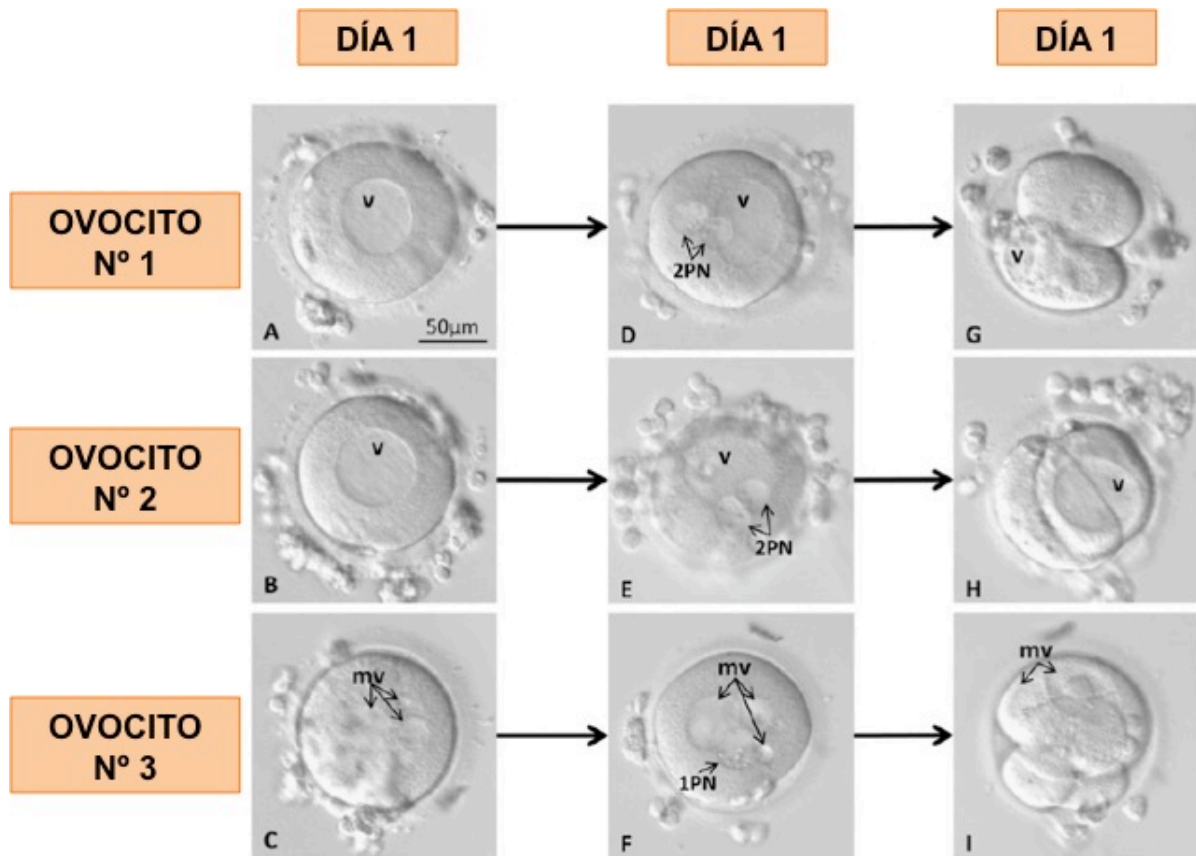


FIGURA 13. Fancsovits et al, 2011. Fotografías de la cohorte ovocitaria. *v*: Vacuola; *mv*: múltiples vacuolas; *2PN*: 2 Pronúcleos; *1PN*: 1 Pronúcleo;

1.6.3.2.1- VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS.

La **vitrificación de ovocitos** se ha incorporado recientemente a los protocolos de FIV. Para demostrar la viabilidad de esta técnica, varios trabajos han comparado la morfología de ovocitos frescos y vitrificados por ME. Los parámetros que se evalúan habitualmente son, entre otros, la aparición o no de vacuolas como marcador de viabilidad. La presencia de vacuolas mayores de 1.5 µm en ovocitos frescos es poco frecuente, y están delimitadas por una membrana continua (Palmerini et al., 2014). Sin embargo, se han encontrado hasta en un 70% de ovocitos vitrificados, frecuentemente en el área cortical, siendo su membrana discontinua. Estas vacuolas están asociadas generalmente a alteraciones en microvellosidades y Gránulos Corticales (GC), y raramente a agregados a Mitocondria-REL en el mismo ovocito (FIGURA 14). De hecho, se encuentran formaciones rodeadas de GC y con microvellosidades en su membrana interna. Otros artículos sin embargo reportan la aparición de abundantes vacuolas asociadas a REL en ovocitos y cigotos vitrificados (Isachenko et al., 2003; Khalili et al., 2012).

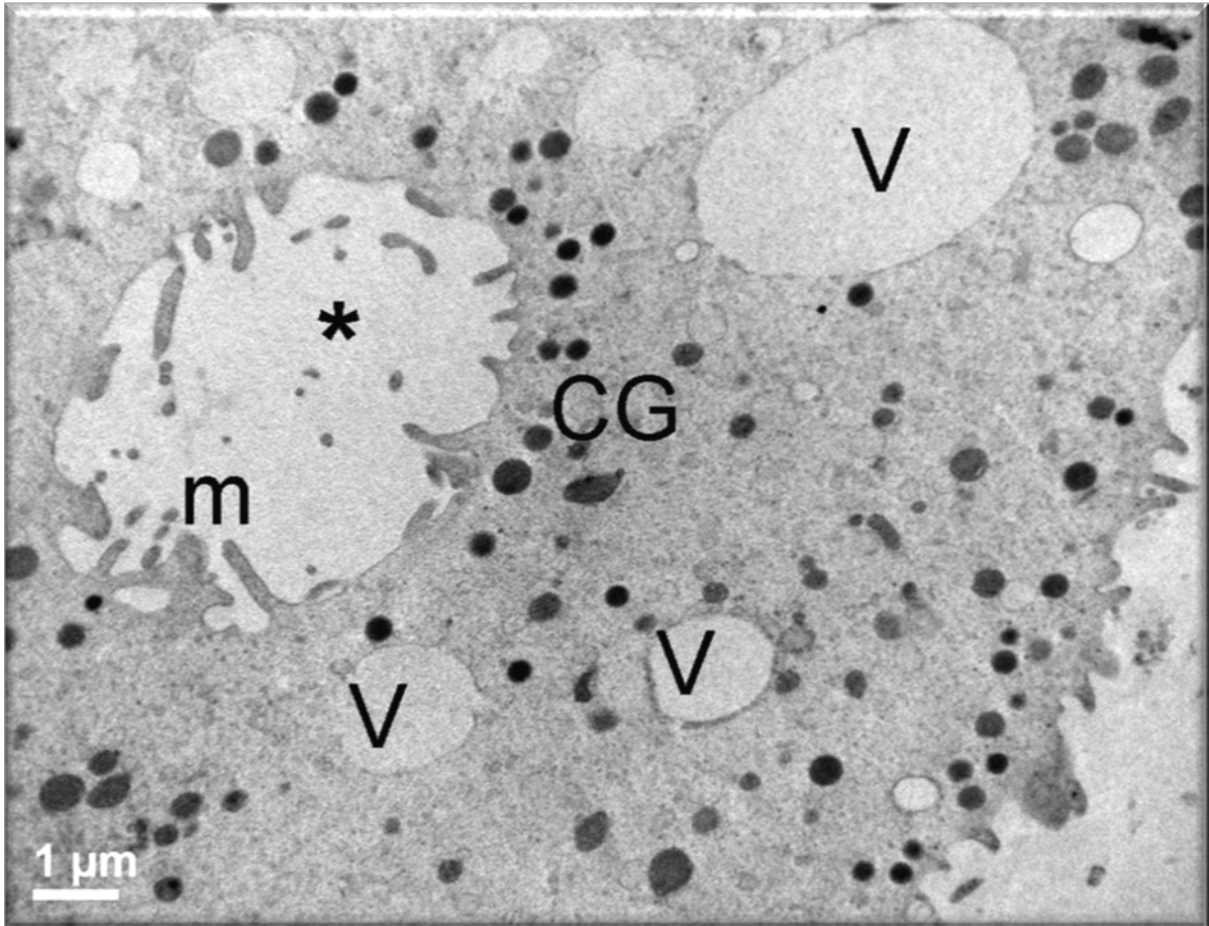


FIGURA 14. Vacuolas en ovocitos vitrificados (Palmerini et al., 2014). *V:* vacuolas; *CG:* gránulos corticales; *m:* microvellosidades.

1.6.3.3- VACUOLAS EN EMBRIONES.

La ultraestructura propia de embriones se ha estudiado en varios modelos animales. Así, en mórulas y blastocistos **ovinos** obtenidos “in vivo”, se observa que, al igual que en ovocitos, las mitocondrias están asociadas frecuentemente a REL (Bettencourt et al., 2014). En el estadio de mórula se encuentran abundantes vacuolas de hasta 1,5 μm situadas tanto en la zona perinuclear del AG, como en la región cortical, también relacionadas con REL. Y engloban en su interior estructuras citosólicas heterogéneas, puesto que su lábil membrana les permite fusionarse para “fagocitar” mitocondrias y pequeñas gotas de lípidos, formando vacuolas más grandes de hasta 4.5 μm que mayoritariamente contienen grasas. Vacuolas secretoras inmaduras son enviadas por exocitosis al Espacio Perivitelino (EP) de la mórula, mientras que vacuolas maduras aparecen solamente en células del trofoectodermo, siendo exocitadas al blastocele o cavidad. Estas observaciones sugieren que estas vacuolas endoplásmicas se comportan como organelas autofágicas activas, colaborando probablemente en el proceso de maduración de la mórula compacta al blastocisto.

Parece ser que la aparición de vacuolas está relacionada también con procesos de degeneración celular. Estudios realizados con embriones de rata muestran que los embriones bloqueados no tienen definida su membrana nuclear, contienen pequeñas mitocondrias y vacuolas autofágicas analizadas por ME (Agca & Agca, 2014).

El trabajo más interesante encontrado en bibliografía acerca de vacuolas en embriones humanos se publicó en el año 2005 (Ebner et al, 2005). Se trata de un estudio prospectivo de 223 ciclos de FIV e ICSI con ovocitos propios, donde se analiza la influencia de la presencia de vacuolas a lo largo de todo el desarrollo embrionario. Los embriones vacuolados no se transfieren, por lo que no se estudia su relación con gestación ni implantación. Un total de 36,6% de pacientes mostraron al menos un ovocito/embrión vacuolado en alguno de sus estadios. Curiosamente, de 17 pacientes que se sometieron a dos tratamientos de FIV, solamente 3 mostraron esta anomalía citoplasmática de forma recurrente. La aparición de vacuolas no se relaciona con las características de los pacientes (edad, nº ciclos previos, FSH basal, seminograma, niveles de Estradiol...) ni con el tipo de estimulación empleado (agonista o antagonista). El 32,2% de los embriones de ICSI vacuolados alcanzaron el estadio de blastocisto, frente a un 53% en embriones no vacuolados ($p < 0,001$).

Cuando estos autores estudian el desarrollo embrionario, se observa que en Día +4 de desarrollo hay un aumento significativo en vacuolización espontánea comparada con D+3 (aproximadamente un 2%), tanto para ovocitos de FIV (8.5%, $p=0.005$) como de ICSI (10.9%, $p < 0.001$) Esta vacuolización en D+4 está además directamente relacionado con la capacidad del embrión de alcanzar el estadio de blastocisto ($p=0,0001$). Las vacuolas en este estadio tienden a ser menores en número pero mayores en tamaño.

Analizando además la localización de las vacuolas en los blastocistos ($n=36$), hay una tendencia estadísticamente significativa a situarse en el trofoectodermo antes que en la masa celular interna (47,2% vs 22,2%, $p=0,011$). Incluso en un 30% de los mismos, las vacuolas no son detectables o están situadas en células excluidas, que no forman parte del blastocisto. Teóricamente, estos hechos podrían ser una estrategia para minimizar el impacto de la vacuolización en la implantación.

1.6.3.3.1- CLASIFICACIÓN DE OVOCITOS Y EMBRIONES VACUOLADOS EN LA PRÁCTICA CLÍNICA.

En estos últimos años se han publicado una serie de recomendaciones, tanto a **nivel nacional** (Asociación Española de Biólogos de la Reproducción, ASEBIR) (*Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos* |

Asebir, 2015) como **Europeo** (Balaban et al., 2011) para evaluar la presencia de vacuolas en ovocitos y embriones.

Así, ASEBIR establece que la presencia de vacuolas en ovocitos debe ser tenida en cuenta como factor negativo a la hora de seleccionar embriones para transferir en caso de observar la misma calidad embrionaria. ALPHA (Balaban et al., 2011) habla especialmente de los ovocitos con REL visible, recomendando exhaustivamente no inseminarlos (Otsuki et al, 2004). También recomienda anotar los ovocitos con vacuolas mayores de 14 μm , que tienen mayor posibilidad de dar lugar a un fallo de fecundación.

En cuanto a la aparición de vacuolas en embriones tempranos (D+2, D+3), ambas asociaciones hablan de diferenciar entre vacuolas escasas y pequeñas (5-10 μm de diámetro), rellenas de líquido transparente similar al contenido del espacio perivitelino, que parece que no comprometen el desarrollo posterior, y de embriones con una extensiva vacuolización, que puede dificultar la división espacial (Prados et al, 2012). (FIGURA 15).

Respecto al desarrollo embrionario en D+4, ASEBIR establece que una elevada vacuolización se clasifica como tipo D.

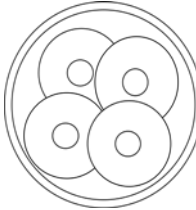
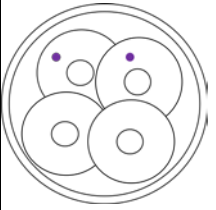
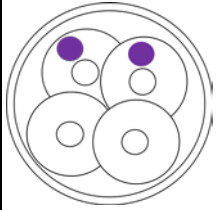
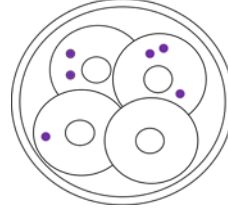
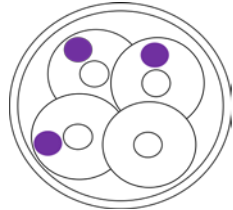
A	B	C	D	
Ausencia de vacuolas	≤ 50% de blastómeros con vacuolas pequeñas (≤ 5-14 μm)	≤ 50% de blastómeros con vacuolas grandes (> 14 μm)	>50% de blastómeros con vacuolas pequeñas (≤ 5-14 μm) >50% de blastómeros con vacuolas grandes (>14 μm)*	
				

FIGURA 15. Criterio ASEBIR de clasificación de vacuolas en embriones tempranos.

1.6.4- RESUMEN.

La presencia de vacuolas en ovocitos y embriones es relativamente frecuente en los ciclos de R.A, y si bien se acepta que es una característica negativa en general, poco se sabe realmente acerca de su repercusión en la formación de blastocisto e implantación. Muchos de los trabajos publicados hablan de vacuolas sin definir número ni tamaño, y se suelen incluir en un apartado inespecífico de “inclusiones citoplasmáticas”. En las últimas recomendaciones de las sociedades científicas, sin embargo, ya se habla de diferenciar entre tamaño vacuolar y número de células vacuoladas, a la hora de clasificar el embrión.

Gracias a los sistemas de video-time lapse, se ha podido comprobar además que la formación de vacuolas es un proceso dinámico en el tiempo, que aparece y desaparece o se agrava con la formación de nuevas vacuolas, y que dependiendo del número y tamaño la repercusión en la consecución de embarazo posiblemente varía.

Sin embargo, poco o nada se sabe de por qué se forman las vacuolas en cigotos y embriones. En este capítulo se ha explicado que están implicadas en las rutas de transporte y digestión celular, y se ha revisado especialmente su formación y maduración en la endocitosis mediada por receptor y la autofagia, dos procesos fundamentales que aseguran la viabilidad de la célula. Se diría de hecho que son complementarios, puesto la endocitosis funciona en presencia de nutrientes, mientras que la autofagia se activa en tiempos de carencia de alimento. El tamaño de estas vacuolas suele ser de aproximadamente 1 μm de diámetro en mamífero, según los artículos publicados, y podrían corresponder a las vesículas que se observan en el citoplasma de algunos ovocitos y embriones, y que a veces se van fusionando a medida que el embrión se divide. Una disfunción en cualquiera de estas dos rutas, sin embargo, provoca a veces la alteración en la formación y tamaño de las vacuolas, que pueden aumentar su diámetro de forma anómala. También la digestión de grandes moléculas, como membranas nucleares, hace que el tamaño del fagosoma sea necesariamente mayor.

La relación entre estos procesos y las células reproductoras también se ha estudiado, fundamentalmente en modelos animales (FIGURA 16). Parece ser que actúan de forma activa tras la fecundación, para, por un lado, proveer de nutrientes necesarios al cigoto en su importante transformación hacia embrión, y por otro eliminar orgánulos no necesarios para su evolución. La inhibición y/o supresión a nivel génico, lipídico y proteico de endocitosis y autofagia conduce a bloqueo embrionario en embriones y a disminución en el número de células de los blastocistos. La endocitosis aumenta en las células del trofoectodermo de los blastocistos y en estadios tempranos de gastrulación, para conseguir los nutrientes necesarios en estas etapas.

Por tanto, la aparición de vacuolas de tamaño anómalo puede ser una respuesta ante situaciones de estrés, o incluso estar relacionada con procesos de apoptosis celular.

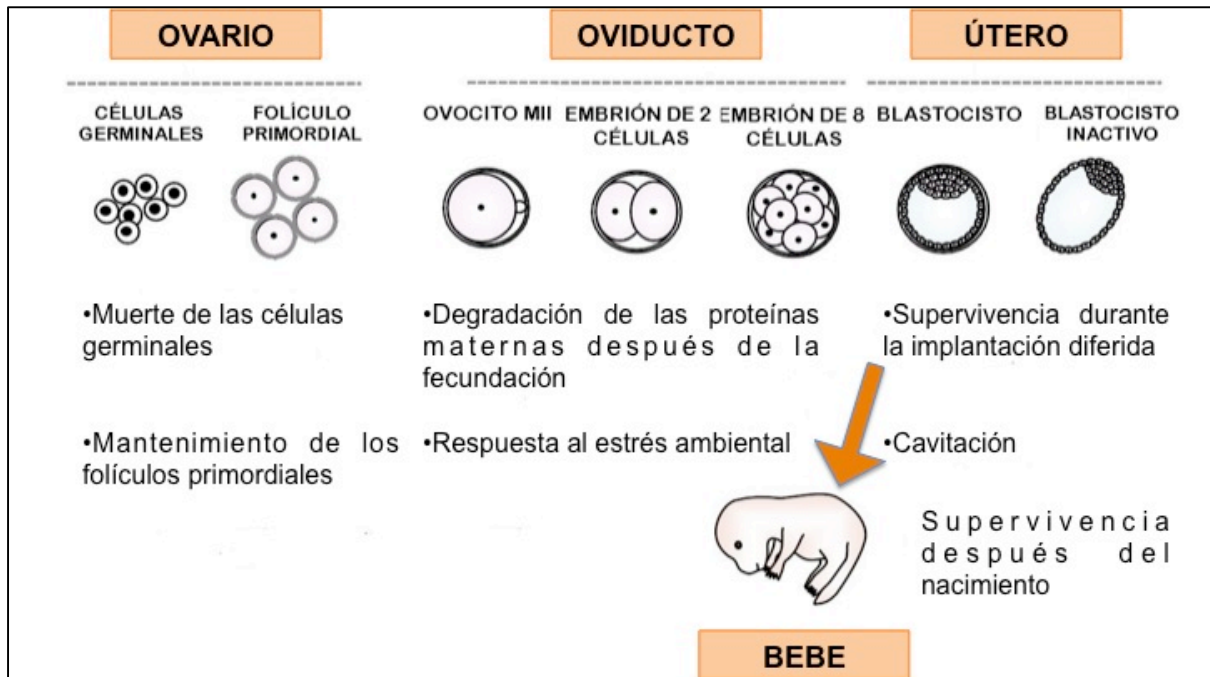


FIGURA 16. Endocitosis y reproducción (Lim & Song, 2014).

HIPÓTESIS

2- HIPÓTESIS.

