

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## *ANÁLISIS DE IMAGEN Y DISEÑO DE VARIABLES MORFOMÉTRICAS EN EMBRIONES HUMANOS*

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: María Rosario Hervás Salcedo

TUTORA: Dña. Inmaculada Molina Botella

*Curso Académico: 2013/2014*

VALENCIA, Septiembre de 2014





## Datos personales

**Autor:** María Rosario Hervás Salcedo

## Datos del Trabajo Fin de Grado

**Título del TFG:** Análisis de imagen y diseño de variables morfométricas en embriones humanos

**Titulación:** Grado en Biotecnología

**Lugar de realización:** Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitari i Politènic La Fe, Valencia

**Tutor académico:** Prof. Dña. Inmaculada Molina Botella

**Tipo de Licencia:** Creative Commons: "Reconocimiento No Comercial – Sin Obra Derivada"

**Localidad y fecha:** Valencia, Septiembre de 2014

## Abstract

One of the major problems that the Assisted Human Reproduction Units face are the multiple gestations, since they suppose a significant risk to both the mother and the newborn. Due to this, one of their main objectives is the decrease of these multiple pregnancies by limiting the number of embryos being transferred. Embryo implantation is directly related to the number and quality of the transferred embryos, so it is essential to find markers of embryo quality that allow the selection and transfer of those embryos with a higher implantation potential. Traditionally, embryo selection has been performed by morphological classification rules. However, it has been shown that these morphological rules are subjective and their evaluation involves an exposure of the embryos to culture conditions which may adversely affect their development. For this reason, there was the need to develop more objective methods of selection that would assess the evaluation of the embryo characteristics without affecting its growing conditions. Image analysis and morphometric variables design related to embryo form, size and thickness of its zona pellucida (ZP) can improve embryo selection decreasing observer's subjectivity. There are some studies about the assessment of embryonic morphometric variables based on implantation, but there are not studies about the assessment of embryonic morphometric variables depending on the number of cells (blastomeres).

Therefore, the aim of this study was to evaluate embryonic morphometric parameters related to size by the inner perimeter (IP), to form by the circularity factor (CF) and the ZP thickness

(ZPT), depending on the embryo cells number. In order to do this, images were taken of 100 embryos at day 2 of development (48 hours after insemination), that had got between 2 and 6 cells. These parameters were analyzed using the image analysis program ImageJ. Then, the corresponding statistical analysis was performed to quantify the effect of the number of cells factor on the morphometric characteristics studied.

The analysis showed, first, that the number of embryo blastomeres significantly affects its IP and ZPT, but it does not affect its circularity. Furthermore, after quantifying this effect, a negative effect was found. That is, as the cells number increased, IP and ZPT decreased.

Therefore, it was concluded that the morphological variable number of cells linearly, negatively and significantly affects embryo size and the thickness of its ZP. However, it does not affect the circular form of the embryo in day 2 of development.

### **Key Words**

Multiple pregnancies, embryo selection, embryo classification system, morphometric parameters, image analysis.

### **Resumen**

Uno de los problemas más importantes a los que se enfrentan las Unidades de Reproducción Humana Asistida son las gestaciones múltiples, pues suponen un riesgo importante tanto para la madre como para el recién nacido. Por lo tanto, uno de sus objetivos prioritarios es la disminución de dichas gestaciones múltiples mediante la limitación del número de embriones a transferir. La implantación embrionaria está directamente relacionada con el número y la calidad de los embriones transferidos, por lo que es imprescindible encontrar marcadores de calidad embrionaria que permitan seleccionar y transferir aquellos embriones con un mayor potencial de implantación. Tradicionalmente, la selección embrionaria previa a la transferencia, se ha llevado a cabo mediante criterios de clasificación morfológicos. Sin embargo, se ha demostrado que dichos criterios son subjetivos y su evaluación implica la exposición de los embriones a condiciones de cultivo que pueden afectar negativamente a su desarrollo. Así pues, surgió la necesidad de desarrollar métodos de selección más objetivos que permitiesen evaluar las características de los embriones sin afectar a sus condiciones de cultivo. El análisis de imagen y el diseño de variables morfométricas relacionadas con la forma y el tamaño del embrión y el espesor de su zona pelúcida (ZP) permiten mejorar la selección embrionaria disminuyendo la subjetividad asociada al observador. Existen algunos estudios basados en la evaluación de variables morfométricas embrionarias en función de la

implantación, pero no se han encontrado estudios que valoren las variables morfométricas embrionarias en función del número de células (blastómeras).

Es por ello, que el objetivo del presente trabajo fue evaluar los parámetros morfométricos embrionarios relativos al tamaño mediante el perímetro interno (PI), a la forma mediante el factor de circularidad (FC) y al espesor de la ZP (EZP) en función del número de células de los embriones. Para ello, se tomaron imágenes de 100 embriones en día 2 de desarrollo (48 horas post-inseminación), que presentaban entre 2 y 6 células, y se analizaron dichos parámetros mediante el programa de análisis de imagen ImageJ. A continuación, se realizó el análisis estadístico correspondiente para cuantificar el efecto del factor número de células sobre las características morfométricas estudiadas.

Dicho análisis mostró, en primer lugar, que el número de blastómeras que presente el embrión afecta significativamente a su PI y al EZP, pero no tiene efecto sobre su circularidad. Además, tras cuantificar dicho efecto se observó que era un efecto negativo, es decir, a medida que aumentaba el número de células disminuían el PI y el EZP.

Por tanto, se concluyó que la variable morfológica número de células influye de forma lineal, negativa y significativa en el tamaño del embrión y en el espesor de la ZP. Sin embargo, no afecta a la forma circular que presentan los embriones en día 2 de desarrollo.

### **Palabras clave**

Gestaciones múltiples, selección embrionaria, sistema de clasificación embrionaria, parámetros morfométricos, análisis de imagen.

## AGRADECIMIENTOS

Es el momento de agradecer a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo, tanto directa como indirectamente.

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora Inma la confianza que ha depositado en mí. Gracias por tu ayuda y por los conocimientos que me has aportado, pero también mil gracias por las palabras de ánimo en los momentos de más dudas y nervios. Ha sido un gran placer trabajar contigo.

También me gustaría agradecer a todo el laboratorio de Embriología de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y aprender con ellos.

Al Dr. Sebastià Balasch por su contribución en la parte estadística del trabajo, sin su ayuda habría sido todo mucho más complicado.

Por otra parte, me gustaría agradecer a aquellos que han contribuido tanto a este trabajo como a los cuatro años de carrera de forma indirecta, mis amigos. Gracias a los de siempre por el ánimo y por no olvidarse de mí aun sin verme durante mucho tiempo debido a mis obligaciones biotecnológicas. También gracias a la “familia biotec” por estos cuatro años de amistad y momentos buenos, malos y regulares. Por muchos años más.

Finalmente agradecer el apoyo de mi familia, los cuales han aguantado mis cambios de humor debido al estrés y los nervios, no solo durante este último periodo, sino también durante los cuatro años de carrera. En especial, gracias a mi fantástica madre, por hacer que todo sea más fácil y llevadero.

Todos habéis convertido este tiempo en una experiencia inolvidable, gracias.

# ÍNDICE TEMÁTICO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA .....	1
1.1.1. Gestaciones múltiples, el inconveniente de las TRA .....	1
1.2. SELECCIÓN EMBRIONARIA .....	3
1.2.1. Selección mediante criterios morfológicos .....	3
1.2.2. Selección mediante criterios no morfológicos .....	6
1.2.2.1. Técnicas ómicas .....	6
1.2.2.2. Embryoscope .....	6
1.3. ANÁLISIS DE IMAGEN Y DISEÑO DE PARÁMETROS EMBRIONARIOS MORFOMÉTRICOS .....	7
1.3.1. Programas de análisis de imagen usados en embriología .....	8
1.3.1.1. Software ImageJ .....	8
1.3.2. Parámetros embrionarios morfométricos .....	8
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>10</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>11</b>
3.1. TIPO DE ESTUDIO Y EMBRIONES ANALIZADOS .....	11
3.2. VARIABLES MORFOMÉTRICAS ESTUDIADAS .....	11
3.3. METODOLOGÍA DE CAPTURA Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES .....	12
3.3.1. Sistema de captura .....	12
3.3.2. Sistema de análisis de las variables embrionarias morfométricas ...	12
3.3.2.1. Perímetro interno .....	14
3.3.2.2. Factor de circularidad embrionario .....	14
3.3.2.3. Espesor de la zona pelúcida.....	15
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	16
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>17</b>

