



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR
D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL

Grado en Biotecnología

¿PUEDE LA FIV DE CO-INCUBACIÓN CORTA REEMPLAZAR LA FIV CONVENCIONAL? UNA PERSPECTIVA MORFOCINÉTICA

Trabajo Final de Grado

Curso 2015/2016



CONSORCI
HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARI
VALÈNCIA



IRIS MARTÍNEZ RODERO

Director: Dr. Juan Manuel Moreno-Moya

Tutor UPV: Dr. Francisco Marco Jiménez

Valencia, junio de 2016





ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL

FICHA RESUMEN DEL TRABAJO FIN DE GRADO

AUTORA

Alumna: Dña. Iris Martínez Rodero

DNI: 45911471K

Titulación: Grado en Biotecnología

Intensificación: Biotecnología animal y humana

DATOS DEL TRABAJO FIN DE GRADO

Título del TFG: ¿Puede la FIV de co-incubación corta reemplazar la FIV convencional? Una perspectiva morfocinética

Área de conocimiento a la que corresponde el trabajo: Biotecnología de la Reproducción Humana

Lugar de realización: Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Localidad y fecha de defensa: Valencia, junio de 2016

Director: Dr. Juan Manuel Moreno-Moya

Tutor: Prof. Francisco Marco Jiménez

Departamento: Ciencia animal

Tipo de licencia de autorización de acceso y difusión del TFG: Creative Commons: "Reconocimiento No Comercial-Sin obra derivada"

RESUMEN

Varios estudios apuntan que la reducción del tiempo de co-incubación de los gametos en fecundación *in vitro* (1-4h) puede igualar, o incluso mejorar, las tasas de implantación respecto a la fecundación *in vitro* convencional (16-18h). Esto puede deberse a que, al estar los gametos en contacto menos tiempo, disminuye la exposición del oocito a los productos tóxicos del metabolismo del espermatozoide. El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la reducción en el tiempo de co-incubación de los gametos en fecundación *in vitro* (FIV) sobre el desarrollo embrionario. Para ello, se comparan los parámetros morfocinéticos de embriones procedentes de FIV de co-incubación corta frente a los de FIV convencional. Además, se plantea la medida relativa de radicales libres mediante la cuantificación del potencial de oxidoreducción en los medios co-incubados. Aunque las tasas de fecundación resultantes de FIVc y FIV no parecen verse alteradas, se encuentran diferencias tanto en los patrones morfocinéticos de los embriones como en los medios

de cultivo. En su forma actual, la fecundación *in vitro* de co-incubación corta no parece mejorar los resultados, si bien nuevos ensayos con variaciones en el protocolo son necesarios.

PALABRAS CLAVE

Fecundación *In Vitro* (FIV) convencional, FIV co-incubación corta (FIVc), time-lapse (TL), parámetros morfocinéticos, tasa de implantación, cuantificación ROS

ABSTRACT

Some studies report reducing the time of sperm-oocyte co-incubation in *in vitro* fertilization (1-4h) equals, or even improve, the implantation rate compared to conventional *in vitro* fertilization (16-18h). It is hypothesized that the detrimental effect of toxic products coming from spermatozoa metabolism is decreased when co-incubation time is shortened. The aim of this study is to determinate the effects of reducing time of co-incubation in *in vitro* fertilization (IVF) through morphokinetic parameters. Moreover, indirect quantification of free radical products secreted by spermatozoa and granulosa cells in fertilization culture medium is presented as an additional assay. Even though fertilization rates are similar between short IVF and conventional IVF, significant differences at both morphokinetic development and fertilization media are found. It seems the current short co-incubation IVF protocol does not improve results, although more assays are needed.