La clasificación embrionaria es una herramienta fundamental en la práctica habitual de los laboratorios de FIV. A lo largo de los años numerosos estudios se han publicado evaluando las características morfológicas de los embriones en cada uno de sus estadios de desarrollo; gracias a estos trabajos se ha podido llegar a un cierto consenso acerca de lo que se define como embrión de calidad óptima, con máximas probabilidades de implantar (Balaban et al. 2011; *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir 2015*).

La aparición de los sistemas de video-time lapse ha supuesto la unión de la morfología con la cinética, en una nueva valoración morfocinética de los embriones. En función de los nuevos parámetros hallados, se han propuesto otros modelos de selección embrionaria (Meseguer et al. 2011; Wong et al. 2010) cuyo objetivo principal es, de nuevo, seleccionar el mejor embrión para transferir. Uno de los equipos incorporado a los laboratorios de FIV con este nuevo sistema es el Embryoscope™ (Unisense Fertilitech, Dinamarca), y es el que se ha utilizado para realizar el presente trabajo.

Esta nueva visión dinámica del desarrollo embrionario ha abierto nuevas puertas a la investigación de otras características que hasta el momento no se habían podido medir adecuadamente y cuyo papel en la evolución del embrión no es del todo conocido.

El trabajo que se presenta pretende evaluar dos de estos aspectos:

1- CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO. Se sabe que la eclosión del embrión de diferentes especies animales pasa por una serie de contracciones y re-expansiones para intentar romper la zona pelúcida, y que contracciones de más del 50% del volumen embrionario afectan a la calidad embrionaria y a la eclosión (Lewis y Gregory 1929; Niimura 2003). Gracias a los sistemas de video time-lapse se sabe que en la especie humana no todos los blastocistos se contraen para hacer hatching.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que la contracción de los blastocistos en los ciclos de FIV puede afectar a la calidad embrionaria y a la implantación.

2- APARICIÓN DE VACUOLAS. Otro fenómeno que se ha observado en los ciclos de FIV cuyos ovocitos y embriones se han cultivado en Embryoscope, es la aparición de vacuolas de forma espontánea. Las diferentes clasificaciones embrionarias han valorado negativamente la presencia de estas formaciones (Balaban et al. 2011; *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir* 2015), aunque su repercusión exacta no está definida del todo, puesto que empíricamente se ha visto que se trata de un fenómeno dinámico, que puede mejorar o empeorar a lo largo del tiempo de cultivo. Es decir, no se ha determinado de forma cuantitativa cómo afecta la presencia de vacuolas al desarrollo embrionario y a la implantación, ni tampoco si influye de la misma manera en función del tiempo de aparición, el número de células afectadas o su tamaño.

La hipótesis que se plantea en este trabajo es que la aparición de vacuolas a lo largo del cultivo embrionario de los ciclos de FIV puede afectar al desarrollo de los embriones, así como a su calidad y a las posibilidades de implantación, y que esta afectación puede estar modulada por el tiempo/estadio en el que aparecen, el número de células vacuoladas en el embrión y el propio tamaño de las vacuolas.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo se ha centrado en evaluar el efecto de la contracción de los blastocistos y de la aparición de vacuolas sobre la calidad embrionaria y la implantación.

Los objetivos específicos han sido:

1- CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO:

- Relacionar la contracción del blastocisto con la implantación.
- Relacionar el tiempo de aparición de las contracciones con la implantación.
- Relacionar la duración de la contracción con la implantación.
- Validar los resultados obtenidos con una segunda serie de datos.

2- APARICIÓN DE VACUOLAS:

- Evaluar la distribución de la aparición de vacuolas a lo largo del desarrollo embrionario.
- Relacionar la aparición de vacuolas con calidad embrionaria.
- Relacionar la aparición de vacuolas con tasa de gestación e implantación.
- Estudiar la presencia de vacuolas en el blastocisto
- Evaluar la aparición de vacuolas en el subgrupo de 62-100 h.

MATERIAL Y MÉTODOS

EXPERIMENTAL.

4- MATERIAL Y METODOS.

4.1- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Estudio retrospectivo realizado en IVI Valencia, IVI Murcia e IVI Zaragoza. Todos los procedimientos y protocolos fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional, que regula los análisis de la base de datos y los procedimientos clínicos de FIV para la investigación en IVI. Este proyecto cumple también con la Ley Española que regula las tecnologías de Reproducción Asistida (14/2006). Los datos presentados forman parte del Proyecto 1404/VLC/014/YM aprobado por el CEIC (Comité ético de investigación clínica) con fecha de dictamen: 14 Julio 2014.

El diseño del estudio está reflejado en la FIGURA 17. En una primera serie de datos (**SERIE 1**) se evaluó la relevancia clínica de las contracciones en los blastocistos. En una segunda serie de pacientes de donación de ovocitos, y bajo condiciones de cultivo diferentes, se analizaron de nuevo las contracciones, para confirmar los resultados obtenidos en la primera serie y se evaluó además un nuevo factor dinámico: la aparición de vacuolas en ovocitos y embriones (**SERIE 2**).

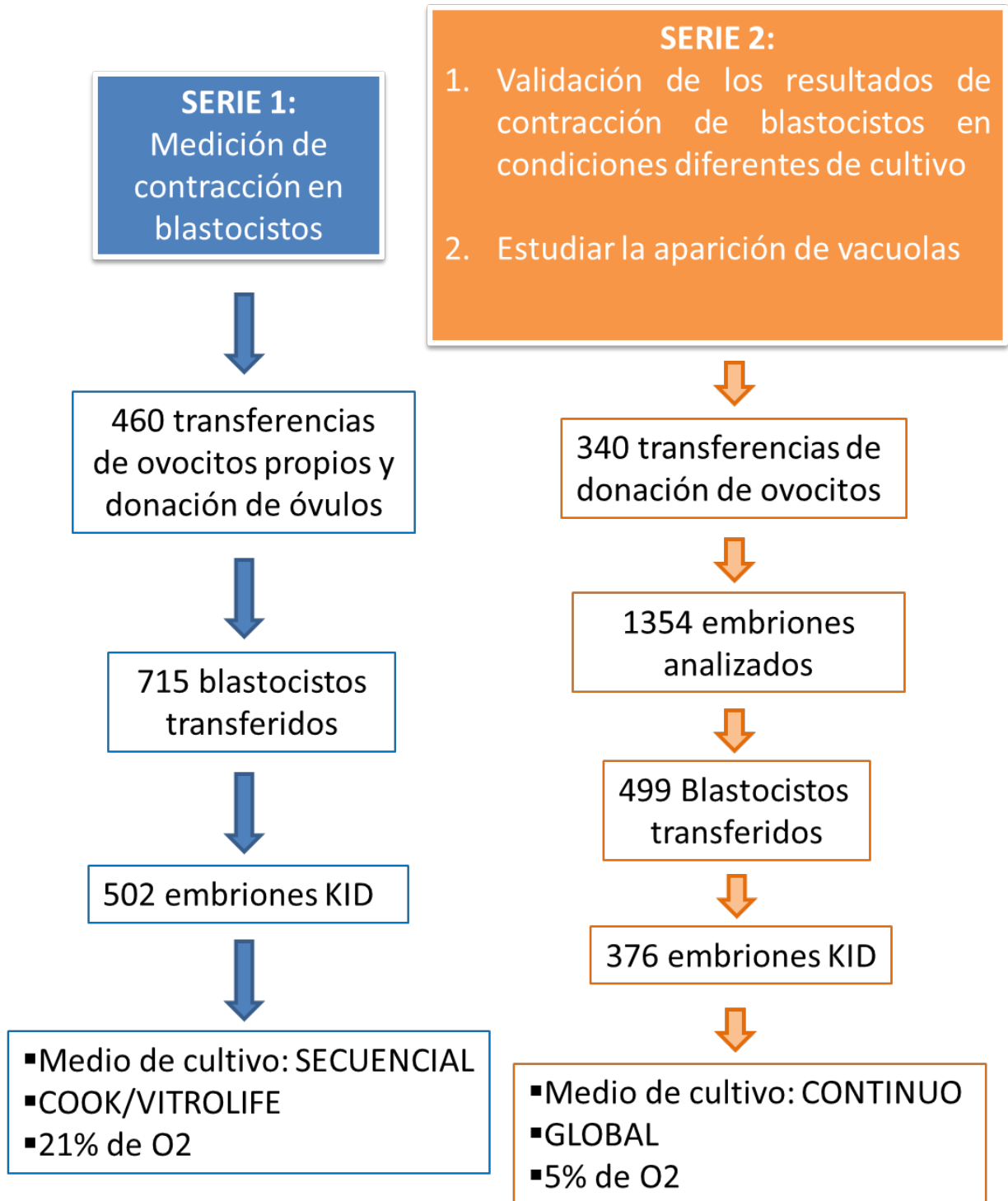


FIGURA 17: Esquema de diseño de trabajo.

4.1.1- ESTIMULACIÓN OVÁRICA DE PACIENTES Y DONANTES DE OVOCITOS

Las donantes de ovocitos de nuestro programa de donación cumplen las siguientes características: 18 a 30 años, ciclos menstruales normales (26 a 34 días), IMC de 18-28 kg/m², y ovarios y útero de aspecto saludable, medidos por ecografía trans-vaginal. También se les realiza análisis genéticos para confirmar ausencia de anomalías en cariotipo y X-Frágil, y se estudia la historia familiar para excluir donantes con enfermedades hereditarias, tal y como exige la Ley española (Garrido et al. 2002).

Los criterios clínicos de exclusión para donantes de ovocitos son: endometriosis severa, IMC>30 kg/m² y baja reserva ovárica sospechada por ecografía vaginal.

La estimulación ovárica se realizó según está descrito previamente (Garcia-Velasco et al. 2011). Haciendo un breve resumen, tanto las donantes como las pacientes tomaron la píldora anticonceptiva (Microgynon 30, Organon, España) entre 12 y 16 días desde el día 1 ó 2 del ciclo previo de estimulación. Cinco días después de dejar las pastillas, comenzaron la estimulación con FSH recombinante (FSHr) (Puregon, Organon, España; Gonal F, Serono, España), en un rango de administración de dosis de entre un mínimo de 150 a un máximo de 225 UI. El antagonista de GnRH (0.25 mg ganirelix, Orgalutran, Organon) se comenzó a administrar diariamente desde el día 5 ó 6 tras la administración de la FSHr. La ovulación fue desencadenada mediante la introducción de un agonista de la GnRH (2 ampollas de triptorelina, Decapeptyl, IpsenPharma, España en el caso de donantes y Hcg, Ovitrelle, Serono, España para pacientes), cuando al menos dos de los folículos alcanzaron el tamaño de 18 mm.

4.1.2- PREPARACIÓN ENDOMETRIAL DE PACIENTES Y RECEPTORAS DE OVOCITOS.

Como soporte de fase lutea se administraron 200 mg de progesterona vaginal micronizada (Profefik, EFFIK) cada 12 h. a pacientes y 400 mg cada 12 h. a receptoras de ovocitos.

4.1.3- ASPIRACIÓN FOLICULAR E ICSI

La aspiración transvaginal de los ovocitos fue realizada 36 h. después de la administración del agonista de la GnRH o de la hCG. Los ovocitos recuperados fueron lavados en HEPES (LifeGlobal, Canadá) e incubados en medio de fecundación COOK (COOKTM, Sydney, Australia) a 37°C, 5,5% CO₂ y **21% O₂** para la **SERIE 1** y GLOBAL (Life Global, Canadá) a 37°C, 5,0% CO₂ y **5% O₂** para la **SERIE 2**, durante 3-4 horas. Tras este

tiempo se procedió a la decumulación de las células de la granulosa mediante pipeteo mecánico en Hialuronidasa (40mUI/ml) (LifeGlobal, Canadá).

La microinyección intracitoplasmática (ICSI) se realizó inmediatamente después en todos los ovocitos metafase II (MII) en un microscopio invertido a 400 aumentos y en medio HEPES (LifeGlobal, Canadá).

4.1.4- CRIOPRESERVACIÓN DE OVOCITOS.

La técnica de criopreservación ovocitaria utilizada fue la desarrollada por Kuwayama en 2005 (Kuwayama et al. 2005). Los ovocitos fueron decumulados y vitrificados 2 horas después de la hora de la administración del agonista de la GnRH. La ICSI se realizó a las 2 horas de la desvitrificación.

4.1.5- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES.

Las muestras se recogieron con un tiempo de abstinencia recomendado de un máximo de 2-4 días. Tras 20-30 min a temperatura ambiente, se realizó un conteo de concentración y movilidad y se procesaron mediante gradientes de densidad o swim-up (LifeGlobal, Canadá). Los capacitados resultantes se utilizaron para la ICSI.

4.1.6- CULTIVO EMBRIONARIO

Una vez microinyectados, los ovocitos se colocaron en las placas diseñadas para el Embryoscope (Embryoslide, Vitrolife, EMB), preparadas con 25 µl de medio por pocillo, cubiertas con 1,4 ml de aceite mineral (COOK™, Sydney, Australia en la **SERIE 1** y Life Global, Canadá en la **SERIE 2**), pre-equilibradas (4 horas mínimo) y se cultivaron durante 5-6 días en **Embryoscope**™ (Unisense Fertilitect, Dinamarca).

SERIE 1: Cultivo secuencial: Medio Cleavage (COOK™, Sydney, Australia) hasta D+3 de desarrollo y medio CCM™ (VITROLIFE, Gothenburg, Sweden) hasta D+5/+6. Las condiciones de incubación fueron: 37°C, 5,5% CO₂ y **21%** de O₂.

SERIE 2: Cultivo continuo en medio GLOBAL (LifeGlobal, Canadá). Las condiciones de incubación fueron: 37°C, 5,0% CO₂ y **5%** O₂.

La fecundación fue evaluada entre las 17-19 h. post ICSI. La división de los embriones resultantes se se revisó a las 44 ± 1 y 68 ± 1 h. para D+2 y D+3 de desarrollo, entre 117-119 h para D+5 y entre 138-140 h para D+6. Se consideró como tiempo cero (**t₀**) el tiempo medio de microinyección de los ovocitos en cada procedimiento.

4.1.7- TRANSFERENCIA EMBRIONARIA Y EVALUACIÓN DE GESTACIÓN.

Las transferencias se realizaron en D+5 (120-122 horas post-ICSI) o D+6 (144-146h post ICSI). El resto de blastocistos clasificados como viables se vitrificaron el mismo día de la transferencia.

La gestación fue confirmada a los 13 días post-inseminación y la implantación a las 7 semanas, mediante la visualización de los sacos gestacionales con latido cardiaco por ecografía de ultrasonidos.

Para el análisis estadístico de la implantación embrionaria, se tuvieron en cuenta solamente los embriones KID (KID, Known Implantation Data, o implantación conocida). Es decir, aquellos ciclos donde el número de sacos fue igual que el número de embriones transferidos, o donde ninguno de ellos implantó.

4.1.8- CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA MEDIANTE ANÁLISIS DE TIME-LAPSE. PARÁMETROS MORFOLÓGICOS Y CINÉTICOS.

Para determinar el tiempo exacto de las divisiones celulares, imágenes de cada embrión fueron adquiridas cada 15 minutos, a una resolución de 1000 x 1000 píxeles en 7 planos focales distintos. La morfología y cinética embrionarias fueron evaluadas en un ordenador externo al incubador, con un software desarrollado específicamente para analizar imágenes por time-lapse (EmbryoViewer™ Workstation, Unisense Fertilitech A/S, Aarhus, Dinamarca).

4.1.8.1- PARÁMETROS MORFOLÓGICOS.

Los embriones fueron clasificados **morfológicamente** en D+2 y D+3 en función de número de células, porcentaje y distribución de fragmentos y simetría como parámetros principales. Otros aspectos evaluados fueron: multinucleación (especialmente en D+2), presencia de vacuolas, compactación, aspecto del citoplasma y cohesión entre las células.

En D+5 y D+6, la clasificación se basó en los criterios ASEBIR de clasificación de blastocistos, tal y como se muestra en el capítulo 1.5 de este trabajo (*Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir 2015*).

Se valoraron 3 aspectos fundamentales:

4.1.8.1.1- GRADO DE EXPANSIÓN:

- Blastocisto Temprano (BT): El embrión comienza a formar una cavidad incipiente.
- Blastocisto Cavitado (BC): Al menos el 50% del embrión está ocupado por el blastocele o cavidad.
- Blastocisto Expandido (BE): El embrión aumenta de tamaño y ZP se afina.
- Blastocisto eclosionando o haciendo Hatching (BHi): El embrión “rompe” la ZP y comienza a salir.
- Blastocisto eclosionado o Hatched (BH): El embrión ha salido completamente de la ZP.

4.1.8.1.2- CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DEL TROFOECTODERMO: En función del número y aspecto de las células el TF se cataloga en **A** (mejor calidad), **B, C y D** (peor calidad).

4.1.8.1.3- CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LA MASA CELULAR INTERNA: En función del tamaño, compactación y aspecto de las células la MCI se cataloga en **A** (mejor calidad), **B, C y D** (peor calidad).

De la combinación de los 3 factores surge la clasificación del blastocisto. Se consideraron embriones de buena calidad los BE, BHi y BH tipo A y B.

4.1.8.2- **PARÁMETROS CINÉTICOS.**

En cuanto a los **parámetros cinéticos**, se anotaron:

- Extrusión del 2º CP.
- Aparición y desaparición de los PN.
- Tiempos de división de cada mitosis (t2, t3, t4, t5, t6, t, t8, t9+)
- Tiempo de compactación de mórula (tMC), o momento en que no se aprecian las membranas celulares
- Tiempo de Blastocisto temprano (tBT) o tiempo en el que la cavidad comienza a formarse
- Tiempo de Blastocisto Cavitado (tBC) o tiempo en el que la cavidad ocupa más del 50% del volumen del embrión. Se registra el tiempo antes del comienzo del adelgazamiento de la ZP.
- Tiempo de Blastocisto Expandido (tBE) o tiempo en el que el embrión ha aumentado de tamaño y la ZP está adelgazada.

- Tiempo de Blastocisto Hatching (tBHi) o momento en el que el embrión comienza a salir.
- Tiempo de Blastocisto Hatched (tBH) o tiempo en el que el embrión ha eclosionado.

4.1.9- SELECCIÓN DE LOS EMBRIONES A TRANSFERIR.

La selección de los embriones a transferir se realizó en base a su morfocinética, según el algoritmo desarrollado por Meseguer en 2011 (Meseguer et al. 2011). En un primer proceso se pre-seleccionaron los blastocistos de mejor calidad morfológica (A, B, C, D). En un segundo paso, se excluyeron de este grupo los embriones procedentes de división irregular a 3 células (división de cigoto a 3 células en $\leq 5h$), aquellos en los que la división en 2 células había sido asimétrica y/o los que presentaron multinucleación en 4 células. Sobre el resto se aplicaron los criterios del algoritmo (t5, cc2 y s2). Se añadió además s3 como valor dinámico adicional ($t8-t5 \leq 3h$) (Chamayou et al. 2013; Dal Canto et al. 2012; Desai et al. 2014; Hashimoto et al. 2012).

4.1.10- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se excluyeron del estudio pacientes y receptoras con $IMC > 30 \text{ kg/m}^2$, fallos repetidos de implantación, ciclos de PGS y sospecha de factor uterino comprometido (causas genéticas, como X Frágil, miomas de gran tamaño...).

En cuanto a los embriones, se excluyeron aquellos que presentaron división directa de cigoto a 3 células ($t3-t2 \leq 5$), puesto que está descrito que la probabilidad de que alcancen el estadio de blastocisto e implanten es muy bajo (Rubio et al. 2012) y pueden distorsionar los resultados.

4.2- EVALUACIÓN DE LA CONTRACCION DE BLASTOCISTO.

Para poder medir las contracciones de los blastocistos se utilizaron las herramientas de dibujo del software de análisis de imagen.

Se buscó un sistema visual sencillo para identificar aquellas contracciones donde al menos el 50% de la superficie del TF se separaba de la ZP. En el tiempo de la contracción, se marcó primero el diámetro del embrión con una recta, para definir el 50% de la superficie del embrión que se tenía que separar como mínimo de la ZP de forma visual. Después se trazaron dos circunferencias que definieron la superficie del embrión contraído y la de la zona interior de la ZP respectivamente, y permitían ver la proporción de ZP que quedaba libre tras la contracción. Para el análisis estadístico se tuvieron en cuenta las contracciones mayores del 50% de la superficie de la ZP.