<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>25</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>26</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de la clasificación embrionaria descrita por Van Royen y colaboradores (Van Royen <i>et al.</i> , 1999) .....	3
<b>Figura 2.</b> Embriones tipo A según clasificación ASEBIR en día 2 de desarrollo (Torelló, 2011) .....	5
<b>Figura 3.</b> Esquema de las técnicas ómicas (adaptada de INSTITUTO ROCHE, 2009) .....	6
<b>Figura 4.</b> Imagen de un Embryoscope (FERTILITECH, 2013) .....	7
<b>Figura 5.</b> Interfaz principal del programa ImageJ .....	12
<b>Figura 6.</b> Escala Olympus Laser 10x calibrada (línea color magenta) .....	13
<b>Figura 7.</b> Aspecto del comando <i>Set Scale</i> .....	13
<b>Figura 8.</b> Menú <i>Plugins</i> y empleo de la herramienta <i>ThreePointCircularROI</i> (círculo verde) .....	14
<b>Figura 9.</b> Conjunto de puntos obtenidos con la herramienta <i>Polygon Selection</i> para la medición del FC (círculo verde) .....	15
<b>Figura 10.</b> Herramienta <i>Straight</i> para el análisis del EZP (líneas verdes) .....	15
<b>Figura 11.</b> Embrión de 4 células con ZP marcada con flechas (adaptada de Paternot <i>et al.</i> , 2014).....	24

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Recomendaciones de la SEF para el número de embriones a transferir (SEF, 2005).....	2
<b>Tabla 2.</b> Resultados de los ANOVA del efecto del factor número de células sobre las variables PI, FC y EZP.....	17
<b>Tabla 3.</b> Resultados del análisis de regresión lineal simple para las características PI y ZP.....	18
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis del modelo de regresión con el término cuadrático para la variable EZP.....	18

## **ABREVIATURAS**

**ANOVA** Análisis de la Varianza

**ASEBIR** Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción

**CR** Coeficiente de Regresión

**ES** Error Estándar

**ESHRE** *European Society of Human Reproduction and Embryology*

**EZP** Espesor de la Zona Pelúcida

**FC** Factor de Circularidad Embrionario

**FIV** Fecundación *In Vitro*

**ICSI** Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides

**LI** Límite inferior para el intervalo de confianza

**LS** Límite superior para el intervalo de confianza

**M** Media

**NIH** *National Institutes of Health*

**PI** Perímetro Interno

**SEF** Sociedad Española de Fertilidad

**SET** *Single Embryo Transfer*

**TRA** Técnicas de Reproducción Asistida

**URHA** Unidades de Reproducción Humana Asistida

**ZP** Zona Pelúcida

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. SITUACIÓN ACTUAL DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

En la actualidad, cada vez es más común encontrar parejas con problemas de fertilidad que acuden a centros especializados y a Unidades de Reproducción Humana Asistida (URHA) con la finalidad de satisfacer su deseo de ser padres (SEF, 2012). Por ello, este campo ha ido avanzando en los últimos treinta años a gran velocidad, realizándose alrededor de un millón y medio de ciclos de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) al año en todo el mundo, ya sea Fecundación *In Vitro* (FIV) o Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), con una tasa de nacimiento estimada de 350.000 niños (ESHRE, 2010).

#### 1.1.1. Gestaciones múltiples, el inconveniente de las TRA

Con el avance y la gran difusión de las TRA, sin embargo, se ha ido incrementando el número de gestaciones múltiples, llegando a tasas del 24% del total de gestaciones resultantes de ciclos de TRA, debido fundamentalmente a los protocolos de estimulación, las condiciones de cultivo embrionario, el retraso de la edad media de maternidad y las transferencias indiscriminadas de embriones en los ciclos de FIV/ICSI (Simón y Pellicer, 2005; Murray y Norman, 2014).

El gran problema de dichas gestaciones múltiples radica en los efectos negativos y las complicaciones que suponen tanto para el feto como para la madre, por lo que uno de los principales objetivos de las TRA desde hace más de una década ha sido su reducción, sin afectar las tasas de implantación y de gestación, mediante la limitación del número de embriones a transferir (Templeton y Morris, 1998).

Actualmente, muchos son los países europeos que cuentan con los organismos reguladores necesarios para establecer restricciones legales en el número de embriones a transferir en las TRA (Ricciarelli, 2007).

Concretamente en España, la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) y la Sociedad Española de Fertilidad (SEF) se encargan de cumplir el objetivo de reducir los embarazos múltiples centrándose en la limitación del número de

embriones a transferir (Tabla 1) en función de la situación clínica de cada pareja (SEF, 2005).

**Tabla 1.** Recomendaciones de la SEF para el número de embriones a transferir (SEF, 2005).

Edad de la mujer	Nº de embriones a transferir	Excepciones
<b>Menores de 30 años</b>	1 o 2	Ninguna
<b>Entre 30-37</b>	1 o 2	A partir del tercer ciclo: valorar la transferencia de 3 si no hay ningún embrión de “buena calidad”
<b>Mayores de 38 años</b>	2	A partir del primer ciclo: valorar la transferencia de 3 si no hay ningún embrión de “buena calidad”
<b>Donación de ovocitos</b>	1 o 2	Ninguna

Sin embargo, a lo largo de los años de investigación en la campo de la reproducción humana asistida, se han evaluado diversas técnicas para la reducción de las gestaciones múltiples, además de la limitación en el número de embriones transferidos (Galliano y Martínez, 2008).

Una de las posibilidades propuestas fue la transferencia de los embriones en estadio de blastocisto, pues el proceso de selección sería mejor atendiendo a criterios morfológicos y genéticos y la tasa de implantación sería más elevada (Langely *et al.*, 2001), pero presenta el inconveniente de que alrededor del 40-50% de los embriones detiene su crecimiento en cultivo antes de llegar a dicho estadio, debido a la estructura más compleja que adquiere el embrión (Gardner *et al.*, 2000).

Por otra parte, *Single Embryo Transfer* (SET) o la transferencia selectiva de un único embrión se presentó como una importante posibilidad para reducir los embarazos múltiples (Galliano y Martínez, 2008). Sin embargo, estaría indicada preferiblemente para aquellos casos con un buen pronóstico, como mujeres jóvenes, embriones de buena calidad y primeros/segundos ciclos de fecundación, ya que en el resto de casos se ha observado una disminución importante en la tasa de gestación (Thurin *et al.*, 2004).

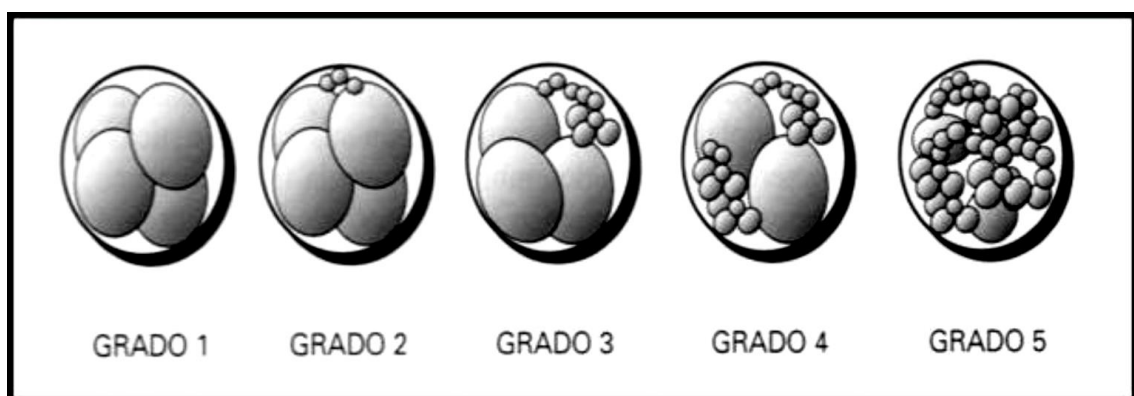
## 1.2. SELECCIÓN EMBRIONARIA

En España, permanece vigente la Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida, la cual limita el número de embriones a transferir en un máximo de 3 (BOE, 2006). Así pues, para disminuir el número de embriones a transferir sin afectar las tasas de implantación y de gestación, ha sido imprescindible desarrollar nuevas herramientas de selección embrionaria que permitiesen ampliar el conocimiento acerca del potencial de implantación de cada embrión para poder seleccionar únicamente aquellos con un potencial de implantación mayor (Molina *et al.*, 2011).