KEY WORDS

conventional *In Vitro* Fertilization (IVF), short co-incubation IVF (IVFs), time-lapse (TL), morphokinetic parameters, implantation rate, ROS quantification assay

RESUM

Nombrosos estudis apunten que la reducció del temps de co-incubació dels gàmetes en FIV (1-4h) pot igualar, o fins i tot millorar, les tasses d'implantació respecte a la FIV convencional (16-18h). Açò pot estar degut a que, al estar els gàmetes en contacte menys temps, la exposició dels oocistes als productes tòxics del metabolisme del espermatzoide també disminueix. L'objectiu del present estudi es determinar l'efecte de la reducció del temps de co-incubació dels gàmetes en la fecundació *in vitro* sobre el desenvolupament embrionari. Amb tal propòsit, es comparen els paràmetres morfocinètics de embrions vivents de FIV de co-incubació curta front als de FIV

convencional. A més, es planteja la quantificació del potencial d'oxidoreducció dels medis co-incubats i productes tòxics secretats tant per l'espermatozoide com les cèl·lules de la granulosa en el medi de fecundació per a complementar l'estudi. Encara que les taxes de fecundació resultants de FIVc y FIV no pareixen ser alterados, s'han trobat diferències tant en els patrons morfocinètics dels embrions com en els medis de cultiu. En la seua forma actual, la fecundació in vitro de co-incubació curta no pareix millorar els resultats, si bé nous assatjos amb variacions en els protocols són necessaris.

PARAULES CLAU

Fecundació *In Vitro* (FIV) convencional, FIV co-incubació curta (FIVc), time-lapse (TL), paràmetres morfocinètics, taxa d'implantació, quantificació ROS

Especial dedicació del meu TFG, en ordre segons van intervenir en aquest procés:

A Jose y Paco, por despertar mi pasión por la embriología con su docencia.

A Irene, por recibirme aquella mañana calurosa de julio y apostar por mí. Por darme la oportunidad de formarme contigo. Eres la mejor jefa que se pueda desear.

A Juanma, por ser mi mentor y mi “compi” desde el día aquel que supe que los biotecnólogos también podemos ser embriólogos (y de los mejores).

A Carla, por su dulzura, su ejemplo, por tenerme en cuenta y hacerme sentir integrada desde el principio.

A Jose i Rubén, per ensenyar-me tot allò que saben amb eixa honestedat i humilitat que els caracteritza. Eterns companys, que tinguem sort!

No podría haber tenido más suerte para empezar mi carrera que la de caer en este equipo. Siempre os estaré agradecida.

I per últim, a la educació i la sanitat públiques, sense les quals vertaderament no haguera pogut dur a terme aquest projecte.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
1. Introducción	1
1.1. Retrospectiva de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRAs)	1
1.1.1. Fertilidad en el siglo XXI	2
1.1.2. Estado actual de las TRAs	4
1.2. Como la FIV difiere de la concepción natural	5
1.3. La controversia acerca de la FIV de co-incubación corta	8
1.4. Etapas del desarrollo embrionario humano <i>in vitro</i>	9
1.5. Métodos de evaluación de la calidad embrionaria	10
1.5.1. Criterios morfológicos	10
1.5.2. Criterios no morfológicos	10
1.5.2.1. Una perspectiva morfocinética	12
2. Objetivo	15
3. Material y métodos	16
3.1. Población de estudio	16
3.2. Recogida de muestras	16
3.2.1. Tratamiento de estimulación ovárica controlada (EOC)	16
3.2.2. Recuperación de los oocitos mediante punción y aspiración de los folículos	16
3.2.3. Fecundación <i>In vitro</i> (FIV) de los oocitos	17
3.2.3.1. FIV convencional	17
3.2.3.2. FIV corta	18
3.2.4. Cultivo de embriones en incubador con <i>time-lapse</i>	18
3.2.5. Valoración de los embriones	19
3.2.6. Destino de los embriones	19
3.3. Procesamiento de los datos	20
3.4. Medida indirecta de las ROS en los medios de fecundación	20
3.5. Análisis estadístico de los datos	21
4. Resultados	22
4.1. Porcentaje de fecundación en FIVc frente a FIV	22
4.2. Morfocinética del desarrollo embrionario	22
4.2.1. FIVc frente a FIV	22
4.2.2. No implantados de FIVc frente a FIV	24
4.2.3. Implantados frente a no implantados en FIV	25
4.3. Cuantificación relativa de ROS en los medios de fecundación	26