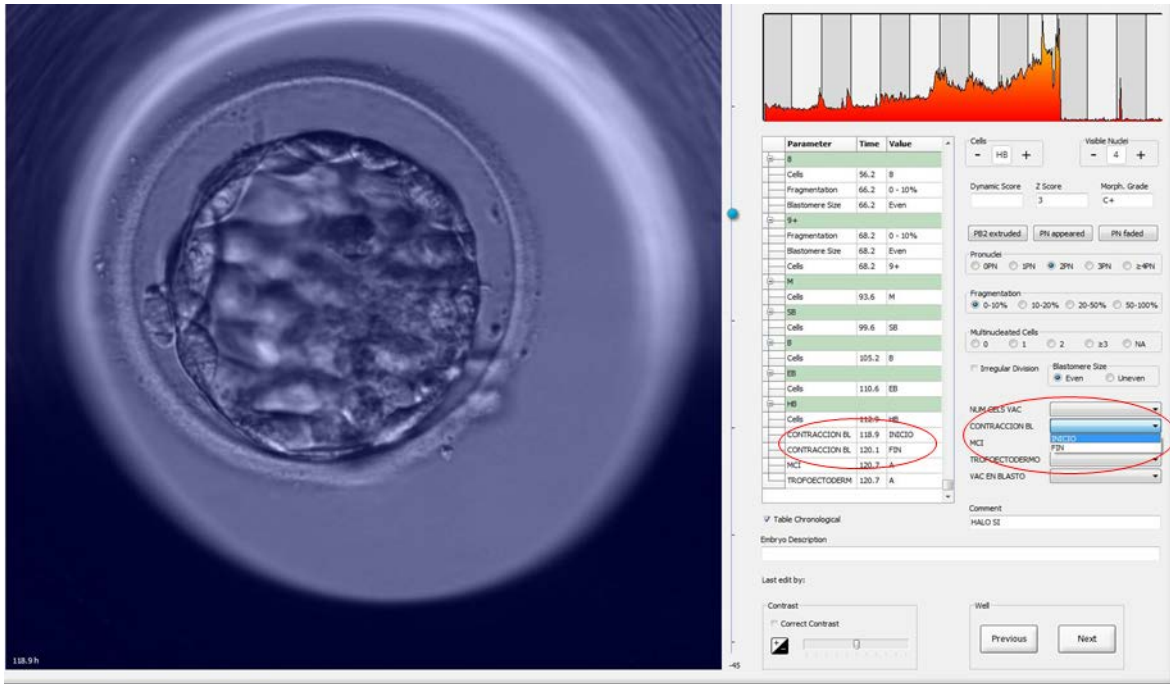


FIGURA 18. Medición de la contracción de blastocitos.

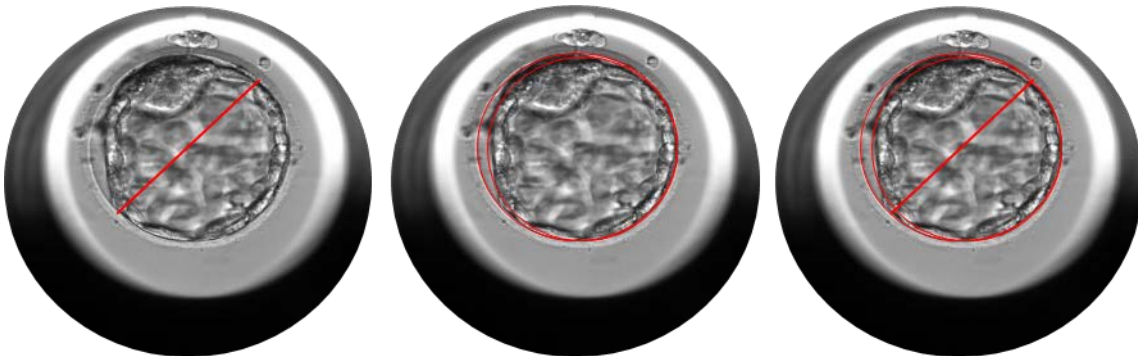


FIGURA 19. Ejemplo 1 de medición de la contracción.

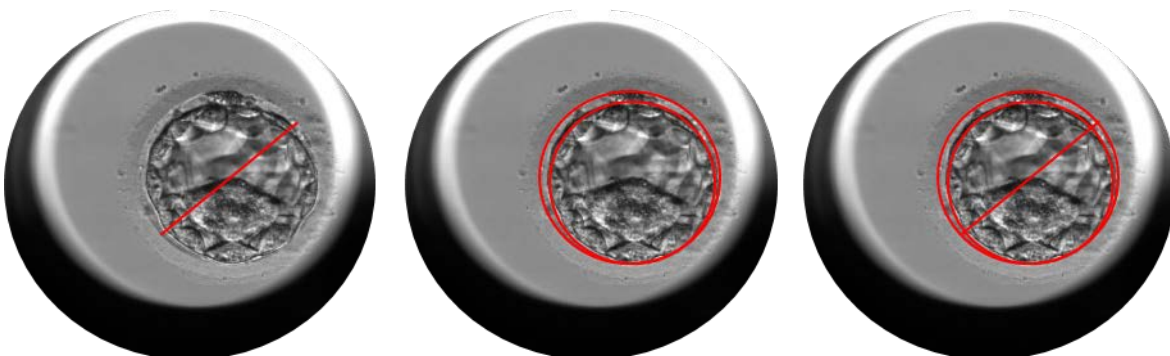


FIGURA 20. Ejemplo 2 de medición de la contracción.

Se midió además el tiempo de aparición (Tinicio) y la duración de cada contracción (Tfin-Tinicio). Duración de contracción: tiempo que necesita el TF para recuperar el contacto íntegro con la ZP.

4.3- EVALUACIÓN DE LAS VACUOLAS.

El tiempo de aparición y presencia de vacuolas se registró desde el estadio de ovocito a blastocisto (FIGURA 21). Se anotaron el número de células vacuoladas, el número de vacuolas de cada célula y el diámetro de la vacuola de mayor tamaño para los estadios de:

- Ovocito
- Cigoto
- Embrión de 2 células
- Embrión de 4 células
- Embrión de 8 células
- Embrión de 9 o más células (9+)
- MC
- Blastocisto

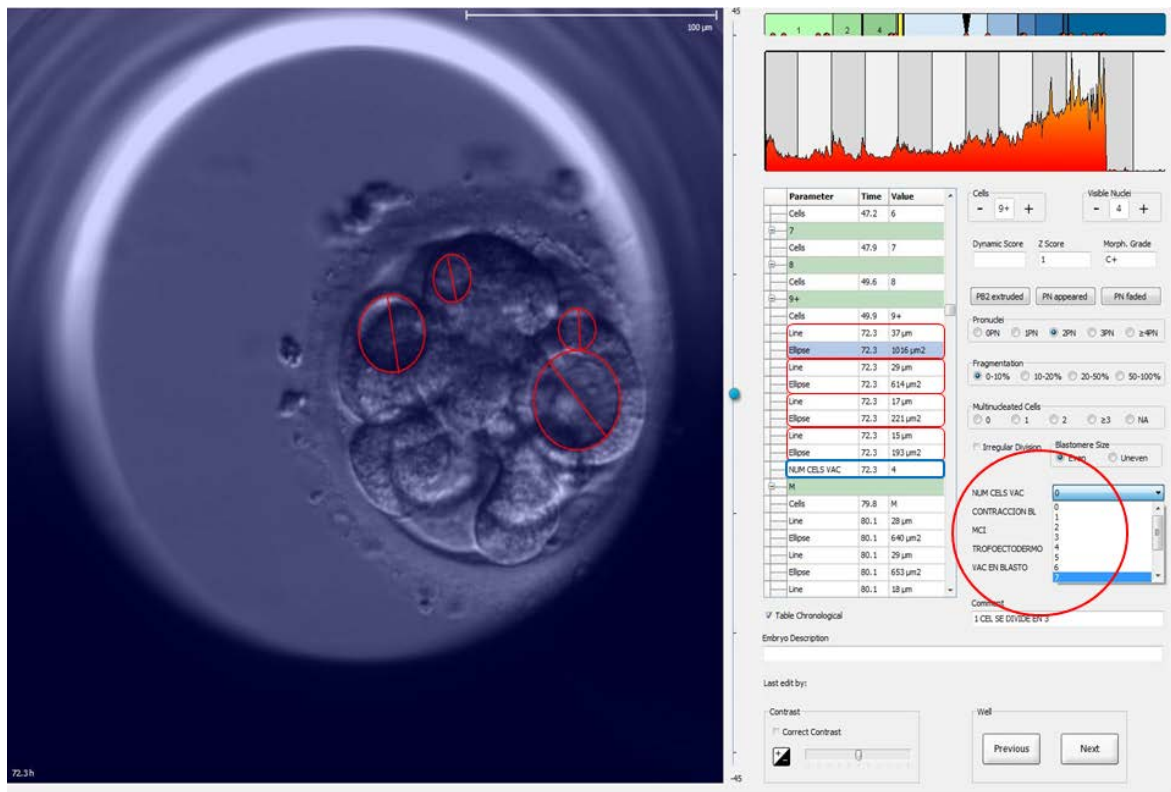


FIGURA 21. Medición de vacuolas.

Por otro lado, se anotó también la localización de las vacuolas en el blastocisto (FIGURA 22):

- En el TF
- En la MCI
- En el blastocele
- Excluidas del blastocisto

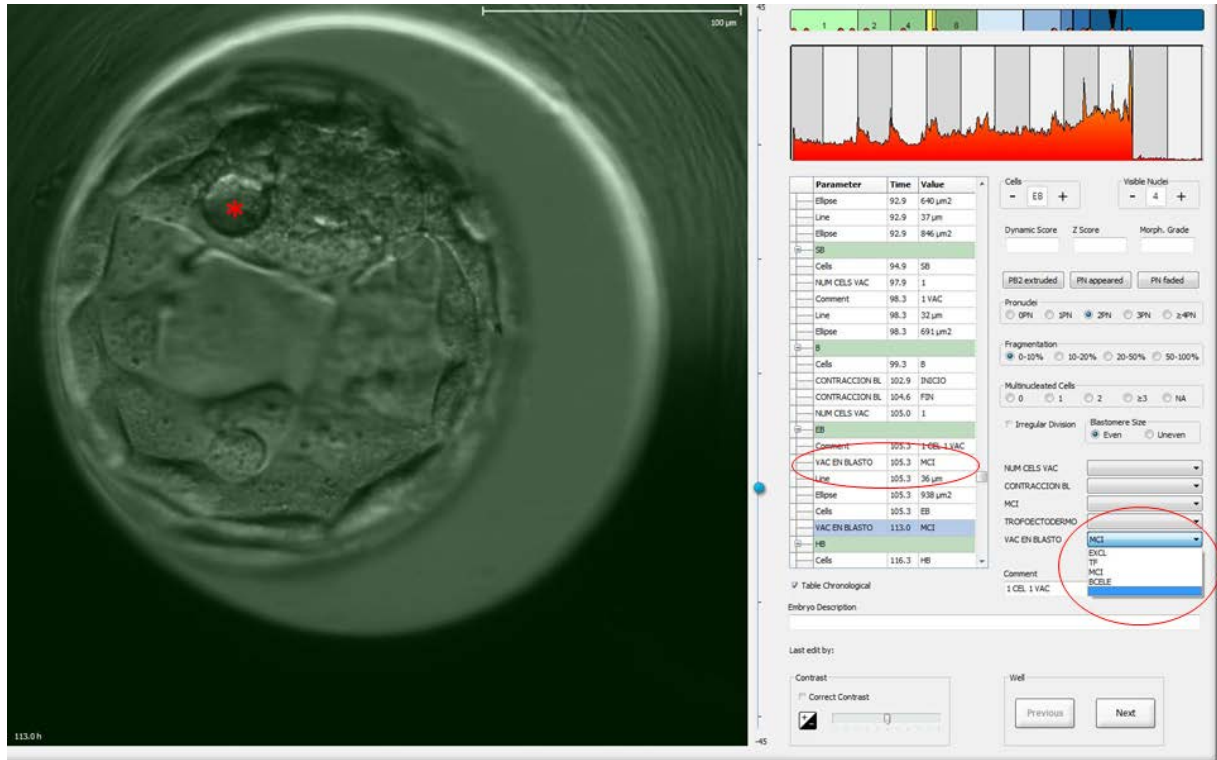


FIGURA 22. Localización de vacuolas en el blastocisto.

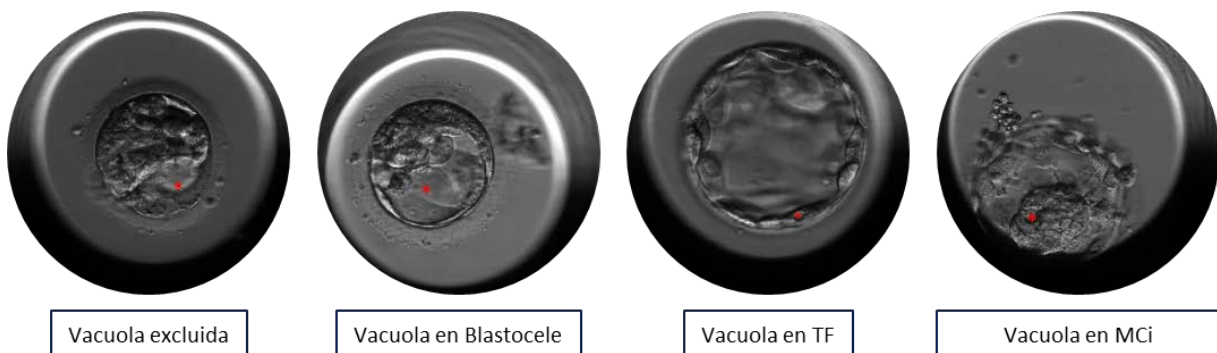


FIGURA 23. Ejemplo de localización de vacuolas en el blastocisto.

4.4- SERIE 1: CONTRACCIÓN DE BLASTOCISTO.

Se estudiaron 715 blastocistos transferidos procedentes de 460 transferencias de ovocitos propios y donación de óvulos, realizados entre Julio de 2012 y Mayo de 2013 en las clínicas IVI Valencia e IVI Murcia. De ellos, 139 presentaron al menos una contracción (19,4%), 8 dos contracciones y 2 blastocistos 3 contracciones (20,8% en total).

De los 715 blastocistos transferidos, 502 tuvieron implantación conocida (embriones KID); Se definió como **Grupo de Contracción negativa (GC-, n= 408)** a los embriones KID que no presentaron ninguna contracción. Y **Grupo de Contracción Positiva (GC+, n=94)** a los que se contrajeron al menos una vez.

En la SERIE 1 de datos se compararon entre los dos grupos:

- Características descriptivas de las pacientes.
- Parámetros propios del ciclo.
- Características morfológicas de los embriones
- Parámetros cinéticos de división.
- Tasas de gestación e implantación.
- Regresión logística de factores relacionados con implantación.

En cuanto al grupo de embriones contraídos (GC+) se comparó:

- Duración de la contracción.
- Tiempo de inicio de la contracción entre los embriones contraídos que implantaron frente a los que no lo hicieron.

4.5- SERIE 2: VALIDACIÓN DE LOS DATOS DE LA SERIE 1 EN CUANTO A CONTRACCIÓN DE BLASTOCISTOS. EVALUACIÓN DE VACUOLAS.

Se estudiaron 340 transferencias realizadas en estadio de blastocisto procedentes del programa de donación de ovocitos de IVI Zaragoza, entre Octubre de 2011 y Diciembre de 2014. Se analizaron 1354 embriones. Un total de 499 blastocistos fueron transferidos, de los cuales 376 fueron KID.

4.5.1- VALIDACIÓN DE DATOS DE CONTRACCIÓN DE LA SERIE 1.

De los 1354 embriones analizados, el 23,8% presentó al menos una contracción (n=323).

De los 499 blastocistos transferidos, el 25,1% presentó al menos una contracción (n= 126). En este grupo, 93 blastocistos se contrajeron una vez (18.5%), 27 dos veces (5.3%) y 6 blastocistos se contrajeron en tres ocasiones (1.2%).

En la SERIE 2, 281 embriones KID se incluyeron en el **GC-** y 95 en el **GC+**.

Se compararon las tasas de implantación, gestación y nacido vivo de los embriones KID entre blastocistos contraídos vs no contraídos, así como la tasa de formación de BHi. Se analizó también el tiempo de inicio de la contracción y la duración de las mismas.

4.5.2- EVALUACIÓN DE VACUOLAS.

Se estudiaron 1354 embriones, de los cuales 736 presentaron al menos una célula vacuolada (54,3%).

En cuanto a los embriones KID, 223 de los 376 presentaron al menos una vacuola en alguno de los estadios embrionarios.

Se analizó:

- Distribución de la aparición de vacuolas.
- Evaluación de la tasa de blastocisto.
- Resultados clínicos de gestación, implantación y RNV.
- Valoración de las vacuolas en estadio de blastocisto
- Evaluación de los embriones vacuolados entre 62-100 h.

4.6- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) para buscar diferencias significativas en los tiempos medios de los eventos embrionarios para embriones contraídos y no contraídos, vacuolados y no vacuolados.

Los datos continuos fueron analizados utilizando test de t-student cuando se compararon dos grupos de ANOVA seguidos del método de Bonferroni cuando se consideraron grupos múltiples. Las variables incluidas en este estudio siguieron una distribución normal. Para comparar datos categóricos se utilizó chi-cuadrado.

La implantación de todos los embriones transferidos se ajustó a una regresión logística con las siguientes covariantes:

- . Contracción de blastocisto (SÍ o NO), variable de clase, dos estados.

- . Fuente de ovocitos (frescos o criopreservados), variable de clase, dos estados.
- . Morfología del blastocisto (óptima o no), variable de clase, dos estados.
- . Hatching del blastocisto (SÍ o NO), variable de clase, dos estados.
- . Edad de la donante en el momento de la donacion, variable continua, medida en años.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1- SERIE 1. EVALUACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DE BLASTOCISTO.

Las características descriptivas de las pacientes que presentaron o no contracción de blastocitos en sus embriones transferidos se describen en la TABLA 4. Ninguno de los parámetros considerados mostró diferencias significativas entre los dos grupos estudiados, excepto el tipo de ciclo en cuanto a la procedencia (ovocitos propios o donados).

TABLA 4. CARACTERÍSTICAS DESCRIPTIVAS DE PACIENTES QUE PRESENTARON AL MENOS UN BLASTOCISTO TRANSFERIDO CONTRAIDO FRENTE A AQUELLAS QUE NO PRESENTARON CONTRACCIÓN (N=460)

	NO CONTRAIDOS (n= 344)	CONTRAIDOS n= (116)	p
Edad pacientes y receptoras	37,9 (37,4-25,85)	38,6 (37,7-39,5)	0,264
Edad pacientes y donantes	29,4 (28,8-30,0)	28,4 (27,4-29,3)	0,071
IMC (kg/m²)	23,1 (22,7-23,5)	22,7 (21,8-23,5)	0,350
Protocolo de estimulación ovárica			
Antagonista GnRH (%)	48,9 (43,6-54,2)	44,0 (35,0-53,0)	0,166
Dosis total FSH	1528 (1432-1624)	1602 (1349-1855)	0,524
Duración de la estimulación (días)	13,1 (12,6-13,7)	14,1 (13,1-15,0)	0,110
E2 día de hCG (pg/ml)	1861 (1617-2105)	1536 (1231-1859)	0,204
Inducción de la ovulación* (%)			
rHCG	70,1 (68,2-72,5)	73,2 (69,6-76,6)	0,312
Agonista GnRH	29,6 (27,5-31,8)	26,8 (23,4-30,4)	
Duración de la infertilidad (años)	3,1 (2,8-3,4)	3,3 (2,7-3,9)	0,453
Ciclos de donación de ovocitos (%)	51,9 (46,6-57,2)	71,6 (63,4-79,8)	<0,001
Etiología femenina (%)			
Edad Materna	43,7 (41,1-46,2)	45,8 (44,5-47,1)	NS
Baja respuesta/mala calidad ovocitaria	45,6 (43,0-48,2)	43,4 (42,1-44,7)	
Endometriosis	6,6 (5,3-7,8)	5,7 (5,1-6,3)	
Calidad espermática			
Concentración (mill/ml)	41,57 (37,87-45,26)	41,97 (35,54-49,90)	0,916
Motilidad espermática, A+B (%)	35,58 (31,70-41,47)	29,29 (21,81-36,73)	0,111

* En ciclos estimulados con antagonista GnRH.

Nota: Valores expresados como media y CI 95%. NS: No Significativo.

Los parámetros del laboratorio de FIV se muestran en la TABLA 5. Solamente el número de embriones transferidos fue significativamente más alto para las pacientes que tuvieron al menos un embrión contraído por transfer.