### 1.2.1. Selección mediante criterios morfológicos

Los criterios tradicionales de selección usados en los laboratorios de Reproducción Asistida se basan en la evaluación de la morfología embrionaria para predecir la capacidad implantatoria, en la cual se usan clasificaciones que permiten distinguir entre las distintas calidades embrionarias, evaluadas en función del número de células del embrión (blastómeras) y de la simetría y fragmentación de éstas (Van Montfoort *et al.*, 2004). Un ejemplo de estas clasificaciones sería el propuesto por Van Royen *et al.* (1999), la cual se sigue utilizando todavía (Figura 1):

- **Grado 1:** Embriones con blastómeras regulares y simétricas, sin apenas fragmentos.
- **Grado 2:** Embriones con blastómeras simétricas y no más de un 10% de fragmentos.
- **Grado 3:** Embriones con blastómeras asimétricas y menos del 50% de fragmentos.
- **Grado 4:** Embriones con blastómeras desiguales y con más del 50% de fragmentos.
- **Grado 5:** Embriones no viables con blastómeras completamente fragmentadas.



**Figura 1.** Esquema de la clasificación embrionaria descrita por Van Royen y colaboradores (Van Royen *et al.*, 1999).

Sin embargo, este tipo de clasificación basada en el análisis estático de la morfología embrionaria es incapaz de seleccionar de forma clara los embriones de mayor calidad y capacidad de implantación, pues es necesario tener en cuenta la evolución dinámica de la morfología del embrión durante su cultivo *in vitro* (Calderón, 2003).

Numerosos estudios han demostrado que los principales factores predictores de implantación y gestación tras los ciclos de TRA son la calidad embrionaria y la edad de la mujer, la cual no se puede cambiar (El-Mazny *et al.*, 2011).

Así pues, algunas de las variables morfológicas relacionadas con la capacidad de implantación y la calidad embrionaria son: número de células, fragmentación del embrión, simetría de las blastómeras y espesor de la zona pelúcida (ZP) (Scott *et al.*, 2007). Además, se han elaborado *scores* embrionarios basados en dichas características morfológicas, consideradas como las más influyentes sobre la implantación (Holte *et al.*, 2007).

Todo ello llevó a la aparición de una nueva clasificación morfológica embrionaria más amplia, propuesta por ASEBIR y aceptada a nivel nacional, que consistía en la consideración de (ASEBIR, 2008):

- Número de células y ritmo de división.
- Tamaño y simetría de las blastómeras.
- Porcentaje y tipo de fragmentación celular.
- Visualización de núcleos y grado de multinucleación.
- Espesor y abultamientos de la ZP.
- Presencia de vacuolas.

En base a todas estas características, se estableció la clasificación con cuatro categorías dentro de las cuales se dividen los embriones antes de su transferencia (ASEBIR, 2008):

- Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación (Figura 2).
- Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
- Categoría C: Embrión regular con bajas posibilidades de implantación.
- Categoría D: Embrión de mala calidad con muy pocas posibilidades de implantación.



**Figura 2.** Embriones tipo A según clasificación ASEBIR en día 2 de desarrollo (Torelló, 2011).

Sin embargo, la evaluación de la calidad embrionaria previa a la transferencia mediante criterios morfológicos es bastante subjetiva y con relativo poder predictivo porque depende del observador, por lo que también presenta gran variabilidad inter e intra-observador, lo cual limita en gran medida su valor pronóstico (Paternot *et al.*, 2011a).

Además, la evaluación a tiempo real de todas las características morfológicas propuestas en la clasificación de ASEBIR, requiere demasiado tiempo de exposición de los embriones a condiciones de cultivo subóptimas, tales como cambios en el pH o la temperatura del medio, que puede tener efectos deletéreos en su desarrollo, calidad y posterior implantación (Garrisi *et al.*, 1993).

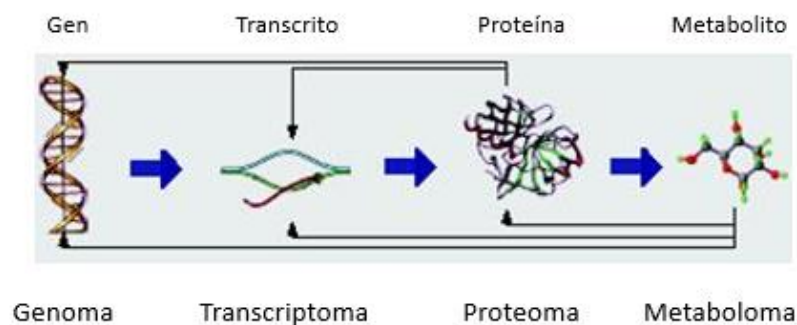
Por ello, surgió la necesidad de desarrollar un sistema de clasificación basado en parámetros objetivos que consiguiera, eliminando la subjetividad del observador, la caracterización óptima no invasiva de las características de tamaño, forma y simetría del embrión y de sus blastómeras, con la finalidad de seleccionar mejor los embriones a transferir y reducir la tasa de gestaciones múltiples, manteniendo la de nacidos vivos (Debón *et al.*, 2013).



## 1.2.2 Selección mediante criterios no morfológicos

### 1.2.2.1 Técnicas ómicas

El término “ómica” hace referencia a las diferentes técnicas de estudio empleadas en biología, pues el sufijo “oma” significa “conjunto de”, es decir, las técnicas ómicas son disciplinas que estudian los eventos e interacciones de las estructuras celulares y sus procesos, desde el ADN hasta la función biológica, desde los genes hasta los metabolitos (Vergouw *et al.*, 2008). Entre estas técnicas destacan la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema de las técnicas ómicas (adaptada de INSTITUTO ROCHE, 2009).

Con el uso de estas tecnologías, es posible asignar un valor predictivo al éxito de la transferencia de los embriones, y cada vez son más los trabajos en esta línea, pues ya se han desarrollado nuevos marcadores de calidad embrionaria basados en estudios del metabolismo embrionario (Vergouw *et al.*, 2008), patrones de respiración (Leese *et al.*, 2007) y estudio de aneuploidías (Twisk *et al.*, 2008).

### 1.2.2.2 Embryoscope

El Embryoscope es la herramienta usada en la tecnología *time-lapse imaging*, el cual consiste en un incubador de embriones con un sistema de captura de imagen asociado (Figura 4) que permite observar al embrión a tiempo real durante todo su cultivo *in vitro*, desde el momento de la ICSI hasta el estadio de blastocisto (Herrero *et al.*, 2009). Además, permite cuantificar su consumo de oxígeno mediante un sensor, pues el consumo de oxígeno aumenta

con el estadio embrionario (Martínez-Burgos *et al.*, 2013) y está relacionado con otros parámetros que reflejan la calidad del embrión (Tejera *et al.*, 2012).

Sin embargo, pese a que puede ofrecer información complementaria útil a la hora de elegir los embriones con mayor potencial de implantación antes de su transferencia, su elevado coste impide que pueda ser implementado en muchos laboratorios (Molina *et al.*, 2014).



**Figura 4.** Imagen de un Embryoscope (FERTILITECH, 2013).

### **1.3. ANÁLISIS DE IMAGEN Y PARÁMETROS EMBRIONARIOS MORFOMÉTRICOS**

Entre las herramientas que permiten extraer información directamente del embrión y obtener un sistema de clasificación embrionaria más objetivo, rápido y barato, se encuentra el análisis de imagen y el diseño de parámetros embrionarios morfométricos (Molina *et al.*, 2014).

Sin embargo, para extraer dicha información se requieren los sistemas adecuados de obtención y procesado de las imágenes, es decir, se necesitan las herramientas y los procedimientos que extraigan la información cuantitativa de ellas (Wootton, 1995).

### 1.3.1. Programas de análisis de imágenes usados en embriología

Multitud de programas son capaces de medir las características morfométricas embrionarias, entre los cuales destacan el programa ImageJ, el sistema FertiMorph o el programa Cronus 3 (Santos *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, el programa elegido fue el ImageJ, el cual se explica a continuación.

#### 1.3.1.1. Software ImageJ

El programa de análisis de imagen ImageJ es un programa de dominio público diseñado originariamente por Wayne Rasband, de los *National Institutes of Health* (NIH) de Estados Unidos, el cual es usado por multitud de laboratorios que trabajan en análisis de imagen (NIH, 2004).

Se trata de un software que ofrece una elevada posibilidad de personalización en función del usuario, ya que cuenta con una gran variedad de herramientas y complementos, lo cual le dota de gran utilidad para realizar funciones específicas que facilitan la tarea de procesado y análisis de imagen y hacen posible analizar parámetros embrionarios morfométricos como diámetros, radios, perímetros, áreas o espesores (Collins, 2007).

### 1.3.2. Parámetros embrionarios morfométricos

Se conoce como variables embrionarias morfométricas o parámetros embrionarios morfométricos a aquellas medidas obtenidas directamente del embrión sin la opinión del observador, obviando totalmente la subjetividad de la medida, por lo que su estudio mediante el análisis de imágenes permite desarrollar un sistema de clasificación embrionaria objetivo (Molina *et al.*, 2013).