5. Discusión	27
5.1. ¿Puede la FIV de co-incubación corta reemplazar la FIV convencional?	27
5.2. ROS en el medio de fecundación	28
5.3. Limitaciones del estudio	28
6. Conclusiones	29
7. Bibliografía	30

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Factores que aconsejan el estudio precoz de la pareja (SEF, 2011)	3
Tabla 2. Resumen de las tres TRAs actualmente establecidas en orden creciente según el grado de intervención en la fecundación (Sher <i>et al.</i> , 2005)	4
Tabla 3. Datos pertenecientes a oocitos propios: ciclos, punciones, transferencias, gestaciones y partos, dónde "mixta" se refiere a tratamiento combinado de FIV/ICSI y "ectópicos" se refiere a embarazos fuera del útero (SEF, 2011)	5
Tabla 4. Porcentajes (%) de gestación animal y humana comparados (adaptado de Arthur <i>et al.</i> , 1991; Knox, 2015)	6
Tabla 5. Clasificación de la bibliografía según el indicador en el que se basaron para posicionarse a favor o en contra de la FIVc	8
Tabla 6. Clasificación de la bibliografía seleccionada según su posicionamiento respecto a la eficacia de la FIVc (7 de 11 a favor y 4 de 11 en contra).	9
Tabla 7. Categorías de calidad embrionaria y el potencial implantatorio que de ellas se espera (ASEBIR, 2015).	10
Tabla 8. Resumen de los nuevos métodos de valoración embrionaria	11
Tabla 9. Clasificación de los marcadores morfocinéticos (Milewski <i>et al.</i> , 2015)	13
Tabla 10. Intervalos de tiempo óptimos para diferentes marcadores morfocinéticos, expresados en horas (Kovacs, 2014)	14
Tabla 11. Porcentajes de fecundación de cada variante de la FIV y el p-valor resultante de la comparación de sus medias	22
Tabla 12. P-valores resultantes de la comparación de los parámetros morfocinéticos absolutos en FIVc y FIV, de los que t_6 y t_M presentan significancia estadística (p -valor $\leq 0,05$) y se destacan en amarillo	22
Tabla 13. P-valores resultantes de la comparación de los parámetros morfocinéticos relativos en FIVc y FIV, de los que ninguno presenta significancia estadística	23
Tabla 14. Casos de FIVc y FIV que conforman el estudio, según si corresponden al grupo de embriones implantados, no implantados, posiblemente implantados o vitrificados pendientes de transferencia	24
Tabla 15. P-valores resultantes de la comparación de los parámetros morfocinéticos relativos en FIVc y FIV en el grupo de no implantados, dónde aquellos p-valores significativos ($\leq 0,05$) se destacan en amarillo: t_5	24
Tabla 16. Valores resultantes de la comparación de los parámetros morfocinéticos de embriones implantados y no implantados procedentes de FIV, dónde aquellos p-valores significativos ($\geq 0,05$) se destacan en amarillo: t_5	25
Tabla 17. Distintas medidas tomadas en los medios de cultivo de fecundación, su media y su desviación estándar expresadas en milivoltios (mV)	26