TABLA 5. PARÁMETROS PROPIOS DE LOS CICLOS DE FIV PARA PACIENTES QUE PRESENTARON AL MENOS UN BLASTOCISTO TRANSFERIDO CONTRAÍDO FRENTE A AQUELLAS QUE NO PRESENTARON CONTRACCIÓN (N=460).

	NO CONTRAÍDOS (n= 344)	CONTRAÍDOS n= (116)	p
Ovocitos obtenidos (n)	12,7 (12,0-13,3)	13,0 (12,1-13,8)	0,664
Ovocitos MII (n)	10,3 (9,90-10,80)	10,6 (9,90-11,3)	0,581
Ovocitos vitrificados (%)	23,3 (21,1-25,40)	24,4 (23,3-25,5)	0,377
Embriones transferidos (n)	1,51 (1,45-1,57)	1,7 (1,61-1,78)	0,001
Embriones criopreservados (n)	3,6 (3,32-3,87)	3,3 (2,92-3,68)	0,254

Nota: Valores expresados como media y CI 95%. NS: No Significativo.

En la TABLA 6 se reflejan los resultados de la comparación de las características morfológicas del grupo de los blastocistos transferidos con o sin contracciones. Ambos grupos fueron morfológicamente comparables en D+2, D+3 y D+5 de desarrollo embrionario. No se encontró relación entre contracción de blastocisto y evaluaciones morfológicas estándar. Tampoco se encontraron diferencias en cuanto a la tasa de BHi en el grupo de blastocistos contraídos frente al grupo de no contracciones.

TABLA 6. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS EMBRIONES QUE PRESENTAN AL MENOS UNA CONTRACCIÓN EN EL ESTADIO DE BLASTOCISTO COMPARADOS CON AQUELLOS SIN CONTRACCIÓN OBSERVADA (n= 715).

	NO CONTRAIDOS (n= 576 embriones)	CONTRAIDOS n= (139 embriones)	p
Número de células (D2)	3,9 (3,9-4,1)	4,0 (3,9-4,1)	NS
Fragmentación (D2)	4,9 (4,4-5,5)	4,7 (3,8-5,7)	NS
% Embriones óptimos (D2)	74,1 (70,5-77,7)	84,2 (78,1-90,2)	NS
Número de células (D3)	8,7 (8,3-9,1)	9,1 (8,4-9,8)	NS
Fragmentación (D3)	5,5 (4,8-6,2)	5,3 (4,4-6,2)	NS
% Embriones óptimos (D3)	80,9 (77,7-84,1)	83,3 (77,1-98,5)	NS
% Blastocistos óptimos (D5)	71,7 (68,0-75,4)	77,8 (70,9-84,7)	NS
% BHi (D5)	28,7 (25,0-32,4)	31,4 (23,7-39,1)	NS

Nota: Valores expresados como media y CI 95%. NS: No Significativo

La TABLA 7 describe la media de tiempos de división para cada grupo de pacientes. Se encuentran diferencias significativas entre embriones con y sin contracciones para t2, t3, t3, tM, y tB. Los embriones no contraídos fueron significativamente más lentos que los contraídos.

TABLA 7. PARÁMETROS MORFOCINÉTICOS DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO.

	NO CONTRAIDOS (n= 576 embriones)	CONTRAIDOS n= (139 embriones)	p
t2	26,9 (26,2-27,3)	25,4 (24,7-26,1)	0,003
t3	37,7 (36,9-38,5)	36,4 (35,6-37,3)	0,037
t4	39,3 (38,5-40,0)	37,9 (36,9-38,9)	0,028
t5	51,7 (50,3-53,0)	50,8 (49,2-52,5)	NS
t6	54,5 (53,3-55,8)	53,4 (51,7-55,0)	NS
t7	57,3 (55,8-58,7)	56,1 (54,2-58,1)	NS
t8	61,5 (59,5-63,4)	60,9 (58,2-63,3)	NS
tM	86,3 (84,3-88,4)	80,9 (78,3-83,4)	<0,001
tB	101,9 (99,8-101,0)	98,0 (95,7-100,2)	0,013
tBHi	113,7 (111,9-115,5)	112,1 (108,2-116,1)	NS

Nota: Valores expresados como media y CI 95%. NS: No Significativo.

Los resultados de la TABLA 8 muestran una disminución significativa en cuanto a la tasa de implantación cuando se comparan embriones contraídos frente a no contraídos.

TABLA 8. DATOS DE GESTACIÓN E IMPLANTACIÓN DE TRANSFERENCIAS CON EMBRIONES CONTRAIDOS FRENTE A NO CONTRAIDOS.

	NO CONTRAIDOS (n= 342)	CONTRAIDOS (n= 82)	p
Tasa de implantación (%)	48,5 (43,6-53,4)	35,1 (25,3-44,9)	0,019
	408 KID	94 KID	
Tasa de gestación positiva (%)	66,9 (61,9-71,9)	61 (50,4-71,6)	NS
Tasa de gestación clínica (%)	59,6 (54,4-64,8)	50,0 (39,2-60,8)	NS
Tasa de aborto clínico (%)	9,4 (6,3-12,5)	8,5 (2,5-15,5)	NS
Tasa de gestación en curso (%)	50,3 (45,0-55,6)	41,5 (30,8-52,1)	NS

Nota: Valores expresados como media y CI 95%. NS: No Significativo

Para calcular los valores de implantación se tienen en cuenta 424 transferencias de las 460, que son aquellas donde los blastocistos son KID. En cuanto a la gestación y aborto, se tienen en cuenta las transferencias puras de embriones contraídos vs no contraídos.

Por otro lado, la contracción de blastocistos ocurre más frecuentemente desde el estadio de BE en adelante, que en BC (22 vs 12,9%, $p < 0,05$).

Se analizaron también los **tiempos en los que ocurrieron las contracciones**, pero no se encontraron diferencias significativas entre los embriones contraídos que implantaron frente a los que no (109 vs 110,9h, $p = 0,408$).

En cuanto a la **duración de las contracciones**, el tiempo medio fue de 1,67 h (CI95% 1,13-2,01). Tampoco se encontraron diferencias entre los blastocistos contraídos que implantaron y los que no lo hicieron (1,50 vs 1,88 h, $p = 0,290$).

Se realizó un análisis de regresión logística (Curva ROC) para intentar determinar qué factores de los estudiados influyen en la implantación (TABLA 9). De las 6 covariantes estudiadas, la edad materna, el tipo de ciclo (óvulos propios o donados) y la contracción de blastocistos afectan significativamente a la implantación.

TABLA 9. ANÁLISIS DE REGRESIÓN LOGÍSTICA DE COMO AFECTA LA CONTRACCION DE BLASTOCISTO, EL TIPO DE CICLO, EL ORIGEN DE OVOCITOS, LA EDAD (DONANTES Y PACIENTES), NÚMERO DE OVOCITOS MII, MORFOLOGÍA Y ECLOSIÓN DEL BLASTOCISTO A LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA.

VARIABLE	VALORES	OR	p
Contracción del blastocisto	Sí vs No	0,55 (0,32-0,94)	0,028
Número de MII	N	1,01 (0,96-1,07)	NS
Tipo de ciclo	Donación vs autólogo	2,19 (1,19-4,01)	0,011
Origen de ovocitos	Fresco vs vitrificado	1,21 (0,72-2,04)	NS
Edad materna	Años	0,93 (0,88-0,98)/año	0,006
Morfología del blastocisto	Optimo vs No óptimo	1,20 (0,73-1,99)	NS
Hatching	Sí vs No	1,22 (0,77-1,95)	NS

Nota: OR es el odds ratio con el 95% de Intervalo de Confianza (IC) expresado entre paréntesis.

5.2- SERIE 2. VALIDACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO Y EVALUACIÓN DE VACUOLAS

5.2.1- VALIDACIÓN DE LA CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO.

No se encontraron diferencias en cuanto a la **tasa de BHi** de los blastocistos transferidos cuando se compararon GC+ frente a GC- (46,8% [IC95% 38,0-55,6] vs 43.5% [IC95% 38,4-48,5]).

Se analiza la tasa de implantación de embriones KID (n=376) comparando blastocistos no contraídos frente a contraídos. La diferencia es estadísticamente significativa, como se muestra en el GRÁFICO 5.

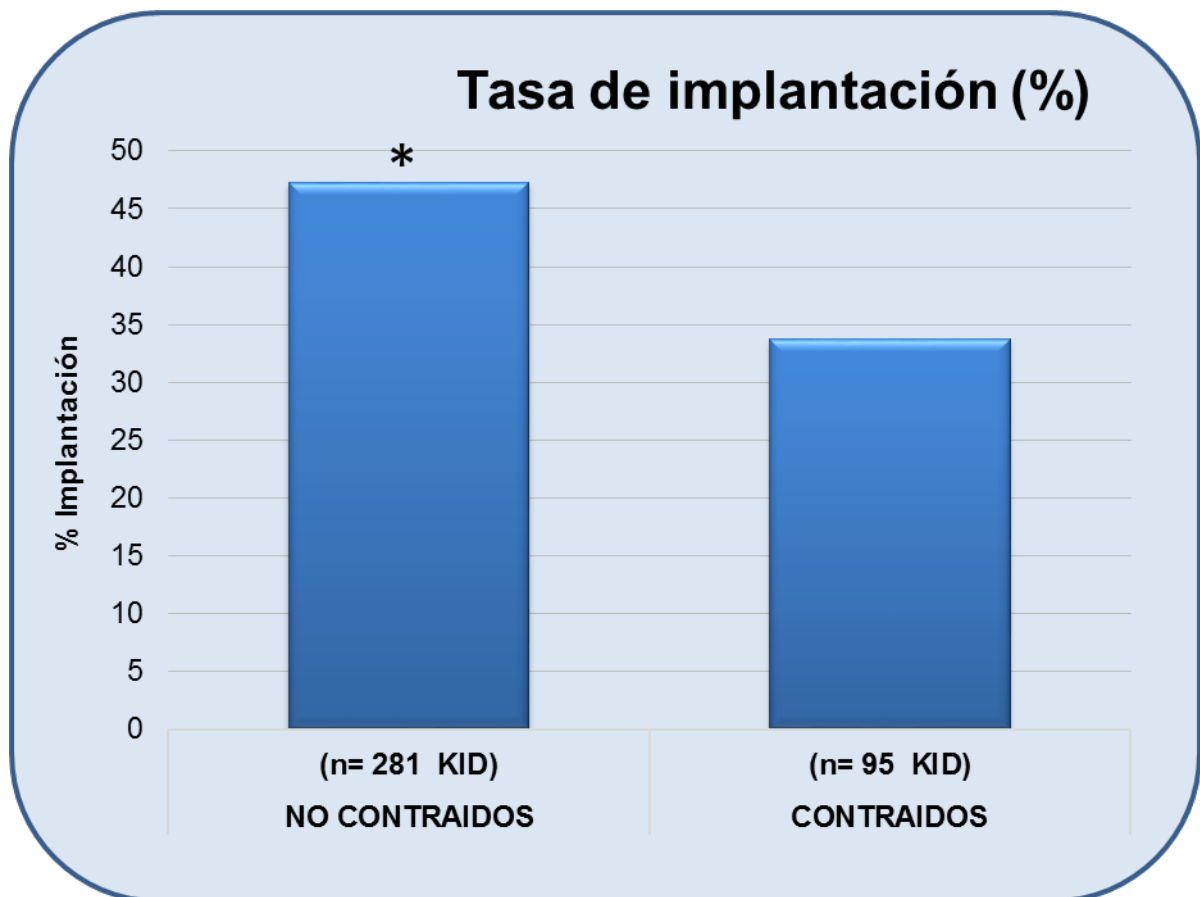


GRÁFICO 5. Comparación de la tasa de implantación entre blastocistos KID no contraídos (47% [IC95% 41,5-53,2]) frente a contraídos (33,7% [IC95% 24,2-43,2], p=0,02).

En cuanto a la tasa de gestación, en este grupo sí se observan diferencias significativas. No se aprecian sin embargo cuando se comparan las tasas de RNV entre **GC+ y GC-**. (TABLA 10).

TABLA 10. DATOS DE GESTACIÓN Y NACIDOS VIVOS DE TRANSFERENCIAS CON EMBRIONES CONTRAÍDOS FRENTE A NO CONTRAÍDOS (SERIE 2).

	NO CONTRAÍDOS	CONTRAÍDOS	p
Tasa de gestación clínica (%) (n=290 transferencias puras)	57,8 (51,4-64,2)	38,3 (26,0-50,6)	0,007
Tasa de nacido vivo por KID positivo (%) (n= 157 KID)	84,4 (77,7-90,5)	77,4 (62,7-92,1)	NS

Nota: Valores expresados como media y CI 95%. NS: No Significativo

La TABLA 11 muestra la relación entre el tiempo de contracción y duración de la misma con la implantación

TABLA 11. TIEMPO Y DURACIÓN DE LA CONTRACCIÓN ENTRE EMBRIONES KID+ Y KID - (SERIE 2).

	TIEMPO DE CONTRACCIÓN (h)	DURACIÓN DE CONTRACCIÓN (h)
KID - (N= 63)	119,89 (116,49-123,28)	2,08 (1,68-2,48)
KID + (N=32)	111,22 (107,23-115,21)	2,07 (1,65-2,56)
p	p=0,0002	NS

NOTA: Valores expresados como media y CI (95%). NS= No significativo. Prueba t de student.

Parece ser que en la SERIE 2, cuanto más tarde se contrae el blastocisto menores posibilidades tiene de implantar. (Probablemente los resultados difieran de la serie 1 porque aquí hemos tenido en cuenta los TD6 y los conges).

Cuando se compara el tiempo de inicio de contracción y calidad embrionaria en todos los blastocistos contraídos de la SERIE 2 (n=323), el tiempo en el que se inicia la contracción, y tal y como se muestra en el GRÁFICO 6, se puede observar que la calidad del blastocisto disminuye a medida que la contracción se produce más tarde.

Calidad del blastocisto en función del tiempo de inicio de la contracción

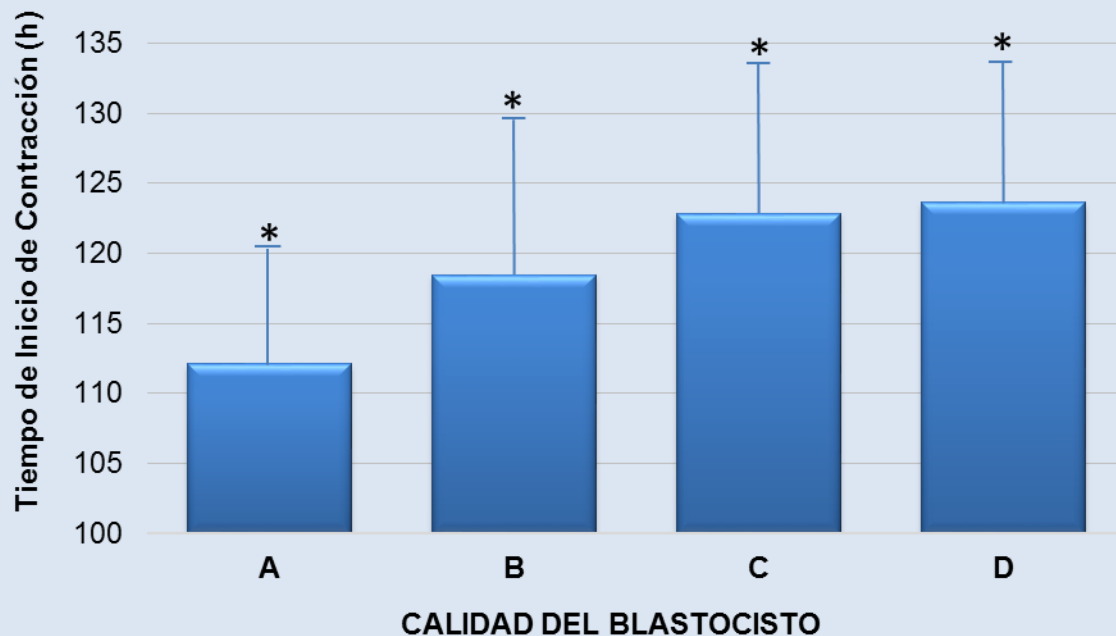


GRAFICO 6. Se encuentran diferencias significativas cuando se comparan los tiempos de inicio de contracción con calidad embrionaria, entre los grupos A y B ($p=0,0003$); entre los grupos A y C ($p<0,001$); entre los grupos A y D ($p<0,0001$); entre los grupos B y C ($p=0,003$); entre los grupos B y D ($p=0,016$). No se encuentran diferencias cuando se comparan los grupos C y D. GRUPO A, $n= 57$; GRUPO B, $n= 135$; GRUPO C, $n=98$; GRUPO D, $n=33$. Las barras representan el error estándar.

Lo mismo ocurre cuando se comparan los grupos de calidad embrionaria de los embriones KID con contracción positiva (n=95), como se puede ver en la TABLA 12.

TABLA 12. RELACIÓN ENTRE CALIDAD EMBRIONARIA Y TIEMPO DE INICIO DE CONTRACCIÓN (KID)

GRUPOS	n	Tiempo de contracción (h)	p
TIPO A	32	110,65	p=0,0001
TIPO B	37	117,39	p=0,0001
TIPO C	26	123,48	p=0,0001

5.2.2- VACUOLAS.

5.2.2.1- DISTRIBUCIÓN DE LA APARICIÓN DE VACUOLAS.

5.2.2.1.1- PRIMERA APARICIÓN DE VACUOLAS.

Se evalúa en primer lugar la distribución de la aparición de vacuolas en **todos los embriones** analizados. Como se puede observar en el GRÁFICO 7, la primera aparición de vacuolas ocurre más frecuentemente en estadio de extrusión del 2º CP a cigoto (incluida la desaparición de PN) y a partir de 8 células, especialmente en los periodos de 9+ y M.

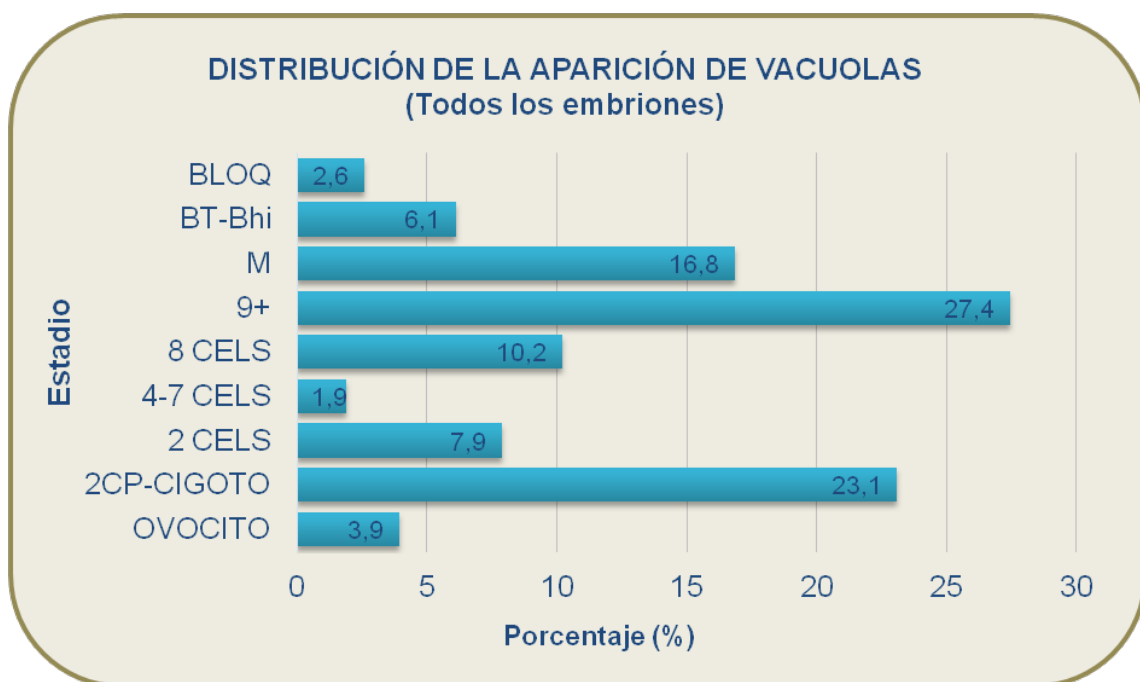


GRAFICO 7. Distribución de la primera aparición de vacuolas en los embriones analizados (n=736).