Algunas de las variables morfométricas de las cuales se puede obtener información sobre las características del embrión, que no se puede obtener directamente de la morfología, son: área y perímetro del embrión, radio del círculo equivalente y radio observado del embrión, factor de circularidad embrionario, espesor de la ZP, área y perímetro de las blastómeras, radio

del círculo equivalente de las blastómeras y factor de circularidad de las blastómeras (Molina *et al.*, 2013).

En la revisión bibliográfica realizada se han encontrado estudios que utilizan la morfometría para analizar variables embrionarias. En estos estudios, se ha relacionado variables morfométricas embrionarias con calidad embrionaria (Paternot *et al.*, 2011b), segmentación embrionaria (Beuchat *et al.*, 2008) y reconstrucción en 3 Dimensiones (Giusti *et al.*, 2010), así como con fragmentación y multinucleación (Hnida *et al.*, 2004). Además, recientemente, Paternot *et al.* (2013) han demostrado una mejor predicción de la tasa de implantación basada en parámetros morfométricos como el número y el tamaño de las blastómeras, así como la existencia de correlación entre el volumen total del embrión y embarazo en embriones en día 3 de desarrollo.

En anteriores trabajos realizados en la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, se demostró que las variables embrionarias morfométricas son más objetivas y tienen mayor poder de predicción de la implantación (Molina *et al.*, 2011; Debón *et al.*, 2013). Además, se estudiaron variables morfométricas en embriones con destino conocido (0 y 100% de implantación) y se obtuvo un perfil del embrión con mayor probabilidad de implantar basado en dichos parámetros morfométricos. Los embriones con mayores posibilidades de implantar presentaban 4 células en día 2 de desarrollo (48 horas post-inseminación) con unos porcentajes de fragmentación menores del 35%, con todas las blastómeras embrionarias con un factor de circularidad del orden de 0.9, con una media para el radio de cada blastómera de 32 micras y un espesor medio de la ZP de 13 micras aproximadamente (Molina *et al.*, 2011).

Además, se pudo comprobar que los embriones de 4 células en día 2 de desarrollo con un 100% de implantación (estadio ideal de división) presentaban cambios significativos en tres variables morfométricas con respecto al resto de embriones, concretamente tenían un menor perímetro interno (PI), un mayor factor de circularidad embrionario (FC) y un menor espesor de la ZP (EZP) (Molina *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de conocer las características morfométricas de los embriones en día 2 de desarrollo en el estadio ideal de división (4 células y 100% de implantación), se desconoce si estas variables morfométricas relacionadas con la forma y el tamaño del embrión y las características de su ZP varían en función del número de blastómeras que presente el embrión a las 48 horas post-inseminación.

## 2. OBJETIVO

Los objetivos del presente trabajo fueron evaluar tres variables morfométricas en función del ritmo de división (número de células) del embrión en día 2 de desarrollo (48 horas post-inseminación):

- a) Evaluación del tamaño.
- b) Evaluación de la forma.
- c) Evaluación de las características de la zona pelúcida.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. TIPO DE ESTUDIO Y EMBRIONES ANALIZADOS

Estudio retrospectivo en el cual se analizaron un total de 100 embriones transferidos en la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitari i Politècnic La Fe de Valencia, desde mayo hasta junio de 2014.

En el estudio se incluyeron únicamente aquellos embriones que en día 2 de desarrollo (48 horas post-inseminación) presentaron entre 2 y 6 células y se establecieron los siguientes grupos en función de la variable número de células:

- Grupo 1: 20 embriones de 2 células.
- Grupo 2: 20 embriones de 3 células.
- Grupo 3: 20 embriones de 4 células.
- Grupo 4: 20 embriones de 5 células.
- Grupo 5: 20 embriones de 6 células.

#### 3.2. VARIABLES MORFOMÉTRICAS ESTUDIADAS

En este caso, se estudiaron las variables embrionarias morfométricas que, junto con la variable morfológica número de células, estarían más relacionadas con el fenómeno de la implantación (Molina *et al.*, 2013).

En primer lugar, para obtener información acerca del tamaño del embrión se utilizó el PI. Por otra parte, para evaluar su forma, se estudió el FC. Finalmente, para evaluar las características de su ZP, se utilizó la variable EZP.

### 3.3. METODOLOGÍA DE CAPTURA Y ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES

#### 3.3.1. Sistema de captura

El sistema elegido para la captura de imágenes consistió en un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon) con una magnificación óptica de 20X y óptica de Hoffman, junto con su respectivo programa informático. Así pues, la clasificación morfométrica se llevó a cabo mediante imágenes capturadas de forma digital con el procesador Cronus 3 *video capture and embryo analysis software* y almacenadas en la base de datos del hospital.

#### 3.3.2. Sistema de análisis de las variables embrionarias morfométricas

El programa de análisis de imagen elegido para el estudio de los parámetros morfométricos fue el ImageJ, debido a que se trata de un programa de dominio público que cuenta con una gran variedad de herramientas (Figura 5), lo cual permite disminuir el error experimental llevando a cabo la evaluación con elevada precisión.

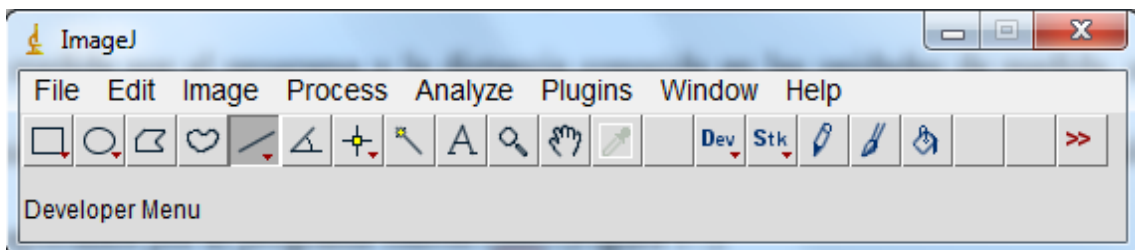
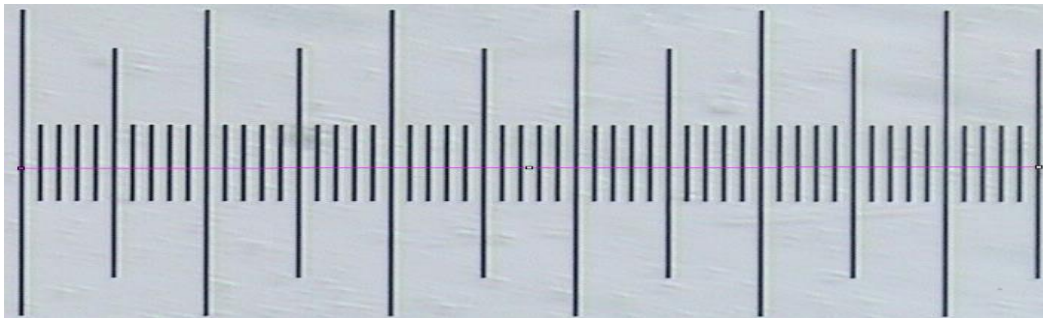


Figura 5. Interfaz principal del programa ImageJ.

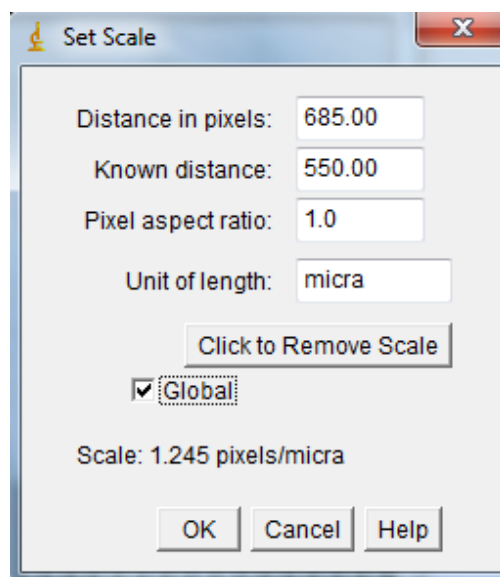
El primer paso en la utilización del programa ImageJ fue el calibrado del mismo, pues se necesitaba obtener las medidas en la unidad de medida de los elementos embrionarios, la micra ( $\mu\text{m}$ ). Así pues, se tuvo que realizar un cambio de unidades de píxeles, la unidad que por defecto utiliza el ImageJ, a micras mediante el uso de una fotografía de un micrómetro objetivo de dimensiones conocidas. Todas las imágenes microscópicas de los embriones, así como la escala micrométrica utilizada, se realizaron con el mismo microscopio y al mismo aumento (10x).