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<p>Figura 1. Portada de un periódico británico del 25 de julio de 1978 dedicada a Louise Brown, popularmente referida como “el bebé probeta” (Fuente: http://biologia-3roqb.blogspot.com.es/)</p>	1
<p>Figura 2. Portada del diario ‘El País’ del 13 de julio anunciando el primer nacimiento de ‘bebé probeta’ en España (Fuente: http://elpais.com/diario/1984/07/13/sociedad/458517603_850215.html)</p>	2
<p>Figura 3. Prevalencia de la infertilidad en mujeres con deseo reproductivo en 2010 (Mascarenhas <i>et al.</i>, 2012)</p>	2
<p>Figura 4. Comparación de la tasa de natalidad real con la tasa necesaria para mantener el tamaño de la población (Eurostat Yearbook, 2009)</p>	3
<p>Figura 5. Trayecto del óvulo en el tracto reproductor femenino a lo largo del proceso de fecundación e implantación (Fuente: http://repositoriorecursos-download.educ.ar/dinamico/UnidadH)</p>	6
<p>Figura 6. Principales estadios y cronología del desarrollo embrionario temprano humano <i>in vitro</i> (Adaptado de: https://www.mivf.com.au/sites/mivf.com.au/files/fertility-treatment_ivf-treatment)</p>	9
<p>Figura 7. Número de publicaciones por año en la base de datos de Scopus según el criterio de búsqueda (<i>Title-Abs-Key (time lapse) or Title-Abs-Key (time-lapse) and Title-Abs-Key (embryo)</i>) (Fuente: www.scopus.com)</p>	12
<p>Figura 8. Incubador con tecnología <i>time-lapse</i> incorporada Miri® <i>Time Lapse</i> (Esco, Singapur) (Fuente: http://escoglobal.com/images/upload/MRI-TL_BIG.jpg)</p>	12
<p>Figura 9. Secuencia de fotogramas tomados por la cámara integrada de este equipo (cada 5 minutos y en 7 planos focales) (Fuente: Cuevas, 2016)</p>	13
<p>Figura 10. Correspondencia de los parámetros morfocinéticos con el evento celular que marcan, donde t_{PNf} hace referencia al tiempo de aparición de los pronúcleos; t_2, t_3 y t_4, t_5, t_6, t_7, t_8, t_M, t_{EB} y t_B corresponden con los sucesivos tiempos de división y S_2 (t_4-t_3), CC_2 (t_3-t_2), S_3 (t_8-t_5), CC_3 (t_5-t_3) a los intervalos entre sucesivas divisiones</p>	14
<p>Figura 11. La imagen A muestra un complejo oocito-cúmulo-corona recién sacada del folículo. La imagen B muestra el resultado de la decumulación: el oocito desnudo (Fuente: Kawahara <i>et al.</i>, 2008)</p>	18
<p>Figura 12. Captura de pantalla del software del incubador Miri© TL donde se muestra el “perfil” de una paciente y todos sus embriones en cultivo</p>	18

Figura 13. Representación de la transferencia embrionaria ecoguiada (Fuente: https://i.ytimg.com/vi/BSYkjZR4xmE/hqdefault.jpg)	19
Figura 14. Esquema del procedimiento seguido para hacer la medición en MiOXSYS System™ (Fuente: MyOXYS, 2015)	21
Figura 15. Diagrama de cajas representando la dispersión de los tiempos de división (en horas) de FIVc y FIV, dónde se destaca en amarillo aquellos parámetros estadísticamente significativos	23
Figura 16. Diagrama de cajas representando la dispersión de los tiempos (en horas) de los embriones no implantados según procedieran de FIVc o FIV, dónde se destaca en amarillo aquellos parámetros estadísticamente significativos	25
Figura 17. Diagrama de cajas representando la dispersión de los tiempos (en horas) entre implantados y no implantados de FIV, dónde se destaca en amarillo aquellos parámetros estadísticamente significativos	26

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y SUBÍNDICES

ASEBIR: Asociación Española de Biología de la Reproducción

ASRM: Asociación Americana de Medicina de la Reproducción

B: Blastocisto

CC₂: duración del segundo ciclo celular (t_3-t_2)

CC₃: tercer ciclo celular (t_5-t_3)

CCs: Células del Cúmulo

CGH: Hibridación Genómica Comparativa

CO: Consumo de Oxígeno

CP: Corpúsculo Polar

DGP: Diagnóstico Genético

EB: *Early Blastocyst* (Blastocisto temprano)

EOC: Estimulación Ovárica Controlada

ESHRE: Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente

FIV: Fecundación *In Vitro* convencional

FIVc: Fecundación *In Vitro* de co-incubación corta

FSH: Hormona folículo estimulante humana

GnHR: Hormona liberadora de gonadotropinas

h: Horas

hCG: Hormona coriónica humana

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

IA: Inseminación Artificial intrauterina

ICSI: Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides

INE: Instituto Nacional de Estadística

IO: Inducción de la Ovulación

M: mórula

MS: Espectrometría de masas

NCBI: National Center for Biotechnology Information

OMS: Organización Mundial de la Salud

PNf: *Pronuclear Fading* (desaparición de los pronúcleos)