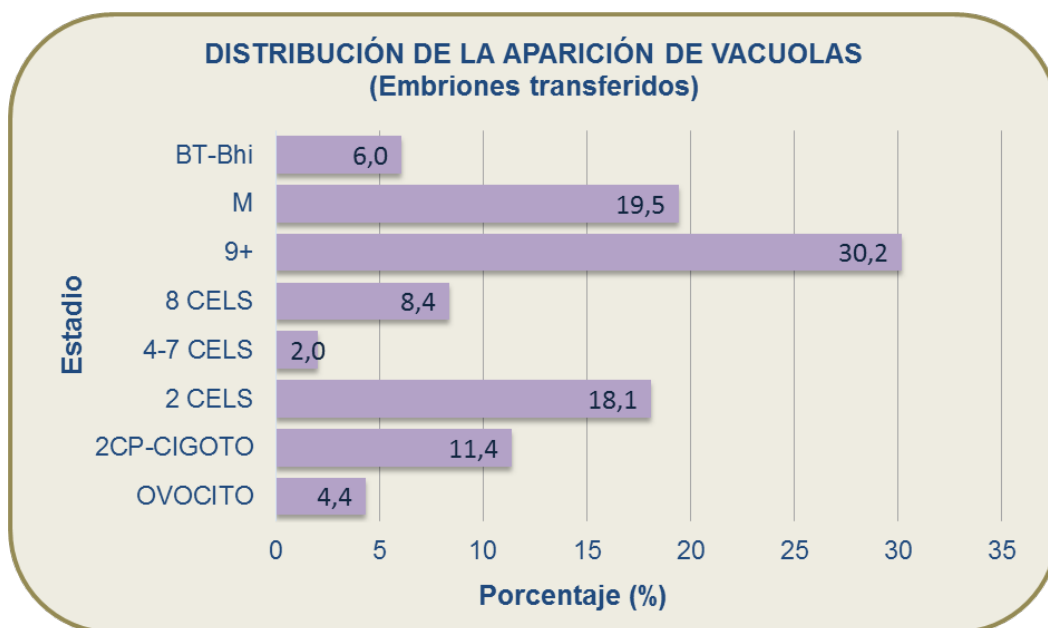


GRÁFICO 8. Distribución de la aparición de vacuolas en los embriones transferidos (n= 298).

Cuando se estudia esta primera aparición de vacuolas en los **embriones transferidos**, la distribución es parecida (GRÁFICO 8). Como se puede observar, la distribución de la aparición de vacuolas entre la población general de embriones y la de embriones transferidos difiere significativamente en los estadios de 2CP-Cigoto y 2 células ($p < 0,0001$).

No se encuentran diferencias cuando se comparan los **embriones KID- y KID+**. (GRAFICO 9).

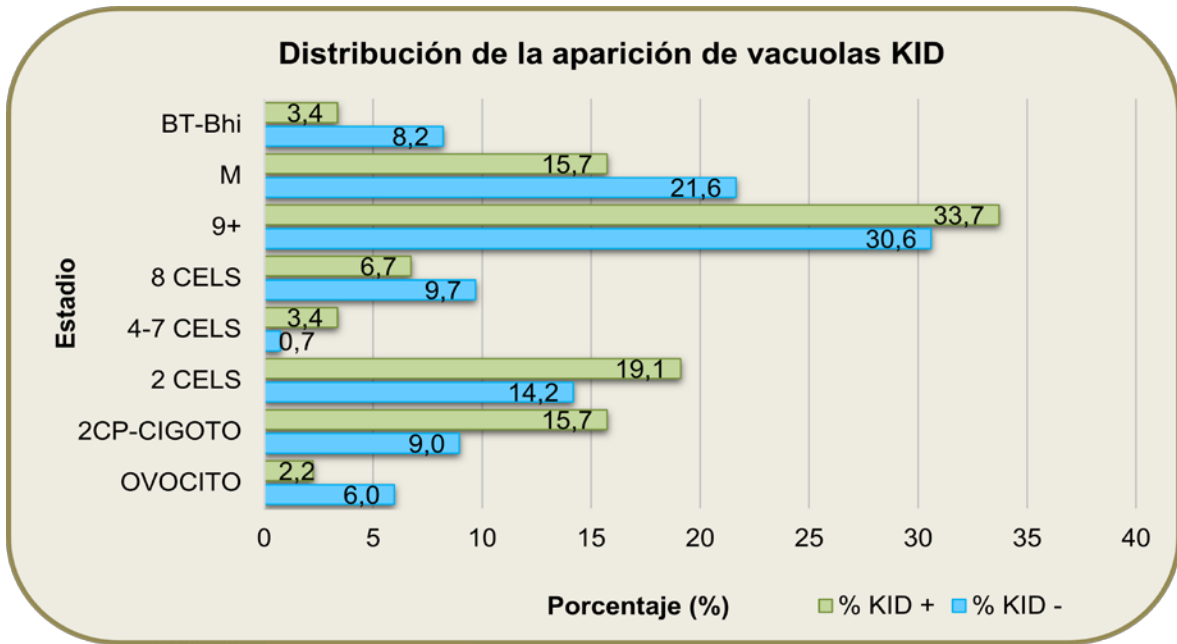


GRÁFICO 9. Distribución de la aparición de vacuolas en función de embriones KID y KID +. No se encuentran diferencias entre ambos grupos.

Tanto los embriones transferidos como los KID se comportan igual (de 2CP a cigoto y a partir de 9 células la vacuolización es más abundante).

5.2.2.1.2- APARICIÓN DE VACUOLAS SUCESIVAS.

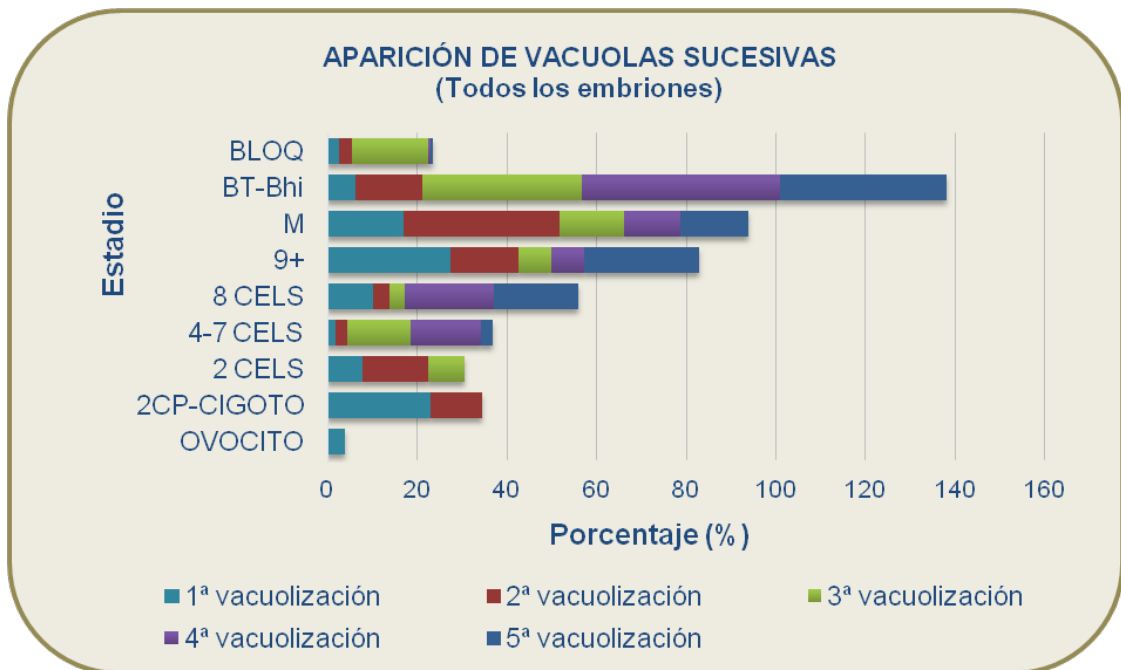


GRAFICO 10. Distribución de la aparición de vacuolas sucesivas en todos los embriones.

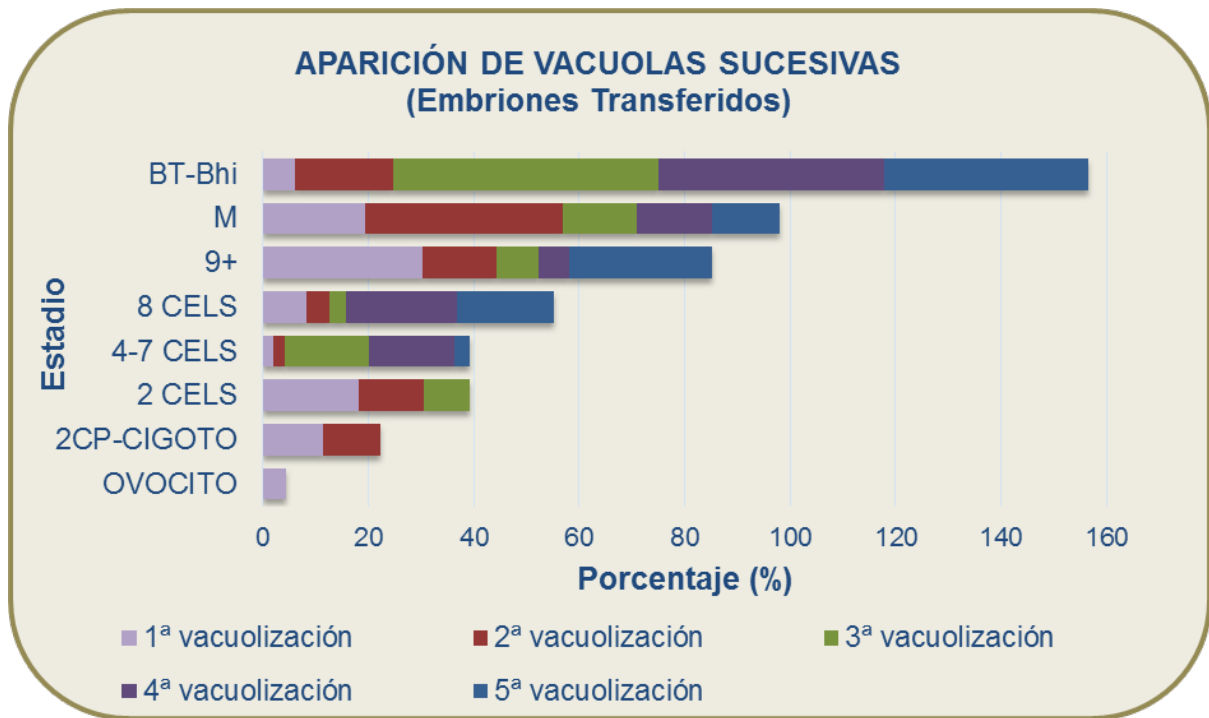


GRAFICO 11. Distribución de la aparición de vacuolas sucesivas en los embriones transferidos.

EMBRIONES KID (%)	OVOCITO	2CP-CIGOTO	2 CELS	4-7 CELS	8 CELS	9+	M	BT-BHi	N TOTAL
1º VACUOLIZACIÓN KID-	2,0	3,7	5,7	0,3	4,4	13,1	5,7	1,0	107
1º VACUOLIZACIÓN KID+	0,7	4,0	4,7	1,0	2,0	9,4	3,4	0,0	75
2ª VACUOLIZACIÓN KID-	0,0	10,2	11,1	0,9	3,7	16,7	35,2	22,2	108
2ª VACUOLIZACIÓN KID+	0,0	10,7	13,3	4,0	4,0	14,7	38,7	14,7	75
3º VACUOLIZACIÓN KID-	0,0	0,0	9,6	15,7	0,0	8,4	18,1	48,2	83
3ª VACUOLIZACIÓN KID+	0,0	0,0	8,5	11,9	5,1	8,5	13,6	52,5	59
4ª VACUOLIZACION KID-	0,0	0,0	0,0	17,8	17,8	4,4	13,3	46,7	45
4º VACUOLIZACION KID+	0,0	0,0	0,0	15,2	18,2	9,1	15,2	42,4	33
5ª VACUOLIZACIÓN KID-	0,0	0,0	0,0	3,3	20,0	26,7	3,3	46,7	30
5ª VACUOLIZACIÓN KID+	0,0	0,0	0,0	0,0	21,1	21,1	31,6	26,3	19

TABLA 13. DIFERENCIA ENTRE EMBRIONES KID- Y KID + en las sucesivas vacuolizaciones. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

5.2.2.2- EVALUACIÓN DE CALIDAD EMBRIONARIA.

La TABLA 14 muestra la tasa de blastocisto (entendida como embriones que llegan a BC), blastocisto de buena calidad (entendida como BE, BHi y BH tipo A + B) y porcentaje de embriones que se descartan, evaluando todos los embriones analizados.

TABLA 14. DATOS DE TASA DE BLASTOCISTO, BLASTOCISTO DE BUENA CALIDAD Y DESCARTADOS DE EMBRIONES VACUOLADOS FRENTE A NO VACUOLADOS

	NO VACUOLADOS (n= 618 embriones)	VACUOLADOS (n= 736 embriones)	p
Tasa blastocisto (%)	71,4 (67,8-74,9)	85,6 (83,1-88,1)	p<0,001
Tasa blastocisto buena calidad (%)	72,4 (68,2-76,5)	74,2 (70,8-77,6)	p=0,490
Tasa embriones descartados (%)	37,2 (33,4-41,0)	18,8 (15,9-21,6)	p<0,0001

Nota: Valores expresados como porcentaje y CI 95%.

En el GRAFICO 12 se muestra la calidad de los embriones transferidos cuando se comparan embriones no vacuolados frente a vacuolados.

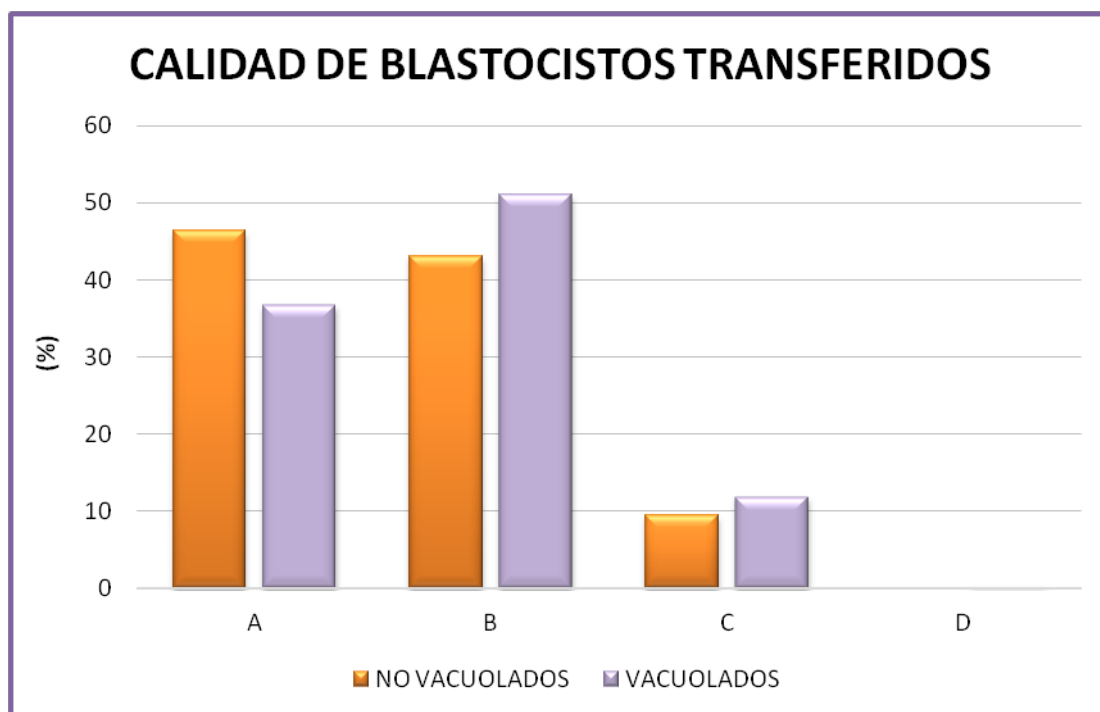


GRAFICO 12. Calidad de embriones transferidos en función de si presentan vacuolas o no. No se aprecian diferencias estadísticamente significativas cuando se compara la calidad embrionaria entre ambos grupos (p>0.05).

5.2.2.3- RESULTADOS DE GESTACIÓN, IMPLANTACIÓN Y RNV.

En la TABLA 15 se muestran las tasa generales de gestación, implantación y RNV.

TABLA 15. TASAS DE GESTACIÓN, IMPLANTACIÓN Y RNV DE EMBRIONES NO VACUOLADOS FRENTE A VACUOLADOS

	NO VACUOLADOS	VACUOLADOS	p
N gestación clínica (ciclos puros)	103	175	
Tasa de gestación clínica (%)	60,2 (50,7-69,6)	49,7 (42,3-57,1)	p=0,09
N implantación (embriones KID)	153	223	
Tasa de implantación KID (%)	49,7 (41,7-57,6)	39,9 (33,5-46,3)	P=0,06
N RNV KID	75	82	
Tasa RNV KID (%)	84,0 (75,7-92,3)	81,7 (73,3-90,1)	P=0,7

NOTA: Los resultados se dan en porcentajes. En paréntesis se muestra el IC (95%).

TABLA 16. TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONES KID EN FUNCIÓN DE VECES EN LAS QUE SE VACUOLAN

	EMBRIONES QUE SE VACUOLAN UNA VEZ	EMBRIONES QUE SE VACUOLAN 2 VECES	EMBRIONES QUE SE VACUOLAN 3 VECES	EMBRIONES QUE SE VACUOLAN 4 Ó MÁS VECES
N	41	51	54	78
KID +	14	20	22	33
(%)	34,1	39,2	40,7	42,3
p		0,6	0,5	0,4

TABLA 17. TIEMPO DE APARICIÓN DE LA PRIMERA VACUOLA

	N	Media	IC (95%)	p
KID -	136	65,7	59,4-72,0	0,051
KID +	89	55,9	48,9-63,4	

Nota: El valor de p se obtiene de la comparación entre los grupos de <28h y el de 62-100.

No parece que el tiempo de aparición de la primera vacuola determine si un embrión va a implantar más o no, pero sí es cierto que hay una media de 10 h de diferencia.

TABLA 18. KID EN FUNCIÓN DEL TIEMPO DE APARICIÓN DE LA PRIMERA VACUOLA

TIEMPO (h)	<28	28-62	62-100	>100	p
N	71	8	123	21	
T IMPLANTACIÓN KID (%)	45,1*	62,5	39,8*	9,5	P=0,47*

Tampoco se observan diferencias cuando se dividen los tiempos de aparición de vacuolas en función de la frecuencia de aparición descrita arriba

5.2.2.4- VACUOLAS EN ESTADIO DE BLASTOCISTO.

TABLA 19. EMBRIONES KID VACUOLADOS. COMPARACIÓN DE LA TASA DE IMPLANTACIÓN EN FUNCIÓN DE SI EN ESTADIO DE BLASTOCISTO PRESENTA VACUOLAS O NO

	KID NO VACUOLADOS EN BLASTOCISTO	KID VACUOLADOS EN BLASTOCISTO	p
N	78	145	
TASA IMPLANTACIÓN (%)	42,3 (31,3-53,3)	38,6 (30,7-46,5)	p=0,59

No hay diferencias entre implantación entre embriones vacuolados en blastocisto o no.