El cambio de escala consistió en trazar una línea recta mediante la herramienta *Straight* sobre la imagen del micrómetro objetivo de distancia conocida (Figura 6).



**Figura 6.** Escala Olympus Laser 10x calibrada (línea color magenta).

A continuación, con la opción *Analyze* y el comando *Set Scale*, se obtuvo la distancia en píxeles medida por el programa y se introdujo la distancia conocida equivalente en micras, 550  $\mu\text{m}$  (Figura 7). A partir de este momento, los resultados que se obtuvieron ya fueron expresados en micras.



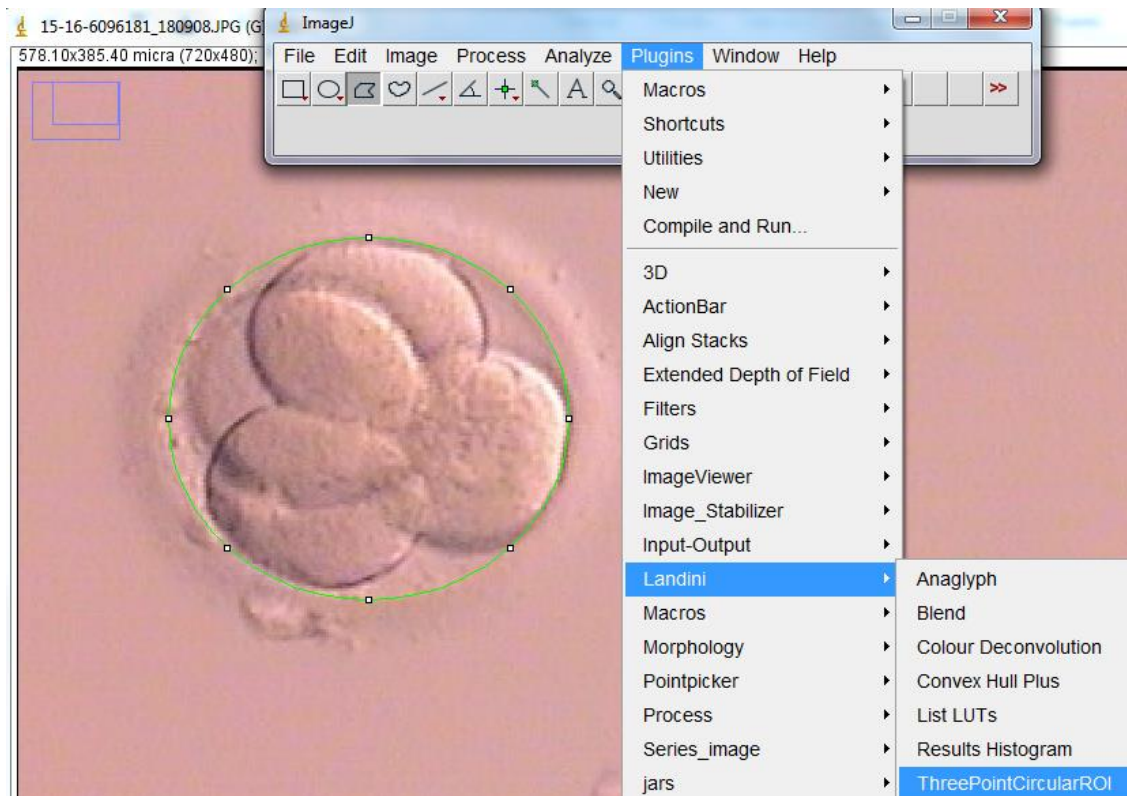
**Figura 7.** Aspecto del comando *Set Scale*.

Una vez calibrado el programa, se procedió a realizar las mediciones de las variables morfométricas nombradas anteriormente, y los valores obtenidos se guardaron en una hoja Excel para su posterior análisis.



### 3.3.2.1. Perímetro Interno

Para medir dicha variable se abrió el menú de funciones *Plugins* y se localizó la herramienta *ThreePointCircularROI*. A continuación, se buscaron tres puntos diferentes del embrión que en su conjunto formaran un triángulo equilátero, de forma que al darle un *click* con el ratón del ordenador en el último punto, el programa trazó una circunferencia ajustada lo máximo posible a la zona interna del embrión (Figura 8).



**Figura 8.** Menú *Plugins* y empleo de la herramienta *ThreePointCircularROI* (círculo verde).

En este caso, se realizaron tres mediciones formando cada vez triángulos equiláteros en diferentes posiciones y se sacó la media.

### 3.3.2.2. Factor de circularidad embrionario

El FC o *roundness* se definió como el índice que compara el área del embrión con el área de un círculo cuya circunferencia es igual al perímetro del embrión en cuestión. Sus valores oscilan entre 0 y 1, siendo el 1 el máximo valor, lo que supone que el embrión es totalmente de forma circular (Kamran *et al.*, 2012).

Para obtener su valor en cada uno de los embriones analizados, se utilizó la herramienta *Polygon Selection* del ImageJ, marcando un mínimo de siete puntos alrededor de la zona periférica del embrión, ajustándose de la manera más exacta posible a su forma (Figura 9).



**Figura 9.** Conjunto de puntos obtenidos con la herramienta *Polygon Selection* para la medición del FC (círculo verde).

### 3.3.2.3. Espesor de la zona pelúcida

En este caso, la herramienta que se utilizó fue *Straight*, mediante la cual se realizaron tres líneas rectas que abarcaban la anchura de la ZP en tres puntos diferentes del embrión, tal y como muestra la Figura 10. A continuación, se realizó la media de las tres medidas.



**Figura 10.** Herramienta *Straight* para el análisis del EYP (líneas verdes).

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) unifactorial o *One-Way* ANOVA para estudiar un posible efecto del factor número de células de los embriones sobre las características PI, FC y EZP.

Por otra parte, dada la naturaleza cuantitativa del factor y con el fin de estudiar la pauta de su efecto, se estimó un modelo de regresión lineal para las dos características (PI y EZP) sobre las que el efecto del factor número de células mostró significación estadística. Los p-valores por debajo de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

El programa estadístico de apoyo para los análisis estadísticos expuestos fue el programa Statgraphics Centurion XVI.

## 4. RESULTADOS

Los resultados del test ANOVA con los valores de las medias (M), error estándar (ES) y p-valor de las variables PI, FC y EZP en función del número de células de los embriones estudiados se presentan en la Tabla 2 (M±ES).

**Tabla 2.** Resultados de los ANOVA del efecto del factor número de células sobre las variables PI, FC y EZP.

Variable	Niveles del factor número de células					p-valor
	2	3	4	5	6	
PI	355.56±4.36	347.75±2.62	351.84±1.96	342.05±3.84	344.9±3.18	0.038
FC	0.974±0.002	0.986±0.002	0.979±0.002	0.975±0.002	0.977±0.002	0.542
EZP	17.18±0.48	16.22±0.48	15.13±0.48	16.03±0.48	15.54±0.48	0.045

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas para las variables PI (p-valor = 0.0375) y EZP (p-valor = 0.0452), las cuales disminuyeron progresivamente conforme aumentó el número de células de los embriones estudiados, lo cual se traduce en un efecto directo del aumento del número de blastómeras sobre ellas.

En relación con el FC, los resultados fueron muy similares para todos los embriones con independencia del número de células de cada embrión. El p-valor obtenido para el FC en función del número de células fue de 0.542, lo que indica que las diferencias observadas no son estadísticamente significativas.

La estimación de un modelo de regresión lineal para estas dos variables que presentaron diferencias significativas en el ANOVA (PI y EZP), permite cuantificar de un modo más claro el efecto del factor número de células de los embriones sobre las variables PI y EZP.

En la Tabla 3 se presentan los coeficientes del modelo de regresión simple (CR), con sus correspondientes ES, los p-valores y los límites inferior (LI) y superior (LS) para el intervalo de confianza del 95% estimado para las variables PI y EZP, así como la bondad de ajuste ( $R^2$ ) de cada modelo.

**Tabla 3.** Resultados del análisis de regresión lineal simple para las características PI y ZP.

Variable	CR	ES	p-valor	LI	LS	R <sup>2</sup> (%)
PI	-2.70	1.05	0.012	-4.785	-0.618	6.33
EZP	-2.02	1.06	0.003	-4.129	0.075	7.25

A pesar de las bajas bondades de ajuste de los dos modelos ( $R^2$  de 6,33% y 7,25% para las respectivas características de PI y ZP), los CR toman valores negativos significativos en ambos casos, indicando una disminución de las dos características a medida que aumenta el número de células de los embriones.