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

ROS: especies reactivas del oxígeno

rtPCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

S₂: sincronización de la división a 4 células (t₄-t₃)

S₃: sincronización de la división a 8 células (t₈-t₅)

SD: Desviación estándar)

SEF: Sociedad Española de de Fertilidad

SET: *Single Embryo Transfer* (transferencia de un único blastocisto)

sORP: potencial de oxidoreducción estático

t₂: tiempo de división a 2 células

t₃: tiempo de división a 3 células

t₄: tiempo de división a 4 células

t₅: tiempo de división a 5 células

t₆: tiempo de división a 6 células

t₇: tiempo de división a 7 células

t₈: tiempo de división a 8 células

t_B: tiempo de división a blastocisto

t_{EB}: tiempo de división a blastocisto temprano

Title-Abs-Key. Title (título), *Abstract* (Resumen), *Key words* (Palabras clave)

t_M: tiempo de división a mórula

t_{PNf}: tiempo de desaparición de los pronúcleos

TRAs: Técnicas de Reproducción Asistida



1. INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. Retrospectiva de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRAs)

Tradicionalmente, la infertilidad ha sido un campo de la medicina en que pocas posibilidades existían para la o el paciente (Brezina & Zhao, 2011).

La **infertilidad** se define como la incapacidad de finalizar la gestación con el nacimiento de un bebé viable tras, al menos, dos pérdidas gestacionales (INSTITUTO BERNABEU, 2016). No se debe confundir con la **esterilidad**, cuya definición se refiere a la imposibilidad de concebir de manera natural por parte de una pareja en un plazo de tiempo suficiente. Dicho periodo de tiempo varía según la sociedad científica considerada: 12 meses según la Sociedad Española de de Fertilidad (SEF), la Asociación Americana de Medicina de la Reproducción (ASRM) y la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE). Mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que han de pasar 24 meses sin consecución de embarazo para poder hablar de esterilidad (Catalán *et al.*, 2007).

Sin embargo, a partir de la primera mitad del siglo XIX se empezaron a estudiar los mecanismos de fecundación y desarrollo de embriones tempranos en diferentes especies mamíferas, marinas y anfibias (Elder & Dale, 2011). De manera que, a principios de los años 60 ya se habían conseguido resultados exitosos en conejo (Chang, 1959), ratón (Whitten & Biggers, 1968) y hámster (Yanagimachi & Chang, 1964).

Siguiendo con la experimentación básica en biología reproductiva que caracterizó la década de los 60, Robert Edwards comenzó a estudiar la maduración *in vitro* de oocitos humanos en 1965 (Elder & Dale, 2011). Tanto fue así que, para febrero de 1966, Edwards, Bavister y Steptoe publicaron en Nature el artículo "Early stages of fertilization *in vitro* of human oocytes matured *in vitro*" (Edwards *et al.*, 1969). El trabajo provocó el revuelo de una comunidad internacional impactada por las implicaciones científicas, médicas, religiosas y éticas que este experimento implicaba (Elder & Dale, 2011).

No obstante, no fue hasta 1978 cuando el panorama dio un vuelco dramático con el nacimiento de Louise Brown (Figura 1), concebida mediante técnicas de Fecundación *In Vitro* (FIV) de la mano del ginecólogo Patrick C. Steptoe en Reino Unido (Brezina & Zhao, 2011). Este primer bebé engendrado en el laboratorio tomó verdadera importancia tanto para científicos como para médicos clínicos, pero sobre todo para las parejas hasta el momento infértiles (Jones, 1996).



Figura 1. Portada de un periódico británico del 25 de julio de 1978 dedicada a Louise Brown, popularmente referida como "el bebé profeta" (Fuente: <http://biologia-3roqb.blogspot.com.es/>)

En España, fue en Julio del 1984 en el Instituto Universitario Dexeus donde se consiguió el primer nacimiento de un niño por TRA –concretamente por FIV (García & Guerra., 2012).