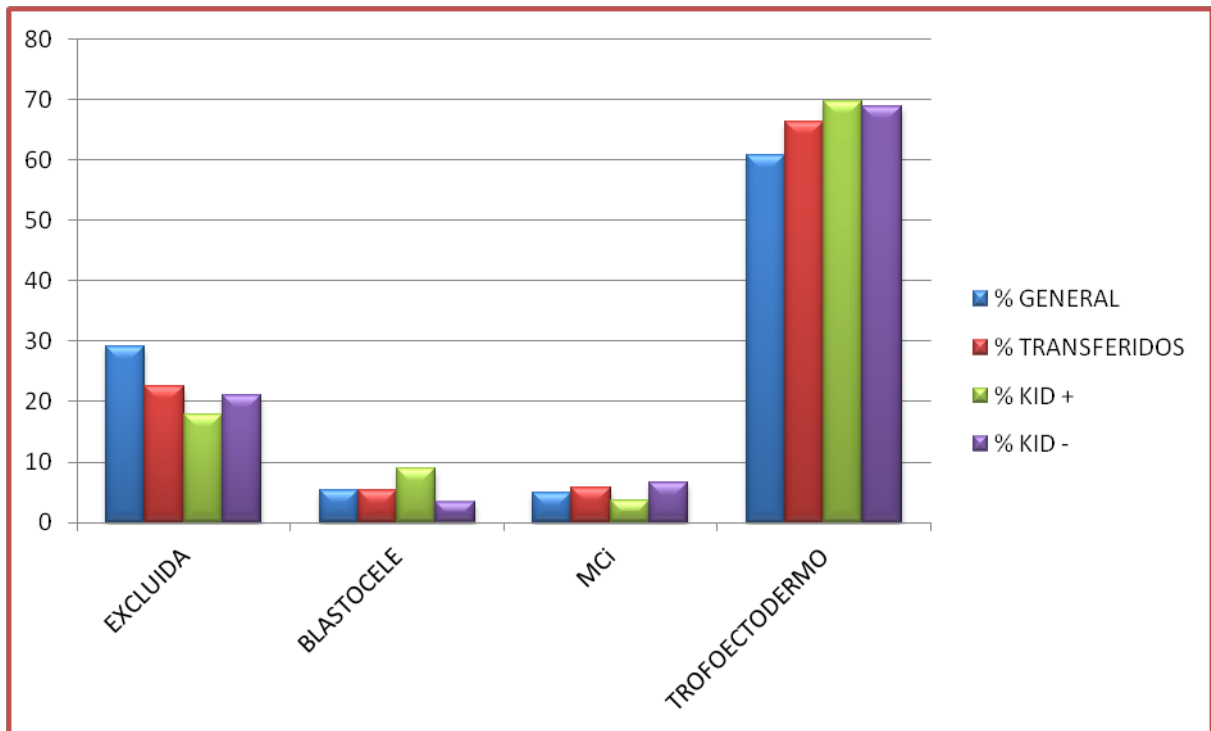


GRAFICO 13. Distribución de vacuolas en el blastocisto.

No se encuentran diferencias en cuanto a la distribución de vacuolas en el blastocisto cuando se compara: la población general, los embriones transferidos y los embriones KID.

5.2.2.5- EMBRIONES VACUOLADOS ENTRE 62-100 H.

Se ha revisado con especial interés este grupo de embriones debido a su importancia en el proceso de vacuolización espontánea que se está estudiando (n=401).

No se encuentran diferencias en cuanto a la tasa de blastocisto (89,7% vs 86,07%, NS) y blastocisto de buena calidad (62,9% VS 69,6%, P=0,06) cuando se comparan con el resto de embriones vacuolados (n=316).

5.2.2.5.1- TAMAÑO DE LAS VACUOLAS.

5.2.2.5.1.1- TASA DE BLASTOCISTO GENERAL.

	N	TAMAÑO PROMEDIO DE LA VACUOLA (µm)	p
EMBRIONES VACUOLADOS QUE LLEGAN A BC	309	15,80	p<0,00001
EMBRIONES VACUOLADOS QUE NO LLEGAN A BC	44	22,86	

Resultados: el diámetro de las vacuolas entre 62-100h influye en la formación de blastocisto

5.2.2.5.1.2- TASA DE BLASTOCISTO DE BUENA CALIDAD

	N	TAMAÑO PROMEDIO DE LA VACUOLA (µm)	p
BLASTOCISTOS DE BUENA CALIDAD	228	14,81	p<0,003
BLASTOCISTOS DE MALA CALIDAD	87	18,11	

También el tamaño de las vacuolas en este tiempo influye sobre la formación de blastocisto ok

5.2.2.5.1.3- TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONES KID.

TABLA 22. TASA DE IMPLANTACIÓN KID EN FUNCIÓN DEL DIÁMETRO DE LAS VACUOLAS ENTRE 62-100 h

	N	TAMAÑO PROMEDIO DE LA VACUOLA (μm)	p
KID -	74	15,95	P=0,13
KID +	48	13,66	

Sin embargo, no parece que influya en la implantación.

5.2.2.5.2- NUMERO DE CÉLULAS VACUOLADAS.

También en este caso vamos a elegir el tiempo 62-100 horas para ver si el n° de células vac está relacionado con Tasa de blasto general, tasa de blasto ok y tasa de implantación KID.

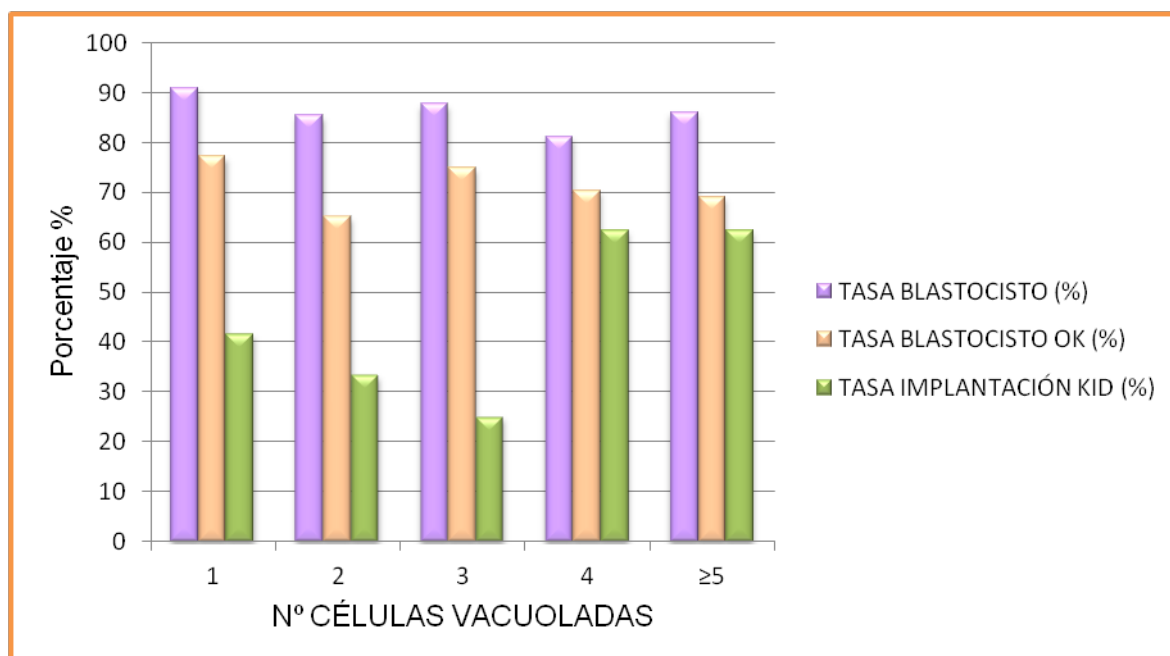


GRÁFICO 14. Tasa de blastocisto, blastocisto ok e implantación en función del número de células vacuoladas.

DISCUSIÓN

6- DISCUSIÓN.

La clasificación embrionaria es la herramienta fundamental utilizada por los embriólogos para realizar una adecuada selección de los embriones con mayor potencial implantatorio. A medida que se han conocido mejor las características de cada estadio de división, el número de embriones transferidos por ciclo de FIV ha disminuido, sin que por ello las posibilidades de gestación se hayan visto afectadas. Al contrario, la menor incidencia de los embarazos múltiples, especialmente los de 3 ó más sacos se considera un éxito para los tratamientos de RA.

En los últimos años se han introducido en los laboratorios de FIV sistemas de video-time lapse que permiten medir la cinética de las divisiones embrionarias, además de revisar la morfología clásica. Uno de estos equipos es el Embryoscope™ (Unisense Fertilitech, Dinamarca). Consta de un incubador que lleva integrado un sistema de recogida de imágenes de cada embrión en sus diferentes planos, a intervalos concretos y durante todo el tiempo que dura el cultivo. Mediante un software especialmente diseñado para tratar estas imágenes, se puede evaluar de forma objetiva la calidad embrionaria y los tiempos en los que ocurren los diferentes procesos. Gracias a esta nueva clasificación morfocinética se han establecido varios modelos de predicción de formación de blastocisto (Wong et al. 2010) y de implantación embrionaria (Meseguer et al. 2011).

Gracias a los trabajos publicados acerca de video-time lapse, se sabe que la velocidad de división es importante a la hora de predecir la formación de blastocisto y la posibilidad de implantar; de hecho, parece ser que el patrón de división no es exactamente igual para definir ambas cosas. De forma general se puede afirmar que los embriones que forman blastocisto se dividen más rápidamente que los que no alcanzan dicho estadio, y que los blastocistos que implantan presentan una cinética más rápida que los que no lo hacen. El tiempo de división a 5 células (**t5**) se ha postulado como valor predictivo de implantación (Meseguer et al. 2011).

Además de los tiempos de división, la sincronía celular es un factor importante a tener en cuenta. Los tiempos más estudiados han sido: **cc2** (tiempo de división de 2 a 3 células), **s2** (tiempo de división de 3 a 4 células) y **s3** (tiempo de división de 5 a 8 células) (Dal Canto et al. 2012; Meseguer et al. 2011; Wong et al. 2010).

Por tanto, un embrión que en D+2 tenga 4 células, no presente fragmentos y su simetría sea correcta, ya no es suficiente para incluirlo en el estándar de calidad óptimo. Se tiene que valorar también el intervalo de tiempo en el que ha llegado y si la formación de los

2 PN, el tiempo de desaparición de los mismos, y la división a 2, 3 y 4 células ha sido la adecuada.

El objetivo actualmente es llegar a la transferir un solo embrión por ciclo. La transferencia en estadio de blastocisto se postula como la más adecuada para conseguir esta máxima de “un niño sano en casa”, puesto que se conoce mejor el desarrollo embrionario, hay menor riesgo de aneuploidías y el diálogo con el útero es más fisiológico. Los últimos trabajos realizados con video-time lapse afirman que la unión de la cinética a la potencia implantatoria del blastocisto pueden mejorar todavía más los resultados de los ciclos de FIV (Dal Canto et al. 2012; Stecher et al. 2014).

Por otro lado, el conocimiento del desarrollo embrionario incluye también la determinación de factores adversos, que pueden perjudicar la formación de blastocisto y/o la implantación. Factores como la multinucleación de blastómeras han rebajado tradicionalmente la clasificación inicial de los embriones (Balaban et al. 2011; *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos* | Asebir 2015).

La llegada de los “incubadores cinematográficos” ha posibilitado también el estudio de factores dinámicos que no se habían descrito hasta ahora en los ciclos de FIV, como la **contracción del blastocisto**, o lo habían hecho parcialmente, como la presencia y/o aparición de **vacuolas** (Ebner et al. 2005; Fancsovits et al. 2011; Zamboni & Thompson, 1972). El **objetivo** del presente trabajo ha sido, precisamente, la evaluación y cuantificación de estos dos eventos en el desarrollo embrionario.

6.1- CONTRACCIÓN DEL BLASTOCISTO.

La contracción del blastocisto se ha considerado tradicionalmente uno de los dos sistemas por los que el embrión puede salir de la ZP y eclosionar para implantar en el útero, ya que diferentes especies de mamíferos, incluida la humana, la presentan. Sin embargo, no todos los embriones que se cultivan en el laboratorio se contraen para romper la ZP, y tampoco el número y/o la intensidad de la contracción es la misma. Y no se conoce si la capacidad de hacer hatching en los embriones que se contraen es mayor que en los que no lo hacen, ni su implicación en la calidad embrionaria y la capacidad de implantar.

En este trabajo se han estudiado de forma retrospectiva las contracciones donde más del 50% de la superficie de contacto del blastocisto se ha separado de la ZP.

En primer lugar se analizaron retrospectivamente **715 blastocistos transferidos de 460 transferencias** (tanto de ovocitos propios como de donación de óvulos) procedentes de

las clínicas IVI Murcia e IVI Valencia (**SERIE 1**). Un 19,4% de los embriones estudiados sufrió al menos una contracción, siendo la tasa de contracción total de un 20,8%.

Las **características descriptivas** de las pacientes con blastocistos contraídos fueron perfectamente comparables con las que no, exceptuando la media de embriones transferidos, que resultó ser estadísticamente mayor en el grupo de transferencias con al menos un blastocisto contraído (1,7 vs 1,5, $p=0,001$). Puesto que también se observa que hay significativamente más transferencias de ciclos de donación de ovocitos en el grupo que presenta contracciones, esta diferencia podría ser debida a que en las fechas en las que se realizaron las transferencias embrionarias (Junio del 2012-Mayo del 2013) la transferencia de un blastocisto en este tipo de ciclos comenzaba a practicarse, pero lo habitual era transferir dos embriones.

Otra posible causa podría ser que la **calidad embrionaria** fuera peor en el grupo de embriones contraídos y se necesitara transferir un número mayor de embriones. Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre los grupos cuando se compara la calidad en D+2, D+3 y D+5.

La contracción del blastocisto se ha postulado como uno de los mecanismos por los cuales el blastocisto rompe la ZP y eclosiona. Sin embargo, tampoco se encuentran diferencias entre estos dos grupos cuando se evalúa la **tasa de BHi** (28,7% no contraídos vs 31,4% contraídos, NS). Parece ser por tanto que la contracción del blastocisto no favorece el hatching del blastocisto.

En cuanto a los **parámetros cinéticos t2, t3, t4, tM y tB**, se observa que los embriones que no se contraen se dividen más lentamente que los que sí lo hacen, aunque no se conoce con exactitud si hay una relación entre la cinética del desarrollo anterior al blastocisto y la mayor o menor incidencia de las contracciones, puesto que son eventos dinámicos que ocurren a diferentes tiempos.

Cuando se analiza el **tiempo de inicio de la contracción** de los blastocistos contraídos transferidos, no se observan diferencias entre aquellos que implantan y los que no lo hacen (109 vs 110,9h, $p=0,41$). Tampoco el **tiempo que dura la contracción** es diferente entre ambos grupos (1,50 vs 1,88 h, $p=0,29$).

Respecto a los **resultados clínicos**, no se encuentran diferencias en cuanto a tasa de gestación, gestación clínica y gestación en curso, Sin embargo, la posibilidad de implantar de los blastocistos contraídos es estadísticamente menor que la de los que no se contraen (35,1% frente a 48,5% respectivamente, $p=0,02$). Según estos datos, parece que la contracción brusca de los blastocistos podría deberse a un defecto en el mecanismo de

hatching habitual del embrión y supondría un “plan de emergencia” alternativo que no siempre funciona. También la calidad del embrión podría verse afectada, debido probablemente al mayor consumo de energía en el proceso de contracción y expansión (Niimura 2003).

Mediante un análisis de **regresión logística**, se constata que tanto el factor edad (OR 0,93, CI95% 0,88-0,98/año, $p=0,006$) como el tipo de ciclo (ovocitos propios o donados, OR 2,19, CI5% 1,19-4,01, $p=0,01$) están fuertemente relacionados con la implantación. También la contracción del blastocisto parece ser que está modulando este proceso, aunque de forma menor (OR 0,55, CI95% 0,32-0,94).

6.2- VALIDACIÓN DE LOS DATOS.

Para validar estos resultados, y descartar que los resultados obtenidos para la contracción del blastocisto se debiera a factores como el medio de cultivo o las condiciones de desarrollo, se registró, también de forma retrospectiva, una segunda serie de datos de **340 transferencias de 499 blastocistos** procedentes de **donación de ovocitos** exclusivamente (**SERIE 2**), realizadas en IVI Zaragoza entre Octubre de 2011 y Diciembre de 2014.

La **incidencia** de blastocistos contraídos en esta segunda serie es ligeramente superior a la primera (25,1% frente a 20,8%). Dado que se ha visto que hay más transferencias de embriones contraídos en los ciclos de donación de embriones, esta podría ser la explicación.

Se confirma que en un laboratorio diferente, con medios y condiciones de cultivo distintos, **la tasa de implantación se reduce significativamente** cuando los blastocistos se contraen (47% no contraídos vs 33,7%, $p=0,02$).

En esta serie de datos, a diferencia de la anterior, donde solamente se observa una tendencia, **la tasa de gestación** es significativamente menor en las transferencias con embriones contraídos (57,8% no contraídos vs 38,3% contraídos, $p=0,007$). Sin embargo, tanto la tasa de gestación en curso como la de nacidos vivos no es estadísticamente diferente, lo que sugiere que la contracción está exclusivamente asociada a la posibilidad de eclosión e implantación del embrión y no a su desarrollo posterior.

Se ha medido la **tasa de BHi** de los blastocistos transferidos y tampoco en este grupo de donación de ovocitos se encuentran diferencias estadísticas cuando se compara GC+ vs GC-, por lo que se confirma que la contracción no es un mecanismo que realmente ayude al embrión a romper la ZP. Estudios realizados en ratón apoyan esa teoría, ya que

muestran que las contracciones de más del 50% reducen la posibilidad de hatching (Niimura et al, 2003). En el caso de los ciclos de FIV, la tasa de BH no se puede medir al realizar la transferencia embrionaria antes de que el blastocisto eclosione totalmente, pero la posibilidad de que se produzca un fallo en este proceso podría ser una causa para explicar la menor implantación.

En cuanto la **duración de la contracción**, al comparar blastocistos contraídos KID que implantan frente a los que no en esta segunda serie de datos, se confirma también que es semejante (2,07 vs 2,08 h, NS). No parece por tanto que el tiempo que necesita el blastocisto para contraerse y re-expandirse afecte a los resultados de implantación.

Sin embargo, y en oposición a las conclusiones obtenidas en la SERIE 1, donde no se encuentran diferencias, los resultados del **tiempo en el que comienza la contracción** sí muestran significación estadística en la SERIE 2, puesto que se observa que los embriones contraídos que implantan se contraen mucho antes que los que no lo hacen (111,2 h KID + vs 119,89 h KID-, $p=0,0002$). De hecho, la diferencia del tiempo de inicio de contracción entre las dos series es relativamente diferente. En la SERIE 1, el tiempo en el que los blastocistos comienzan a contraerse es menor que el de la SERIE 2 (109 vs 111,2 h para embriones implantados y 110,9 vs 119,89 para embriones no implantados). Esta diferencia encontrada en ambos grupos podría deberse a los diferentes medios y condiciones de cultivo utilizados, a la calidad embrionaria o al origen ovocitario, que en la SERIE 2 es exclusivamente de ovocitos donados.

Para intentar buscar alguna relación con calidad embrionaria, se dividieron **todos los blastocistos contraídos** ($n=323$) de la segunda serie de datos (ovocitos donados) según su calidad en estadio de blastocisto, en los cuatro grupos anteriormente descritos: A, B, C y D en función del tiempo de inicio de la contracción. Se puede observar que los tiempos de inicio de contracción son estadísticamente diferentes en función de la calidad del blastocisto. Lo mismo ocurre cuando se comparan los tiempos de inicio de contracción en función de calidad embrionaria para los embriones KID. Por tanto, parece ser que el tiempo de inicio de la contracción influye en la calidad embrionaria, y afecta a la implantación.

6.3- VACUOLAS.

Las vacuolas son inclusiones citoplasmáticas rellenas de líquido similar al del espacio perivitelino. Es un dismorfismo relativamente frecuente en los ciclos de FIV, y gracias a los sistemas de video-time lapse se ha podido comprobar que su comportamiento es muy dinámico, pues puede aparecer y desaparecer espontáneamente en cualquier

momento del desarrollo, o ir aumentando a medida que el embrión se divide. Incluso las vacuolas se pueden fusionar entre sí para formar otras más grandes.

El aspecto más estudiado de las vacuolas es su presencia en ovocitos, reportando hasta un 12,4% de incidencia en este estadio (Loutradis et al. 1999). Se ha relacionado con menor tasa de fecundación, disminución de calidad embrionaria e implantación, aunque las conclusiones obtenidas por los diferentes artículos son contradictorias (Alikani et al., 1995; De Sutter, Dozortsev, Qian, & Dhont, 1996, Rienzi, Vajta, y Ubaldi 2011; Rienzi et al. 2008) y muchas veces se incluyen dentro del apartado genérico de “dismorfismos ovocitarios”. Parece ser que diámetros de vacuolas mayores de 14 μm dificultan la fecundación (Ebner et al. 2005).

El segundo objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la aparición espontánea de vacuolas a lo largo del desarrollo embrionario, e intentar conocer algo más acerca de su influencia en la calidad embrionaria y la implantación. Se han estudiado retrospectivamente un total de **1354 embriones** y **499 transferencias** de blastocisto en pacientes del programa de donación de ovocitos de IVI Zaragoza (**SERIE 2**). De ellos, 736 presentaron al menos una vacuola en algún estadio de desarrollo. De los 376 embriones KID de esta serie, 223 se vacuolaron.