En el caso del PI, esta disminución lineal significativa ( $p$ -valor = 0.012) se cifra, en promedio, en 2,70 micras por cada célula adicional del embrión (intervalo de confianza al 95%: 0.62 a 4.79). Es decir, en cada división celular o cada incremento de una célula en el embrión, se produce una disminución del PI en un promedio de 2.70 micras.

En relación con la ZP, también existe un efecto claro del número de células sobre su espesor. La estimación del modelo de regresión lineal simple con la variable explicativa número de células, marca una clara tendencia descendente del EZP a medida que aumenta el número de células del embrión. Concretamente, esta disminución significativa ( $p$ -valor = 0.003) se cifra, en promedio, en 2,02 micras por cada célula de más con respecto a la anterior que presenta el embrión (intervalo de confianza al 95%: 0.0.75 a 4.129).

Sin embargo, en este caso, el diagrama de dispersión de EZP sobre el número de células del embrión indicaba una posible curvatura en el efecto del número de células sobre el valor de EZP, por lo que se incluyó un término cuadrático en el modelo de regresión (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados del análisis del modelo de regresión con el término cuadrático para la variable EZP

Variable	CR	ES	p-valor	LI	LS
EZP	0.21	0.13	0.112	-0.049	0.470

El valor positivo del CR estimado para este término cuadrático, aunque con un p-valor de 0.11, parece apuntar hacia una disminución progresiva en el efecto lineal negativo evidenciado en el modelo de regresión simple anterior. Dicho de otro modo, el descenso que se produce en EZP con el aumento del número de células del embrión parece ralentizarse a medida que se alcanzan los estadios de mayor número de células en día 2 de desarrollo (5 y 6 células).

## 5. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos prioritarios de las URHA es la obtención de recién nacidos sanos evitando el principal problema con el que se encuentran, las gestaciones múltiples (Murray y Norman, 2014).

La implantación embrionaria está directamente relacionada con el número y la calidad de los embriones transferidos, por lo que es imprescindible encontrar marcadores que reflejen de forma objetiva la calidad del embrión para así transferir únicamente aquellos de mejor calidad y mayor potencial de implantación, disminuyendo el número de embriones a transferir y reduciendo a su vez las gestaciones múltiples sin que las tasas de implantación y gestación globales se vean afectadas (De Neubourg *et al.*, 2004; Thurin *et al.*, 2005; Holte *et al.*, 2007).

Una de las principales razones por las que no se dispone de marcadores de calidad embrionaria es debido a la falta de trazabilidad de los embriones en los ciclos de TRA (Molina *et al.*, 2013). Esto supone el desconocimiento del destino de los embriones transferidos y se convierte en uno de los principales impedimentos para realizar estudios potentes sobre la capacidad predictora de implantación de las variables morfológicas analizadas (Holte *et al.*, 2007). Esto es así porque en la práctica clínica se transfieren generalmente, siempre que haya disponibilidad para la transferencia, 2 embriones y cuando el número de embriones transferidos es mayor que el número de sacos gestacionales observados mediante ecografía, no es posible conocer las características del embrión que implantó.

Los criterios de selección embrionaria actuales basados en variables morfológicas, tales como el número de blastómeras, el porcentaje de fragmentación y la simetría e igualdad de éstas, tienen un valor subjetivo (Fisch *et al.*, 2001) y suponen una alteración en las condiciones de cultivo, con su correspondiente efecto negativo, al tener que sacar los embriones fuera del incubador cada vez que se realiza la clasificación morfológica y mantenerlos en el exterior el tiempo requerido para la evaluación (Garrisi *et al.*, 1993).

En la literatura consultada se han encontrado algunas referencias sobre la utilización de variables embrionarias morfométricas, medidas obtenidas directamente del embrión que pudieran utilizarse de forma ajena a la opinión del observador, obviando totalmente la subjetividad de la medida (Hnida *et al.*, 2004; Beuchat *et al.*, 2008; Giusti *et al.*, 2010; Santos *et*

*al.*, 2010). Sin embargo, no se ha encontrado ningún trabajo que se centre únicamente en la comparación de variables morfométricas en función del ritmo de división de las blastómeras y de la implantación.

En anteriores trabajos realizados por Molina *et al.* (2011) y Debón *et al.* (2013) se compararon variables morfológicas y morfométricas en embriones con destino conocido y las variables morfométricas resultaron más objetivas, presentando unos niveles de significación estadística más elevados que las variables morfológicas.

Recientemente, Paternot *et al.* (2013), han demostrado la utilidad de la selección embrionaria basada en criterios morfométricos tales como el número de células y el volumen total de los embriones en día 3 de desarrollo (72 horas post-inseminación). Además, Molina *et al.* (2013, 2014) han demostrado que los embriones de 4 células en día 2 de desarrollo (48 horas post-inseminación) con un menor PI, mayor FC y menor EZP presentaban probabilidades significativamente superiores de implantar.

Sin embargo, a pesar de la gran información que proporcionan las variables morfométricas, la variable número de células es uno de los marcadores morfológicos más fuertemente implicado en el potencial de implantación (Ziebe *et al.*, 1997; Van Royen *et al.*, 1999). El estadio ideal de división en embriones en día 2 es de 4 células, disminuyendo el potencial de implantación cuando el número de células aumenta o disminuye (Molina *et al.*, 2011). Además, los resultados obtenidos por diversos autores (Van Royen *et al.*, 1999; Van Montfoort *et al.*, 2004; Guerif *et al.*, 2007) indican que los embriones de 3, 4 y 5 células en día 2 presentan unas tasas de implantación significativamente superiores a las obtenidas para los embriones de 2 y 6 células en dicho momento del desarrollo.

Así pues, debido a la importancia de la variable número de células para la implantación, el objetivo del presente fue estudiar la influencia de dicha variable morfológica sobre las variables morfométricas que presentaban diferencias significativas entre embriones con 0 y 100% de implantación. Tras evaluar las variables de tamaño (PI), forma (FC) y características de la ZP (EZP) en función del número de células de los embriones en día 2 de desarrollo (48 horas post inseminación), las únicas variables que alcanzaron significación estadística fueron el PI como medida del tamaño embrionario y el EZP como variable que nos permite evaluar las características de la ZP. Por otra parte, el FC como medida de la forma del embrión no presentó diferencias en función del número de células de los embriones en día 2 de desarrollo.



En relación con el PI, se observó una disminución lineal significativa ( $p$ -valor = 0.0116) a medida que aumentaba el número de células. Además, cada división celular o incremento de una célula del embrión determinaban una disminución en promedio del perímetro de 2.70 micras.

Así pues, a pesar de que la bondad de ajuste del modelo fue de un 6.33% para el  $R^2$ , hay una tendencia negativa evidente ( $CR = -2.70$ ) en la influencia del número de células sobre el perímetro del embrión. Los resultados obtenidos para el PI en función del número de células demuestran que los embriones disminuyen su volumen de forma lineal y significativa a medida que aumenta el número de sus blastómeras. No obstante, en relación con el volumen total del embrión, hay que indicar que, en la evaluación del PI, únicamente se consideró el perímetro total que ocupan las células en el interior del espacio perivitelino sin incluir las medidas de la ZP. Por lo tanto, el volumen total de embrión se podría calcular mediante la suma del PI y del EZP.

La relevancia biológica del volumen embrionario como una característica importante para su posterior implantación, vendría explicada por el hecho de que los fallos en la regulación de dicho volumen embrionario serían los responsables de la detención del desarrollo del embrión en cuestión (Alikani *et al.*, 2000). Nuestros resultados, sugieren que el aumento en el número de células del embrión determinaría una mayor regularidad y un mejor acoplamiento de sus blastómeras con una óptima utilización del espacio perivitelino. Además, estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Paternot *et al.* (2013) para embriones en día 3 de desarrollo, en los que se observó una correlación negativa y significativa entre el volumen embrionario y el potencial de implantación, lo cual, al igual que nuestro trabajo, también sugiere que una mejor organización de las blastómeras en el espacio perivitelino sería la que podría determinar dicha disminución del volumen de los embriones que finalmente llegan a implantar, puesto que serían los que tendrían un nivel de regulación y organización mayor.

En relación con la evaluación de la forma del embrión mediante la utilización de la variable morfométrica FC, en el presente trabajo se evaluó el FC en función del número de células, observándose que los embriones presentaron forma esférica, con un FC de  $0.970 \pm 0.002$  que no se vio afectado por el número de blastómeras.