Figura 2. Portada del diario 'El País' del 13 de julio anunciando el primer nacimiento de 'bebé probeta' en España (Fuente: http://elpais.com/diario/1984/07/13/sociedad/458517603_850215.html)

Desde entonces, y en un par de décadas; la disponibilidad de las TRA y su uso se han extendido vertiginosamente alrededor de todo el mundo (Brezina & Zhao, 2011).

1.1.1. Fertilidad en el siglo XXI

Mundial

Según la OMS, es difícil establecer la prevalencia de la infertilidad mundial dada la presencia de ambos factores masculino y femenino que, añadido a la falta de herramientas comunes para el diagnóstico, complica cualquier estimación. Aun así, en 2004 se determinó a partir de encuestas nacionales de salud estatales que 1 de cada 4 parejas se ha visto afectada por problemas de infertilidad en países desarrollados (OMS, 2016). Además, un estudio de la OMS publicado a finales de 2012 muestra que la tasa de infertilidad en mujeres de 190 países se ha mantenido respecto a los niveles de 1990-2010 (Mascarenhas *et al.*, 2012). En la figura 3 se muestra la variación de dicha tasa entre los distintos países.

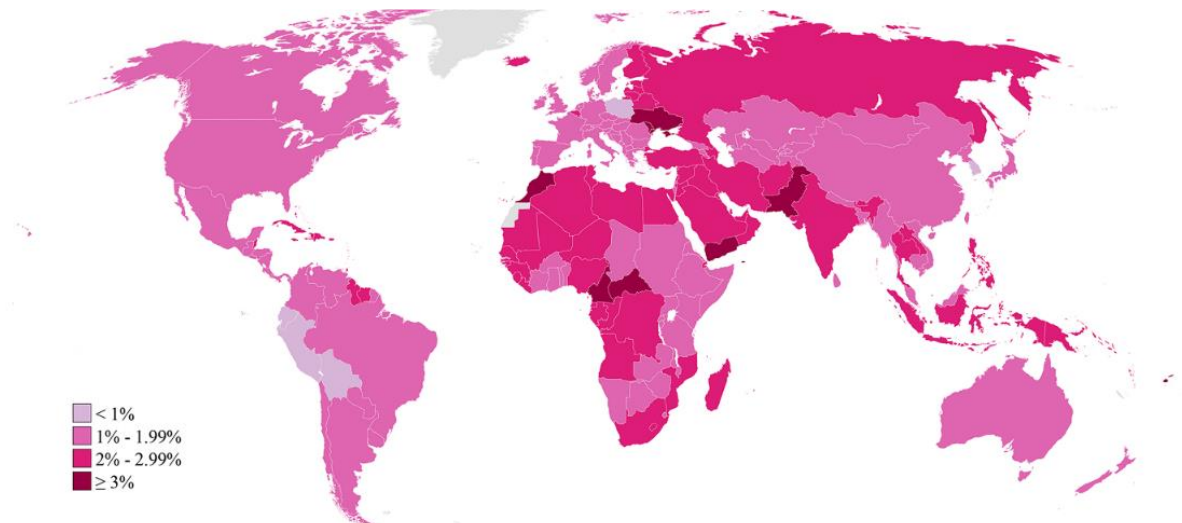


Figura 3. Prevalencia de la infertilidad en mujeres con deseo reproductivo en 2010 (Mascarenhas *et al.*, 2012)

Europa

En Europa, las tasas de fertilidad han descendido respecto al valor supuestamente necesario para mantener el tamaño de la población (SEF, 2011).