En este trabajo, la presencia de vacuolas en ovocitos es de un 3,9% en toda la población de embriones estudiada. La presencia de ovocitos vacuolados desde un principio es baja, ya que se trata de gametos de pacientes jóvenes y de buena calidad (donantes).

Sin embargo, el objetivo fundamental ha sido evaluar la **aparición espontánea de vacuolas**, que en esta serie de datos ha tenido una **incidencia del 54,3%**. El único artículo publicado acerca de vacuolización espontánea reporta un 36,6% de embriones vacuolados (Ebner et al. 2005). Probablemente la diferencia se deba a que la clasificación dinámica permite observar mucho más que la clasificación estática; parece ser, por tanto, que la aparición de vacuolas no es un fenómeno tan extraño en el desarrollo embrionario, cuando su presencia en los embriones de mayor potencial implantatorio (al proceder de donación de ovocitos) afecta a más de la mitad de los mismos.

Cuando se evalúa la distribución de la **primera aparición de vacuolas** en función de los diferentes estadios embrionarios en **toda la población** de embriones analizados (n=736), hay dos fases en las que la actividad vacuolar es mayor:

- La fase de **fecundación**, desde la extrusión del 2º CP, formación de PN y desaparición de los mismos, donde se observa una incidencia del 23,1% en la población

general de embriones estudiada. El diámetro medio es de 12,45 μm (siendo el menor registrado 1,97 μm y el mayor 27,72 μm).

- La fase entre **D+3-D+4** de desarrollo, en la franja horaria entre 62 y 100h, donde la mayoría de los embriones se dividen desde los estadios de **8 ó más células a MC**. La incidencia registrada en estos estadios en cuanto a la aparición de vacuolas es de un 10,2% para embriones de 8 células, un 27,4% para embriones de 9 ó más células y de un 16,8% para MC. El diámetro medio en estos estadios es de 18,64 μm (siendo el menor registrado de 3 μm y el mayor de 113 μm). En estas etapas del desarrollo, muy frecuentemente ocurre que una célula comienza a vacuolarse al final del estadio de 8 células, y a medida que se va dividiendo el número de células vacuoladas aumenta, a la vez que el tamaño de las vacuolas.

Los resultados obtenidos están en consonancia con los publicados por Ebner, que encontró también una mayor actividad de vacuolas en cigotos (un 11,6% en los cigotos procedentes de ICSI) y en D+4 (10,9%).

Esta distribución de la primera aparición de vacuolas se mantiene constante cuando se analizan los **embriones transferidos** (n= 298), con la diferencia de que los embriones transferidos presentan mayor vacuolización en 2 células que en cigoto (18,1% vs 11,4%, $p < 0,0001$).

No se encuentran diferencias en cuanto a los **embriones KID vacuolados** cuando se dividen en KID+ y KID- (n=223) siendo su distribución similar a la descrita anteriormente.

En cuanto al registro del proceso de **vacuolización a lo largo del tiempo**, se puede observar que tanto en la población general, como en la de embriones transferidos y en la de embriones KID, la aparición de vacuolas es un proceso dinámico, que a medida que pasa el tiempo se va acumulando en los estadios tardíos de desarrollo.

Otro de los objetivos del estudio ha sido relacionar **calidad embrionaria** con presencia o ausencia de vacuolas. A la vista de los resultados, parece ser que las vacuolas no afectan al desarrollo embrionario, puesto que la tasa de blastocistos de buena calidad es similar entre embriones no vacuolados y vacuolados (72,4% vs 74,2%, NS). Curiosamente, la presencia de vacuolas no afecta al porcentaje de embriones descartados (18,5% frente a un 37,2% en embriones no vacuolados, $p < 0,0001$).

En cuanto a los **blastocistos transferidos**, tampoco se han encontrado diferencias de calidad embrionaria entre embriones vacuolados y no vacuolados.

En cuanto a los **resultados clínicos**, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en cuanto a **tasa de gestación** (60,2% en embriones no

vacuolados vs 49,7% en vacuolados, $p=0,09$), aunque hay una diferencia de 10 puntos entre ambos grupos. Lo mismo ocurre con la **tasa de implantación** (49,7% embriones no vacuolados vs 39,9% en vacuolados, $p=0,06$). Por tanto, no se puede afirmar que la presencia de vacuolas afecte a la gestación e implantación, aunque ciertamente hay una tendencia negativa que podría confirmarse si se estudiara un grupo mayor de embriones.

La tasa de Nacidos Vivos es similar entre ambos grupos (84% en no vacuolados frente a 81,7% en vacuolados, $p= 0,7$).

Cuando se analizan de forma más exhaustiva los datos de **implantación en embriones vacuolados** (comparando embriones vacuolados KID+ vs KID-), se puede ver que los embriones vacuolados implantan de la misma forma independientemente del **número de veces que se vacuolen**.

En cuanto al **primer tiempo de aparición de vacuolas**, tampoco se observan diferencias entre los embriones vacuolados que implantan frente a los que no lo hacen (55,9h KID+ vs 65,7 h KID-, $p=0,051$), aunque los valores están muy cerca de la significancia estadística. Curiosamente, el tiempo medio de aparición de la primera vacuola en embriones KID- se corresponde con los estadios anteriormente mencionados como de mayor actividad vacuolar (final D+3-D+4).

Cuando se dividen los embriones KID en función del tiempo de aparición de vacuolas (<28h, 28-62 h, 62-100 h, >100 h) la significación disminuye, debido probablemente a la fragmentación del tamaño muestral.

Se ha estudiado también la implicación de la **presencia de vacuolas en el blastocisto**. Como se puede deducir de los datos obtenidos, no se encuentran diferencias entre la tasa de implantación de embriones vacuolados en blastocisto frente a embriones vacuolados en el resto de estadios embrionarios (38,6% vs 42,3%, $p=0,59$).

La **distribución de vacuolas en el blastocisto** se corresponde con los datos publicados anteriormente (Ebner et al. 2005). La mayoría de vacuolas se localizan principalmente en el Trofoectodermo (entre un 60 y un 70%). Entre un 18 y un 30% se encuentran en células excluidas del blastocisto, y menos de un 10% en la MCi o el blastocele. Esta distribución tan definida de las vacuolas podría ser un mecanismo para minimizar el impacto de las mismas en la implantación.

Se ha estudiado de forma más exhaustiva el grupo de embriones que se vacuolan por primera vez entre 62-100h (es decir, **de 8 células a MC**), puesto que tanto por

bibliografía como por los resultados obtenidos en el presente estudio las vacuolas desempeñan un papel importante en estos estadios.

A diferencia de Ebner, los datos del estudio no encuentran diferencias en cuanto a la tasa de blastocisto y blastocisto de buena calidad cuando se comparan los datos de este grupo con el resto de embriones vacuolados.

En cuanto al **tamaño de las vacuolas** en este grupo, se puede observar que hay diferencias significativas en cuanto a la formación del blastocisto y blastocisto de buena calidad en función del diámetro de las vacuolas; Sin embargo, la implantación no parece estar afectada, ya que los tamaños de las vacuolas son semejantes.

Respecto al **número de células vacuoladas** en este grupo, los resultados en cuanto a tasa de blastocisto, tasa de blastocisto ok y tasa de implantación son semejantes.

CONCLUSIONES

7- CONCLUSIONES.

El presente trabajo realizado sobre la contracción del blastocisto y la evaluación de la aparición de vacuolas, ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

1- Los sistemas de video-time lapse como el Embryoscope™ (Unisense Fertilitech) son una herramienta muy eficaz para evaluar procesos dinámicos que ocurren a lo largo del desarrollo embrionario; en concreto, la contracción del blastocisto y la aparición de vacuolas.

2- La tasa de implantación en blastocistos contraídos en más del 50% de su superficie es menor que la de aquellos que no se contraen, independientemente del medio o las condiciones de cultivo utilizadas.

3- La tasa de BHi es similar en ambos grupos, por lo que la contracción no parece ser un mecanismo que ayude a la eclosión del blastocisto. Más al contrario, se postula que puede ser un mecanismo alternativo al proceso habitual de hatching, que no siempre funciona.

4- La duración de la contracción no parece afectar a los resultados de implantación.

5- El tiempo en el que se inicia la contracción ha presentado resultados contradictorios en las dos series de datos analizadas. Se necesitan más datos para conocer si este tiempo depende del tipo de medio utilizado, de las condiciones de cultivo, o del tipo de paciente.

6- Gracias al Embryoscope, se ha podido constatar que la aparición de vacuolas a lo largo del desarrollo embrionario es un proceso más frecuente de lo que se ha publicado hasta ahora.

7- La presencia de vacuolas en los embriones no parece afectar a la calidad embrionaria.

8- La tasa de gestación e implantación en embriones vacuolados no presenta diferencias estadísticas cuando se compara con embriones no vacuolados, aunque clínicamente sí muestra una disminución importante en ambos parámetros.

9- No parece ser que la presencia de vacuolas en el blastocisto afecte a la implantación. El hecho de que la mayoría de ellas se encuentre en el trofoectodermo o en células excluidas puede ser un mecanismo protector de la viabilidad del blastocisto.

10- La franja horaria entre 62-100 h (desde 8 células a MC) se revela como uno de los intervalos de tiempo donde más frecuentemente aparecen las vacuolas. Siendo que es

en estos momentos donde se produce el imprinting genómico, y el embrión afronta el nuevo reto de compactar y formar el blastocisto, las vacuolas podrían ser el reflejo de alguna disfunción en cualquiera de estos procesos.

11- A la vista de los resultados de este trabajo, se plantea incluir la contracción de blastocistos en la clasificación embrionaria de rutina, como un factor negativo a tener en cuenta. De la misma manera, se confirma que la aparición de vacuolas disminuye la viabilidad clínica del embrión, aunque habría que revisar las categorías establecidas para este dismorfismo, ya que cabe la posibilidad de que su clasificación actual sea inferior a la que en realidad es.

BIBLIOGRAFIA

- Agca, C., & Agca, Y. (2014). Molecular and ultrastructural changes of rat pre-implantation embryos during two-cell developmental arrest. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(6), 767-780. <http://doi.org/10.1007/s10815-014-0213-4>
- Aguilar, J., Motato, Y., Escribá, M. J., Ojeda, M., Muñoz, E., & Meseguer, M. (2014). The human first cell cycle: impact on implantation. *Reproductive biomedicine online*, 28(4), 475-84. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.11.014>
- Alberts, B; Bray, D; Lewis J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. (1987). *BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA CÉLULA*.
- Alikani, M., Palermo, G., Adler, A., Bertoli, M., Blake, M., & Cohen, J. (1995). Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote (Cambridge, England)*, 3(4), 283-8. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8730892>
- American Society for Reproductive Medicine. (2012). Elective single-embryo transfer. *Fertility and sterility*, 97(4), 835-42. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.11.050>
- Aparicio, B., Cruz, M., & Meseguer, M. (2013). Is morphokinetic analysis the answer? *Reproductive biomedicine online*, 27(6), 654-63. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.07.017>
- Azzarello, A., Hoest, T., & Mikkelsen, A. L. (2012). The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(9), 2649-57. <http://doi.org/10.1093/humrep/des210>
- Balaban, B., Brison, D., Calderón, G., Catt, J., Conaghan, J., Cowan, L., ... Van Den Abbeel, E. (2011). Istanbul consensus workshop on embryo assessment: Proceedings of an expert meeting. *Reproductive BioMedicine Online*, 22(6), 632-646. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.02.001>
- Baltz, J. M., Smith, S. S., Biggers, J. D., & Lechene, C. (1997). Intracellular ion concentrations and their maintenance by Na⁺/K⁺-ATPase in preimplantation mouse embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, 5(1), 1-9. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9223240>
- Bartoov, B., Berkovitz, A., & Eltes, F. (2001). Selection of spermatozoa with normal nuclei to improve the pregnancy rate with intracytoplasmic sperm injection. *The New England journal of medicine*, 345(14), 1067-8. <http://doi.org/10.1056/NEJM200110043451416>
- bartoov, 2001. (s. f.).
- Basile, N., Morbeck, D., García-Velasco, J., Bronet, F., & Meseguer, M. (2013). Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes. *Human reproduction (Oxford, England)*, 28(3), 634-41. <http://doi.org/10.1093/humrep/des462>
- Basile, N., Nogales, M. del C., Bronet, F., Florensa, M., Riqueiros, M., Rodrigo, L., ... Meseguer, M. (2014). Increasing the probability of selecting chromosomally normal embryos by time-lapse morphokinetics analysis. *Fertility and sterility*, 101(3), 699-704. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.005>

- Bettencourt, E. M. V., Bettencourt, C. M. V., e Silva, J. N. C., Ferreira, P., Oliveira, E., Romão, R., ... Sousa, M. (2014). Ultrastructural characterization of in vivo-produced ovine morulae and blastocysts. *Zygote*, 1-11. <http://doi.org/10.1017/S0967199414000264>
- BOE núm. 180 Martes 27 julio 2004 27179. (2004). *REAL DECRETO 1720/2004, de 23 de julio, por el que se establecen las tipologías fisiopatológicas que permiten la superación de los límites generales establecidos para la fecundación de ovocitos en procesos de reproducción asistida.*
- Boitrelle, F., Albert, M., Petit, J.-M., Ferfour, F., Wainer, R., Bergere, M., ... Selva, J. (2013). Small human sperm vacuoles observed under high magnification are pocket-like nuclear concavities linked to chromatin condensation failure. *Reproductive biomedicine online*, 27(2), 201-11. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.05.004>
- Cabello, Y., Gómez-Palomares, J. L., Castilla, J. A., Hernández, J., Marqueta, J., Pareja, A., ... Coroleu, B. (2010). Impact of the Spanish Fertility Society guidelines on the number of embryos to transfer. *Reproductive biomedicine online*, 21(5), 667-75. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.05.020>
- Campbell, A., Fishel, S., Bowman, N., Duffy, S., Sedler, M., & Hickman, C. F. L. (2013). Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reproductive biomedicine online*, 26(5), 477-85. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.02.006>
- Cetinkaya, M., Pirkevi, C., Yelke, H., Colakoglu, Y. K., Atayurt, Z., & Kahraman, S. (2015). Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(1), 27-35. <http://doi.org/10.1007/s10815-014-0341-x>
- Chamayou, S., Patrizio, P., Storaci, G., Tomaselli, V., Alecci, C., Ragolia, C., ... Guglielmino, A. (2013). The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(5), 703-10. <http://doi.org/10.1007/s10815-013-9992-2>
- Chavez, S. L., Loewke, K. E., Han, J., Moussavi, F., Colls, P., Munne, S., ... Reijo Pera, R. a. (2012). Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nature Communications*, 3, 1251. <http://doi.org/10.1038/ncomms2249>
- Chawla, M., Fakhri, M., Shunnar, A., Bayram, A., Hellani, A., Perumal, V., ... Budak, E. (2015). Morphokinetic analysis of cleavage stage embryos and its relationship to aneuploidy in a retrospective time-lapse imaging study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(1), 69-75. <http://doi.org/10.1007/s10815-014-0372-3>
- Ciray, H. N., Aksoy, T., Goktas, C., Ozturk, B., & Bahceci, M. (2012). Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 29(9), 891-900. <http://doi.org/10.1007/s10815-012-9818-7>
- Clua, E., Tur, R., Coroleu, B., Boada, M., Barri, P. N., & Veiga, A. (2010). Analysis of factors associated with multiple pregnancy in an oocyte donation programme. *Reproductive*

biomedicine online, 21(5), 694-9. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.06.023>

- Clua, E., Tur, R., Coroleu, B., Rodríguez, I., Boada, M., Gómez, M. J., ... Veiga, A. (2015). Is it justified to transfer two embryos in oocyte donation? A pilot randomized clinical trial. *Reproductive biomedicine online*, 31(2), 154-61. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.04.013>
- Cole, R. J. (1967). Cinemicrographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *Journal of embryology and experimental morphology*, 17(3), 481-90. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6069181>
- Conaghan, J., Chen, A. A., Willman, S. P., Ivani, K., Chenette, P. E., Boostanfar, R., ... Shen, S. (2013). Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and sterility*, 100(2), 412-9.e5. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.04.021>
- Criniti, A., Thyer, A., Chow, G., Lin, P., Klein, N., & Soules, M. (2005). Elective single blastocyst transfer reduces twin rates without compromising pregnancy rates. *Fertility and sterility*, 84(6), 1613-9. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.06.035>
- Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos | Asebir*. (2015). Recuperado a partir de <http://asebir.com/cuadernos-asebir/criterios-asebir-de-valoracion-morfologica-de-oocitos-embriones-tempranos-y-blastocistos-humanos/>
- Cruz, M., Gadea, B., Garrido, N., Pedersen, K. S., Martínez, M., Pérez-Cano, I., ... Meseguer, M. (2011). Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 28(7), 569-73. <http://doi.org/10.1007/s10815-011-9549-1>
- Cruz, M., Garrido, N., Gadea, B., Muñoz, M., Pérez-Cano, I., & Meseguer, M. (2013). Oocyte insemination techniques are related to alterations of embryo developmental timing in an oocyte donation model. *Reproductive biomedicine online*, 27(4), 367-75. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.017>
- Cruz, M., Garrido, N., Herrero, J., Pérez-Cano, I., Muñoz, M., & Meseguer, M. (2012). Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive biomedicine online*, 25(4), 371-81. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.06.017>
- Dal Canto, M., Coticchio, G., Mignini Renzini, M., De Ponti, E., Novara, P. V., Brambillasca, F., ... Fadini, R. (2012). Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reproductive biomedicine online*, 25(5), 474-80. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.07.016>
- De Sutter, P., Dozortsev, D., Qian, C., & Dhont, M. (1996). Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, 11(3), 595-7. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8671274>
- Desai, N., Ploskonka, S., Goodman, L. R., Austin, C., Goldberg, J., & Falcone, T. (2014).

- Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 12, 54. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-12-54>
- Dunglison GF1, Jane SD, McCaul TF, Chad JE, Fleming TP, K. P. (1995). Stimulation of endocytosis in mouse blastocysts by insulin: a quantitative morphological analysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 105(1), 115-23. <http://doi.org/10.1076/phbi.41.1.1.14693>
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., Gaiswinkler, U., Shebl, O., Jesacher, K., & Tews, G. (2005). Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. *Fertility and Sterility*, 83(6), 1635-1640. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.02.009>
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M., & Tews, G. (2003). Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human reproduction update*, 9(3), 251-262. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmg021>
- Esinler, I., Bozdog, G., & Karakoc Sokmensuer, L. (2014). Mandatory single embryo transfer policy dramatically decreases multiple pregnancy rates. *The journal of obstetrics and gynaecology research*, 40(1), 75-9. <http://doi.org/10.1111/jog.12124>
- Eskelinen, E. L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*, 1(1), 1-10. <http://doi.org/10.4161/auto.1.1.1270>
- Fanchin, R., Ayoubi, J. M., Righini, C., Olivennes, F., Schönauer, L. M., & Frydman, R. (2001). Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(6), 1115-1119. <http://doi.org/10.1093/humrep/16.6.1115>
- Fancsovits, P., Murber, Á., Gilán, Z. T., Rigó, J., & Urbancsek, J. (2011). Human oocytes containing large cytoplasmic vacuoles can result in pregnancy and viable offspring. *Reproductive BioMedicine Online*, 23(4), 513-516. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.06.008>
- Fernández-Shaw, S., Cercas, R., Braña, C., Villas, C., & Pons, I. (2015). Ongoing and cumulative pregnancy rate after cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer using vitrification for cryopreservation: impact of age on the results. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(2), 177-84. <http://doi.org/10.1007/s10815-014-0387-9>
- Frith, L., & Blyth, E. (2014). Assisted reproductive technology in the USA: Is more regulation needed? *Reproductive biomedicine online*, 29(4), 516-23. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.06.018>
- Garcia-Velasco, Juan A et al. 2011. «Cycle scheduling with oral contraceptive pills in the GnRH antagonist protocol vs the long protocol: a randomized, controlled trial.» *Fertility and sterility* 96(3): 590-93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718992> (3 de octubre de 2015).