Paternot *et al.* (2013) observaron que las blastómeras presentan una forma esférica regular en el estadio de 2 células y que se convierten en elipsoidales en el estadio de 8 células. Tal vez, la forma esférica de las blastómeras en día 2 sea la responsable de la forma circular que

presentan los embriones en dicho momento del desarrollo, con independencia del número de células. Además, en anteriores trabajos realizados por Molina *et al.* (2013, 2014) se pudo demostrar que los embriones que implantaron presentaron 4 células en día 2 de desarrollo y un mayor FC, es decir, forma circular.

Nuestros resultados, indicarían que la forma circular de los embriones (FC) en día 2 de desarrollo no se ve modificada por el número de células que se encuentren en el interior del espacio perivitelino pero sí dependería de la forma circular que presenten dichas blastómeras, de acuerdo con los resultados expuestos por Paternot *et al.* (2013). No obstante, hay que destacar que, tal vez, el tamaño muestral de embriones tomados para el estudio no nos haya permitido observar diferencias en dicho FC.

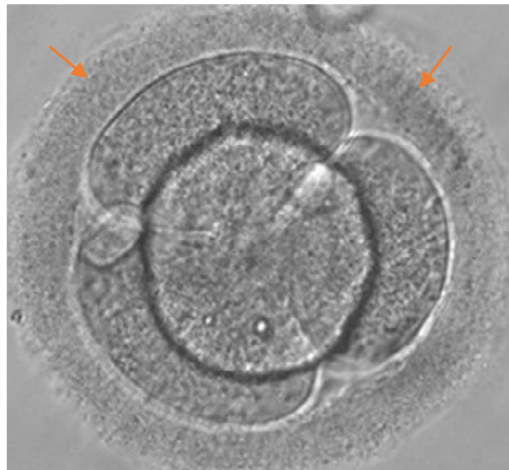
En relación con la ZP, se observa un efecto claro del número de células sobre su espesor, de modo que la ZP disminuye de forma lineal y significativa a medida que aumenta el número de blastómeras, lo cual queda reflejado por la clara tendencia descendente del EZP marcada en el modelo de regresión lineal simple con la variable explicativa número de células (CR = -2.03; p-valor = 0.03).

Sin embargo, el diagrama de dispersión del anterior modelo de regresión simple apunta hacia una posible curvatura de dicho efecto del número de blastómeras sobre el EZP. Al incluir el término de segundo grado al modelo, pese a que presenta un p-valor = 0.11, muestra una disminución progresiva en el efecto negativo anteriormente comentado a medida que aumenta el número de células del embrión.

Diversos autores han incluido la valoración morfométrica de las irregularidades en la superficie de la ZP como un factor relacionado con la implantación embrionaria (Bertrand *et al.*, 1995; Veeck, 1999; Gabrielsen *et al.*, 2001), pues el grosor o EZP influye sobre la capacidad del embrión para desarrollarse y poder implantar en el endometrio materno (Gabrielsen *et al.*, 2001).

Los embriones con un EZP menor tienen más probabilidades de implantar con éxito, coincidiendo estos resultados con los propuestos por el grupo de investigación que estudió morfométricamente el EZP y su relación con la implantación embrionaria (Roux *et al.*, 1995).

Nuestros resultados indican que el EZP se va reduciendo a medida aumenta el número de células y que esta tendencia se va ralentizando para los embriones de 5 y 6 células. De hecho, la ZP es una capa de glicoproteínas que envuelve al ovocito y al embrión (Figura 11), protegiéndolo y manteniendo su integridad tridimensional hasta el momento de la implantación (Bertrand *et al.*, 1995). Es por eso que nuestros resultados indicarían que tal vez sea esa matriz proteica formada por la ZP la que regule el tamaño y la forma del embrión en los estadios de desarrollo embrionario temprano.



**Figura 11.** Embrión de 4 células con ZP marcada con flechas (adaptada de Paternot *et al.*, 2014).

Por todo ello, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la forma del embrión se mantiene con independencia del número de células o número de divisiones que haya sufrido. Por otra parte, se observa una disminución de su tamaño estudiado mediante el PI y del EZP a medida que aumenta el número de células. Hay que considerar, sin embargo, que en este trabajo se han evaluado las variables morfométricas embrionarias en función del número de células y no de la capacidad de implantación de estos embriones. Por lo tanto, el objetivo de futuros trabajos será evaluar dichas variables relativas a la forma, tamaño y espesor de la ZP para cada estadio de división embrionaria en día 2 de desarrollo (de 2 a 6 células) en función de la tasa de implantación.

## 6. CONCLUSIONES

Según los objetivos propuestos, las conclusiones del presente trabajo son:

1. El tamaño del embrión evaluado con el PI disminuye significativamente de forma lineal a medida que aumenta el número de células.
2. La forma del embrión evaluada como FC no varía en función del número de blástomas que presenten los embriones en día 2 de desarrollo.
3. El EZP disminuye de modo significativo y lineal a medida que aumenta el número de células, estabilizándose dicho efecto para los estadios de 5 y 6 células.

## 7. REFERENCIAS

ALIKANI, M.; CALDERÓN, G.; TOMKIN, G.; GARRISI, J.; KOKOT, M.; COHEN, J. (2000). Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Human Reproduction*, 15: 2634-2643.

ASOCIACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN (ASEBIR), 2008. Cuaderno de Embriología Clínica, 25-38.

BERTRAND, E.; VAN DEN BERGH, M.; ENGLERT, Y. (1995). Fertilization and early embryology: Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Human Reproduction*, 10: 1189-1193.

BEUCHAT, A.; THE'VENAZ, P.; UNSER, M.; EBNER, T.; SENN, A.; URNER, F.; GERMOND, M.; SORZANO, C. (2008). Quantitative morphometrical characterization of human pronuclear zygotes. *Human Reproduction*, 23: 1983-1992.

BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (BOE) 2006. Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida.

CALDERÓN, G. (2003). Desarrollo y calidad embrionaria. Congreso ASEBIR, 8(2). Granada.

COLLINS, J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques*, 43: 25-30.

DEBÓN, A.; MOLINA, I.; CABRERA, S.; PELLICER, A. (2013). Mathematical methodology to obtain and compare different embryo scores. *Mathematical and Computer Modelling*, 57: 1380-1394.

DE NEUBOURG, D.; GERRIS, J.; MANGELSCHOTS, K.; VAN ROYEN, E.; VERCRUYSEN, M.; ELSEVIERS, M. (2004). Single top quality embryo transfer as a model for prediction of early pregnancy outcome. *Human Reproduction*, 19: 1476-1479.

EL-MAZNY, A.; EL-KHAYAT, W.; MAHMOUD, M. (2011). Factors Affecting IVF/ICSI Outcome: A Review of Literature. *Kasr Al-Aini Journal Of Obstetrics & Gynecology*, 2: 64-72.

EUROPEAN SOCIETY OF HUMAN REPRODUCTION AND EMBRYOLOGY (ESHRE), 2010. Assisted Reproductive Technology and Intrauterine Inseminations in Europe: “Results generated from European registers by ESHRE, presented at 2013 annual meeting of ESHRE in London”, visto el 2 de junio de 2014

<http://www.eshre.eu/guidelines-and-legal/art-fact-sheet.aspx>

FERTILITECH, 2013. Products, visto el 24 de agosto del 2014

<http://www.fertilitech.com/en-GB/Products/EmbryoScope-reg-Time-Lapse-system.aspx>

FISCH, J.D.; RODRIGUEZ, H.; ROSS, R.; OVERBY, G.; SHER, G. (2001). The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Human Reproduction*, 16: 1970–1975.

GABRIELSEN, A.; LINDENBERG, S.; PETERSEN, K. (2001). The impact of the zona pellucida thickness variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development: A prospective randomized controlled study. *Human Reproduction*, 16: 2166-2170.

GALLIANO, D.; MARTÍNEZ, D. (2008). Prevención del embarazo múltiple en técnicas de reproducción asistida. Clase de residentes, Servicio de Obstetricia y Ginecología en Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.

GARDNER, D. K.; LANE, M.; STEVENS, J.; SCHLENKER, T.; SCHOOLCRAFT, W. (2000). Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility*, 73: 1155-1158.

GARRISI, G.J.; CHIN, A.J.; DOLAN, P.M.; NAGLER, H.M.; VASQUEZ-LEVIN, M.; NAVOT, D. (1993). Analysis of factors contributing to success in a program of micromanipulation-assisted fertilization. *Fertility and Sterility*, 59: 366-74.

GIUSTI, A.; CORANI, G.; GAMBARDELLA, L.; MAGLI, C.; GIANAROLI, L. (2010). Blastomere segmentation and 3D morphology measurements of early embryos from Hoffman modulation contrast image stacks. International Symposium on Biomedical Imaging, Switzerland.