- Gardner, D. K., Schoolcraft, W. B., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., & Hesla, J. (1998). A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in- vitro fertilization [see comments]. *Human Reproduction*, 13(12), 3434-3440.
- Gardner, D. K., Vella, P., Lane, M., Wagley, L., Schlenker, T., & Schoolcraft, W. B. (1998). Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility*, 69(1), 84-88. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(97\)00438-X](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(97)00438-X)
- Garrido, N et al. 2002. «Sperm and oocyte donor selection and management: experience of a 10 year follow-up of more than 2100 candidates.» *Human reproduction (Oxford, England)* 17(12): 3142-48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456614> (2 de septiembre de 2015).
- Gawriluk, T. R., Hale, A. N., Flaws, J. a., Dillon, C. P., Green, D. R., & Rucker, E. B. (2011). Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction*, 141(6), 759-765. <http://doi.org/10.1530/REP-10-0489>
- Gianaroli, L., Racowsky, C., Geraedts, J., Cedars, M., Makrigiannakis, A., & Lobo, R. A. (2012). Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. *Fertility and sterility*, 98(6), 1380-94. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1164>
- Glass, R. H., Lin, T. P., & Florence, J. (1973). Mouse blastocyst re-expansion following puncture and treatment with inhibitors. *Journal of reproduction and fertility*, 35(3), 533-6. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4760151>
- Glujovsky, D., Blake, D., Farquhar, C., & Bardach, A. (2012). Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *The Cochrane database of systematic reviews*, 7, CD002118. <http://doi.org/10.1002/14651858.CD002118.pub4>
- Gonzales, D. S., & Bavister, B. D. (1995). Zona pellucida escape by hamster blastocysts in vitro is delayed and morphologically different compared with zona escape in vivo. *Biology of reproduction*, 52(2), 470-80. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7711216>
- Gremeau, A.-S., Brugnon, F., Bouraoui, Z., Pekrishvili, R., Janny, L., & Pouly, J.-L. (2012). Outcome and feasibility of elective single embryo transfer (eSET) policy for the first and second IVF/ICSI attempts. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 160(1), 45-50. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.09.032>
- Grifo, J., Kofinas, J., & Schoolcraft, W. B. (2014). The practice of in vitro fertilization according to the published literature. *Fertility and sterility*, 102(3), 3-4. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.021>
- Hardarson, T., Löfman, C., Coull, G., Sjögren, A., Hamberger, L., & Edwards, R. G. (2002). Internalization of cellular fragments in a human embryo: time-lapse recordings. *Reproductive biomedicine online*, 5(1), 36-8. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470543>

- Hashimoto, S., Kato, N., Saeki, K., & Morimoto, Y. (2012). Selection of high-potential embryos by culture in poly(dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertility and Sterility*, *97*(2), 332-337. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.11.042>
- Herrero, J., & Meseguer, M. (2013). Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertility and sterility*, *99*(4), 1030-4. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.089>
- Herrero, J., Tejera, A., Albert, C., Vidal, C., de los Santos, M. J., & Meseguer, M. (2013). A time to look back: analysis of morphokinetic characteristics of human embryo development. *Fertility and sterility*, *100*(6), 1602-9.e1-4. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.08.033>
- Isachenko, V., Selman, H., Isachenko, E., Montag, M., El-Danasouri, I., & Nawroth, F. (2003). Modified vitrification of human pronuclear oocytes: efficacy and effect on ultrastructure. *Reproductive biomedicine online*, *7*(2), 211-216. [http://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61754-3](http://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61754-3)
- Iwata, K., Yumoto, K., Sugishima, M., Mizoguchi, C., Kai, Y., Iba, Y., & Mio, Y. (2014). Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *31*(4), 421-6. <http://doi.org/10.1007/s10815-014-0195-2>
- Johnston, J., Gusmano, M. K., & Patrizio, P. (2014). Preterm births, multiples, and fertility treatment: recommendations for changes to policy and clinical practices. *Fertility and sterility*, *102*(1), 36-9. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.03.019>
- Kanninen, T. T., De Andrade Ramos, B. R., & Witkin, S. S. (2013). The role of autophagy in reproduction from gametogenesis to parturition. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, *171*(1), 3-8. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.07.020>
- Kaser, D. J., & Racowsky, C. (2014). Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: A systematic review. *Human Reproduction Update*, *20*(5), 617-631. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmu023>
- Khalili, M. a., Maione, M., Palmerini, M. G., Bianchi, S., Macchiarelli, G., & Nottola, S. a. (2012). Ultrastructure of human mature oocytes after vitrification. *European Journal of Histochemistry*, *56*(3). <http://doi.org/10.4081/ejh.2012.e38>
- Kirkegaard, K., Hindkjaer, J. J., Grøndahl, M. L., Kesmodel, U. S., & Ingerslev, H. J. (2012). A randomized clinical trial comparing embryo culture in a conventional incubator with a time-lapse incubator. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *29*(6), 565-572. <http://doi.org/10.1007/s10815-012-9750-x>
- Kirkegaard, K., Kesmodel, U. S., Hindkjær, J. J., & Ingerslev, H. J. (2013). Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Human reproduction (Oxford, England)*, *28*(10), 2643-51. <http://doi.org/10.1093/humrep/det300>
- Kissin, D. M., Kulkarni, A. D., Mneimneh, A., Warner, L., Boulet, S. L., Crawford, S., & Jamieson, D. J. (2015). Embryo transfer practices and multiple births resulting from

- assisted reproductive technology: an opportunity for prevention. *Fertility and sterility*, 103(4), 954-61. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.127>
- Kramer, Y. G., Kofinas, J. D., Melzer, K., Noyes, N., McCaffrey, C., Buldo-Licciardi, J., ... Grifo, J. A. (2014). Assessing morphokinetic parameters via time lapse microscopy (TLM) to predict euploidy: are aneuploidy risk classification models universal? *Journal of assisted reproduction and genetics*, 31(9), 1231-42. <http://doi.org/10.1007/s10815-014-0285-1>
- Kupka, M. S., Ferraretti, A. P., de Mouzon, J., Erb, K., D'Hooghe, T., Castilla, J. A., ... Goossens, V. (2014). Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE†. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29(10), 2099-113. <http://doi.org/10.1093/humrep/deu175>
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology*, 67(1), 73-80. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.014>
- Law, A., McCoy, M., Lynen, R., Curkendall, S. M., Gatwood, J., Juneau, P. L., & Landsman-Blumberg, P. (2015). The prevalence of complications and healthcare costs during pregnancy. *Journal of medical economics*, 18(7), 533-41. <http://doi.org/10.3111/13696998.2015.1016229>
- Lee, S. E., Hwang, K. C., Sun, S. C., Xu, Y. N., & Kim, N. H. (2011). Modulation of autophagy influences development and apoptosis in mouse embryos developing in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 78(7), 498-509. <http://doi.org/10.1002/mrd.21331>
- Lemmen, J. G., Agerholm, I., & Ziebe, S. (2008). Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reproductive biomedicine online*, 17(3), 385-91. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18765009>
- Lewis, W. H., & Gregory, P. W. (1929). CINEMATOGRAPHS OF LIVING DEVELOPING RABBIT-EGGS. *Science (New York, N.Y.)*, 69(1782), 226-9. <http://doi.org/10.1126/science.69.1782.226-a>
- Lim, H. J., & Song, H. (2014). Evolving tales of autophagy in early reproductive events. *International Journal of Developmental Biology*, 58(2-4), 183-187. <http://doi.org/10.1387/ijdb.130337hl>
- López-Regalado, M. L., Clavero, A., Gonzalvo, M. C., Serrano, M., Martínez, L., Mozas, J., ... Castilla, J. A. (2014). Randomised clinical trial comparing elective single-embryo transfer followed by single-embryo cryotransfer versus double embryo transfer. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 178, 192-8. <http://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.04.009>
- Loutradis, D., Drakakis, P., Kallianidis, K., Milingos, S., Dendrinou, S., & Michalas, S. (1999). Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility*, 72(2), 240-244. [http://doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00233-2](http://doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00233-2)

- Lu, Y.-C., Ding, G.-L., Yang, J., Zhang, Y.-L., Shi, S., Zhang, R.-J., ... Huang, H.-F. (2012). Small-conductance calcium-activated K(+) channels 3 (SK3) regulate blastocyst hatching by control of intracellular calcium concentration. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(5), 1421-30. <http://doi.org/10.1093/humrep/des060>
- Luke, B., Brown, M. B., Wantman, E., Stern, J. E., Baker, V. L., Widra, E., ... Ball, G. D. (2015). Application of a validated prediction model for in vitro fertilization: comparison of live birth rates and multiple birth rates with 1 embryo transferred over 2 cycles vs 2 embryos in 1 cycle. *American journal of obstetrics and gynecology*, 212(5), 676.e1-7. <http://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.02.005>
- Marek, D., Langley, M., Gardner, D. K., Confer, N., Doody, K. M., & Doody, K. J. (1999). Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertility and sterility*, 72(6), 1035-40. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593377>
- Massip, A., & Mulnard, J. (1980). Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *Journal of reproduction and fertility*, 58(2), 475-8. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7431280>
- Matorras, R., Otero, B., Mendoza, R., Expósito, A., De Pablo, J. L., Larreategui, Z., ... Matorras, F. (2014). Quality of additional embryos transferred on pregnancy outcomes in IVF: predictions using a mathematical approach. *Reproductive biomedicine online*, 29(2), 200-8. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.04.020>
- Matsunaga, T., Toba, M., Teramoto, T., Mizuya, M., Aikawa, K., & Ohmori, S. (2008). Formation of large vacuoles induced by cooperative effects of oncostatin M and dexamethasone in human fetal liver cells. *Medical Molecular Morphology*, 41(1), 53-58. <http://doi.org/10.1007/s00795-007-0387-2>
- Meseguer, M., Herrero, J., Tejera, A., Hilligsøe, K. M., Ramsing, N. B., & Remohí, J. (2011). The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(10), 2658-71. <http://doi.org/10.1093/humrep/der256>
- Meseguer, M., Rubio, I., Cruz, M., Basile, N., Marcos, J., & Requena, A. (2012). Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertility and sterility*, 98(6), 1481-9.e10. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.08.016>
- Milewski, R., Kuć, P., Kuczyńska, A., Stankiewicz, B., Łukaszuk, K., & Kuczyński, W. (2015). A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(4), 571-9. <http://doi.org/10.1007/s10815-015-0440-3>
- Mohr, L. R., & Trounson, a O. (1982). Comparative ultrastructure of hatched human, mouse and bovine blastocysts. *Journal of reproduction and fertility*, 66(2), 499-504. <http://doi.org/10.1530/jrf.0.0660499>
- Nakahara, T., Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Suzuki, M., Ienaga, M., ... Ando, H. (2010). Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(2-3), 93-6. <http://doi.org/10.1007/s10815-010->

- Niimura, S. (2003). Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *The Journal of reproduction and development*, 49(6), 413-23. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14967891>
- Niimura, S., Ogata, T., Okimura, A., Sato, T., Uchiyama, Y., Seta, T., ... Tamura, Y. (2010). Time-lapse videomicrographic observations of blastocyst hatching in cattle. *The Journal of reproduction and development*, 56(6), 649-54. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814168>
- Noda, T., Fujita, N., & Yoshimori, T. (2009). The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell death and differentiation*, 16(7), 984-990. <http://doi.org/10.1038/cdd.2009.54>
- Otsuki, J., Okada, a., Morimoto, K., Nagai, Y., & Kubo, H. (2004). The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Human Reproduction*, 19(7), 1591-1597. <http://doi.org/10.1093/humrep/deh258>
- Palmerini, M. G., Antinori, M., Maione, M., Cerusico, F., Versaci, C., Nottola, S. A., ... Antinori, S. (2014). Ultrastructure of immature and mature human oocytes after cryotop vitrification, 60(6).
- Papanikolaou, E. G., D'haeseleer, E., Verheyen, G., Van de Velde, H., Camus, M., Van Steirteghem, A., ... Tournaye, H. (2005). Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Human Reproduction*, 20(11), 3198-3203. <http://doi.org/10.1093/humrep/dei217>
- Papanikolaou, E. G., Kolibianakis, E. M., Tournaye, H., Venetis, C. a., Fatemi, H., Tarlatzis, B., & Devroey, P. (2008). Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction*, 23(1), 91-99. <http://doi.org/10.1093/humrep/dem339>
- Park, Y. E., Hayashi, Y. K., Bonne, G., Arimura, T., Noguchi, S., Nonaka, I., & Nishino, I. (2009). Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*, 5(6), 795-804. <http://doi.org/10.4161/auto.8901>
- Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., & Matthews, C. D. (1997). Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(3), 532-41. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130755>
- Prados, F. J., Debrock, S., Lemmen, J. G., & Agerholm, I. (2012). The cleavage stage embryo. *Human Reproduction*, 27(suppl 1), i50-i71. <http://doi.org/10.1093/humrep/des224>
- Ricciarelli, E., Bruna, I., Verdú, V., Torrelló, M. J., Herrero, R., Gris, J. M., ... Fernández-Shaw, S. (2013). Impact of assisted reproduction treatments on Spanish newborns: report of 14,119 pregnancies. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(7), 897-905. <http://doi.org/10.1007/s10815-013-0023-0>
- Rienzi, L., Ubaldi, F. M., Iacobelli, M., Minasi, M. G., Romano, S., Ferrero, S., ... Greco, E.

- (2008). Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1692-1700. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.09.024>
- Rienzi, L., Vajta, G., & Ubaldi, F. (2011). Predictive value of oocyte morphology in human IVF: A systematic review of the literature. *Human Reproduction Update*, 17(1), 34-45. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmq029>
- Rijnders, P. M., & Jansen, C. a. (1998). The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(10), 2869-2873.
- Rodríguez Barredo, D. B., Tur Padro, R., Mancini, F., Parriego García, M., Rodríguez García, I., Coroleu Lletget, B., & Barri Rague, P. N. (2012). Elective single embryo transfer and cumulative pregnancy rate: five-year experience in a Southern European Country. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 28(6), 425-8. <http://doi.org/10.3109/09513590.2011.633662>
- Rubio, I., Galán, A., Larreategui, Z., Ayerdi, F., Bellver, J., Herrero, J., & Meseguer, M. (2014). Clinical validation of embryo culture and selection by morphokinetic analysis: a randomized, controlled trial of the EmbryoScope. *Fertility and Sterility*, 102(5), 1287-1294.e5. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.07.738>
- Rubio, I., Kuhlmann, R., Agerholm, I., Kirk, J., Herrero, J., Escribá, M.-J., ... Meseguer, M. (2012). Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and sterility*, 98(6), 1458-63. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1135>
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Dynamic Regulation of Autophagy and Endocytosis for Cell Remodeling During Early Development. *Traffic*, 14(5), 479-486. <http://doi.org/10.1111/tra.12050>
- Schoolcraft, W. B., & Gardner, D. K. (2000). Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertility and sterility*, 74(3), 482-6. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973642>
- SEF, S. E. de F. (2013). *Registro S E F "Registro de la Sociedad Española de Fertilidad: Técnicas de reproducción asistida (IA y FIV / ICSI). Año 2013.*
- Seshagiri, P. B., Sen Roy, S., Sireesha, G., & Rao, R. P. (2009). Cellular and molecular regulation of mammalian blastocyst hatching. *Journal of Reproductive Immunology*, 83(1-2), 79-84. <http://doi.org/10.1016/j.jri.2009.06.264>
- Sireesha, G. V, Mason, R. W., Hassanein, M., Tonack, S., Navarrete Santos, A., Fischer, B., & Seshagiri, P. B. (2008). Role of cathepsins in blastocyst hatching in the golden hamster. *Molecular human reproduction*, 14(6), 337-46. <http://doi.org/10.1093/molehr/gan026>
- Soderstrom-Anttila, V. (2003). Elective single embryo transfer yields good delivery rates in oocyte donation. *Human Reproduction*, 18(9), 1858-1863. <http://doi.org/10.1093/humrep/deg384>

- Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., ... Van Steirteghem, A. (2004). Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Human reproduction (Oxford, England)*, *19*(12), 2849-58. <http://doi.org/10.1093/humrep/deh536>
- Stecher, A., Vanderzwalmen, P., Zintz, M., Wirleitner, B., Schuff, M., Spitzer, D., & Zech, N. H. (2014). Transfer of blastocysts with deviant morphological and morphokinetic parameters at early stages of in-vitro development: a case series. *Reproductive biomedicine online*, *28*(4), 424-35. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.12.008>
- Stephens, P. C., & Edwards, R. G. (1978). Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet (London, England)*, *2*(8085), 366. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/79723>
- Stoop, D., Van Landuyt, L., Van den Abbeel, E., Camus, M., Verheyen, G., & Devroey, P. (2011). Should a single blastocyst transfer policy be a clinical decision or should it depend on the embryological evaluation on day 3? *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, *9*, 60. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-9-60>
- Storr, A., Venetis, C. A., Cooke, S., Susetio, D., Kilani, S., & Ledger, W. (2015). Morphokinetic parameters using time-lapse technology and day 5 embryo quality: a prospective cohort study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, *32*(7), 1151-60. <http://doi.org/10.1007/s10815-015-0534-y>
- Styer, A. K., Wright, D. L., Wolkovich, A. M., Veiga, C., & Toth, T. L. (2008). Single-blastocyst transfer decreases twin gestation without affecting pregnancy outcome. *Fertility and sterility*, *89*(6), 1702-8. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.036>
- Sunderam, S., Kissin, D. M., Crawford, S. B., Folger, S. G., Jamieson, D. J., & Barfield, W. D. (2014). Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2011. *Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002)*, *63*(10), 1-28. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25412164>
- Suzuki, R., & Niimura, S. (2010). Hatching and distribution of actin filaments in mouse blastocysts whose activities of protein kinase A were suppressed by H-89. *The Journal of reproduction and development*, *56*(1), 103-9. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881218>
- The British Fertility Society. (2011). Multiple births from fertility treatment in the UK: a consensus statement. *Human fertility (Cambridge, England)*, *14*(3), 151-3. <http://doi.org/10.3109/14647273.2011.592759>
- Tsukamoto S1, Kuma A, Murakami M, Kishi C, Yamamoto A, M. N. (2008). Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(July), 117-121.
- Vajta, G., Rienzi, L., & Bavister, B. D. (2010). Zona-free embryo culture: is it a viable option to improve pregnancy rates? *Reproductive biomedicine online*, *21*(1), 17-25. <http://doi.org/10.1016/j.rbmo.2010.03.014>
- Van Blerkom, J. (1990). Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular

- organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. *Journal of electron microscopy technique*, 16(4), 324-46. <http://doi.org/10.1002/jemt.1060160405>
- Van Blerkom, J., & Henry, G. (1992). Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 7(3), 379-390.
- Wada, Y. (2013). Vacuoles in mammals: a subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *Bioarchitecture*, 3(1), 13-19.
- Wang, Q.-C., Liu, J., Duan, X., Cui, X.-S., Kim, N.-H., Xiong, B., & Sun, S.-C. (2015). The Dynamin 2 inhibitor Dynasore affects the actin filament distribution during mouse early embryo development. *The Journal of reproduction and development*, 61(1), 49-53. <http://doi.org/10.1262/jrd.2014-079>
- Wang, S., & Sun, H. (2014). Blastocyst Transfer Ameliorates Live Birth Rate Compared with Cleavage-Stage Embryos Transfer in Fresh In Vitro Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection Cycles : Reviews and Meta-Analysis, 55(3), 815-825.
- Watson, A. J., Natale, D. R., & Barcroft, L. C. (2004). Molecular regulation of blastocyst formation. *Animal reproduction science*, 82-83, 583-92. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.004>
- Wong, C. C., Loewke, K. E., Bossert, N. L., Behr, B., De Jonge, C. J., Baer, T. M., & Reijo Pera, R. A. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology*, 28(10), 1115-21. <http://doi.org/10.1038/nbt.1686>
- Xiong, Y., Tan, Y.-J., Xiong, Y.-M., Huang, Y.-T., Hu, X.-L., Lu, Y.-C., ... Sheng, J.-Z. (2013). Expression of aquaporins in human embryos and potential role of AQP3 and AQP7 in preimplantation mouse embryo development. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 31(4-5), 649-58. <http://doi.org/10.1159/000350084>
- Yamamoto, A., Mizushima, N., & Tsukamoto, S. (2014). Fertilization-Induced Autophagy in Mouse Embryos Is Independent of mTORC1. *Biology of reproduction*, 91(1), 7. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.113.115816>
- Yang, Z., Zhang, J., Salem, S. A., Liu, X., Kuang, Y., Salem, R. D., & Liu, J. (2014). Selection of competent blastocysts for transfer by combining time-lapse monitoring and array CGH testing for patients undergoing preimplantation genetic screening: a prospective study with sibling oocytes. *BMC medical genomics*, 7, 38. <http://doi.org/10.1186/1755-8794-7-38>
- Zamboni, L; Thompson, R. S. (1972). Fine Morphology of Human Oocyte Maturation In Vitro. *Biology of reproduction*, 7, 425-457.
- Zollner, U., Zollner, K.-P., Hartl, G., Dietl, J., & Steck, T. (2002). The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(5), 1327-1333.