GUERIF, F.; LE GOUGE, A.; GIRAUDEAU, B.; POINDRON, J.; BIDAULT, R.; GASNIER, O.; ROYERE, D. (2007). Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: A prospective study based on 4042 embryos. *Human Reproduction*, 22: 1973-1981.

HERRERO, J.; TEJERA, A.; DE LOS SANTOS, M.; GARRIDO, N.; RAMSING, N.; MESEGUER, M. (2009). Nuevos métodos de selección embrionaria: una nueva tendencia para transferencias únicas. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 26: 393-403.

HNIDA, C.; ENGENHEIRO, E.; ZIEBE, S. (2004). Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. *Human Reproduction*, 19: 288-293.

HOLTE, J.; BERGLUND, L.; MILTON, K.; GARELLO, C.; GENNARELLI, G.; REVELLI, A.; BERGH, T. (2007). Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. *Human Reproduction*, 22: 548-557.

INSTITUTO ROCHE, 2009. Agentes en Biotecnología y Salud, visto el 24 de agosto de 2014  
[http://www.institutoroche.es/agentes/42/Plataforma\\_de\\_proteomica\\_y\\_metabolomica\\_del\\_CIC\\_bioGUNE](http://www.institutoroche.es/agentes/42/Plataforma_de_proteomica_y_metabolomica_del_CIC_bioGUNE)

KAMRAN, S.C.; REICHMAN, D.E.; MISSMER, S.A.; CORREIA, K.F.; KARACA, N.; ROMANO, A.; RACOWSKY, C. (2012). Day 3 embryo shape as a morphologic selection parameter in in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(10): 1135–1139.

LANGELY, D.T.; MAREK, D.M.; GARDNER, D.K.; DOODY, K.M.; DOODY, K.J. (2001). Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. *Human Reproduction*, 16: 902-908.

LEESE, H.; STURMEY, R.; BAUMANN, C.; McEVOY, T. (2007). Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. *Human Reproduction*, 22(12): 3047-3050.

MARTÍNEZ-BURGOS, M.; LOSADA, C.; PAREJA, S.; AGUDO, D.; BRONETY, F. (2013). Effects of low O<sub>2</sub> concentration in extended embryo culture using benchtop incubators (embryoscope and MINC). *Fertility and Sterility*, 100(3): S251.

MOLINA, I.; LAZARO, E.; DEBON, A.; PERTUSA, P.; FERNÁNDEZ, P.J.; PELLICER, A. (2011). Characterization of day 2 human embryo implantation based on morphometric and morphological parameters. *Human Reproduction*, 26(1): i198-i199.

MOLINA, I.; PERTUSA, P.; DEBON, A.; MARTÍNEZ, J.V.; RUBIO, J.M.; PELLICER, A. (2013). Utilization of morphometric objective parameters for assessing embryo quality. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 30(2): 3-11.

MOLINA, I.; MARTÍNEZ, J.V.; PERTUSA, P.; BALASCH, S.; INIESTA, I.; PELLICER, A. (2014). Assessment of the implantation of day 2 human embryos by morphometric non-subjective parameters. *Fertility and Sterility*, accepted.

MURRAY, S.R.; NORMAN, J.E. (2014). Multiple pregnancies following assisted reproductive technologies: A happy consequence or double trouble? *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 19(4): 222–227.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH), 2004. Image Processing and Analysis in Java, visto el 30 de abril de 2014

<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>

PATERNOT, G.; WETZELS, A.M.; THONON, F.; VANSTEENBRUGGE, A.; WILLEMEN, D.; DEVROE, J.; DEBROCK, S.; D'HOOGHE, T.M.; SPIESSENS, C. (2011). Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: a multicentre study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9: 127-131.

PATERNOT, G.; DEBROCK, S.; D'HOOGHE, T.M.; SPIESSENS, C. (2011). Computer-assisted embryo selection: a benefit in the evaluation of embryo quality? *Reproductive BioMedicine Online*, 23: 347-354.

PATERNOT, G.; DEBROCK, S.; DE NEUBOURG, D.; D'HOOGHE, T.M.; SPIESSENS, C. (2013). Semi-automated morphometric analysis of human embryos can reveal correlations between total embryo volume and clinical pregnancy. *Human Reproduction*, 28: 627-633.



PATERNOT, G.; DEBROCK, S.; DE NEUBOURG, D.; D'HOOOGHE, T.M.; SPIESSENS, C. (2014). The spatial arrangement of blastomeres at the 4-cell stage and IVF outcome. *Reproductive BioMedicine Online*, 28: 198–203.

RICCIARELLI, E. (2007). World frame work attitude towards multiple gestations: Legislation and guidelines. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 24(6): 405-410.

ROUX, C.; JOANNE, C.; AGNANI, G.; FROMM, M.; CLAVEQUIN, M.; BRESSON, J. (1995). Fertilization and early embryology: Morphometric parameters of living human in-vitro fertilization embryos; importance of the asynchronous division process. *Human Reproduction*, 10: 1201-1207.

SANTOS, E.; NOBLE, J.; WELLS, D. (2010). A review on automatic analysis of human embryo microscope images. *The Open Biomedical Engineering Journal*, 4: 170-177.

SCOTT, L.; FINN, A.; O'LEARY, T.; McLELLAN, S.; HILL, J. (2007). Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Human Reproduction*, 22(1): 230–240.

SIMÓN, C.; PELLICER, A. (2005). Encuentro de expertos sobre gestaciones múltiples. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 22(5): 308-310.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD (SEF), 2005. Grupo “Salud embrionaria”, visto el 8 de agosto de 2014

<http://nuevo.sefertilidad.com/recomendaciones/33.pdf>

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE FERTILIDAD (SEF), 2012. Guía para pacientes sin hijos: saber más sobre fertilidad y reproducción asistida, visto el 28 de julio de 2014

[http://nuevo.sefertilidad.com/spr\\_sef\\_fertilidad.pdf](http://nuevo.sefertilidad.com/spr_sef_fertilidad.pdf)

TEJERA, A.; HERRERO, J.; VILORIA, T.; ROMERO, J.L.; GAMIZ, P.; MESEGUER, M. (2012). Time-dependent O<sub>2</sub> consumption patterns determined optimal time ranges for selecting viable human embryos. *Fertility and Sterility*, 98(4): 849–857.

TEMPLETON, A.; MORRIS, J.K. (1998). Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine*, 339(9): 573-577.

THURIN, A.; HAUSKEN, J.; HILLENSJÖ, T.; JABLONOWSKA, B.; PINBORG, A.; STRANDELL, A.; BERGH, C. (2004). Elective Single-Embryo Transfer versus Double-Embryo Transfer In Vitro Fertilization. *The New England Journal of Medicine*, 351: 2392-2402.

THURIN, A.; HARDARSON, T.; HAUSKEN, J.; JABLONOWSKA, B.; LUNDIN, K.; PINBORG, A.; BERGH, C. (2005). Predictors of ongoing implantation in IVF in a good prognosis group of patients. *Human Reproduction*, 20: 1876-1880.

TORELLÓ, M.J. (2011). Culture until blastocyst and preimplantation genetic screening: tools to increase embryo implantation rate. *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*, 28(4): 15-18.

TWISK, M.; MASTENBROEK, S.; HOEK, A.; HEINEMAN, M.; VAN DER VEEN, F.; BOSSUYT, P.; REPPING, S.; KOREVAAR, J. (2008). No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy. *Human Reproduction*, 23(12): 2813-2817.

VAN MONTFOORT, A.; DUMOULIN, J.; KESTEN, A.; EVERS, J. (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Human Reproduction*, 19: 2103-2108.

VAN ROYEN, E.; MANGELSCHOTS, K.; DE NEUBOURG, D.; VALKENBURG, M.; VAN DE MEERSSCHE, M.; RYCKAERT, G. (1999). Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Human Reproduction*, 14: 2345-2349.

VEECK, LL. (1999). Abnormal morphology of the human oocyte and conceptus, en: *An atlas of human gametes and conceptus. An illustrated reference for assisted reproductive technology*. The Parthenon Publishing Group Inc. New York, 57-68.

VERGOUW, C.; BOTROS, L.; ROOS, P.; LENS, J.; SCHAT, R.; HOMPES, P.; BURNS, D.; LAMBALK, C. (2008). Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. *Human Reproduction*, 23(7): 1499-1504.

WOOTTON, R. (1995). Introduction to Histological Image Processing, en: *Image Analysis in Histology. Conventional and Confocal Microscopy*. Post Graduate Medical Science. Cambridge, 3-70.

ZIEBE, S.; PETERSEN, K.; LINDENBERG, S.; ANDERSEN, A.G.; GABRIELSEN, A.; ANDERSEN, A.N. (1997). Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Human Reproduction*, 12: 1545–1549.