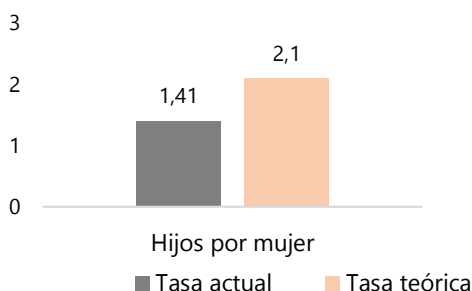


Figura 4. Comparación de la tasa de natalidad real con la tasa necesaria para mantener el tamaño de la población (Eurostat, 2009)

Tal y como puede apreciarse en la figura 4, esta diferencia puede suponer problemas socioeconómicos para sostener poblaciones envejecidas y mantener el crecimiento económico (SEF, 2011). Debido a la actual tendencia de retrasar la maternidad/paternidad, es posible afirmar que la infertilidad es una condición frecuente. Se estima que el 9,6% de las parejas hacen frente a la infertilidad en Europa (Boivin *et al.*, 2007).

España

Como ya se ha mencionado con anterioridad, establecer la prevalencia de la esterilidad presenta varias limitaciones –añadidas a las dificultades terminológicas (*fertilidad* y *esterilidad*) (SEF, 2011). El primer problema surge al intentar definir la población de estudio. Aunque la fertilidad está estrechamente relacionada con la edad, la búsqueda de descendencia no se da por igual en las diferentes subpoblaciones de una sociedad. Así, en España la edad media de matrimonio en 2008 fue de 31,46 años en la mujer y 34,51 en el varón (INE, 2010). Por tanto, se podría estimar la edad media de deseo reproductivo de una pareja en los 32 años de edad de la mujer. A dicha edad es de esperar una reducción en la fecundabilidad del 26% en relación con las mujeres de 20 a 24 años (SEF, 2011). La prevalencia de infertilidad se sitúa alrededor del 14% en España. Esto significa que alrededor de 1 de cada 7 parejas en edad reproductiva va a presentar dificultades para tener descendencia (SEF, 2011).

Además, existen ciertos factores que acentúan la necesidad de recurrir a las TRAs para concebir un hijo (Tabla 1):

Tabla 1. Factores que aconsejan el estudio precoz de la pareja (SEF, 2011)

Mujer	Varón
Edad > 35 años	Patología genital previa
Amenorrea o oligomenorrea de > 6 meses	Cirugía urogenital previa
Patología tubárica, uterina u ovárica	Enfermedad de transmisión sexual
Endometriosis	Exploración genital anormal
Enfermedades genéticas	Enfermedades genéticas
Enfermedad pélvica inflamatoria	

1.1.2. Estado actual de las TRA

Desde el primer procedimiento de FIV exitoso en 1978 y durante las últimas décadas, el uso las TRA aumenta cada año un 5-10% en países desarrollados (Jones *et al.*, 2011). A continuación, se recogen en la tabla 2 las tres técnicas de reproducción asistida más comunes:

Tabla 2. Resumen de las tres TRAs actualmente establecidas en orden creciente según el grado de intervención en la fecundación (Sher *et al.*, 2005)

		Establecimiento de la técnica en humanos	Breve descripción
Método de fecundación <i>in vivo</i>	Inseminación Artificial intrauterina (IA)	1790 ▪ John Hunter	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estimulación ovárica controlada (EOC) e inducción de la ovulación (IO) ▪ Capacitación del semen ▪ Deposición del semen (de cónyuge o de donante) en la vagina ▪ Fecundación <i>in vivo</i>
	Fecundación <i>In Vitro</i> (FIV)	1978 ▪ Patrick C. Steptoe ▪ Robert G. Edwards (Premio Nobel 2010 de Fisiología y Medicina)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estimulación ovárica controlada (EOC) e inducción de la ovulación (IO) ▪ Extracción de oocitos mediante punción folicular ▪ Capacitación del semen (cónyuge o donante) ▪ Fecundación <i>in vitro</i> de los oocitos por los espermatozoides en el seno de un medio líquido ▪ Transferencia uterina de el/los oocitos fecundados
Métodos de fecundación <i>in vitro</i>	Inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)	1992 ▪ Gianpiero Palermo	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Estimulación ovárica controlada (EOC) e inducción de la ovulación (IO) ▪ Extracción de oocitos mediante punción folicular ▪ Capacitación del semen (cónyuge o donante) ▪ Fecundación <i>in vitro</i> de los oocitos mediante inyección de un espermatozoide en su citoplasma gracias a una micropipeta

La SEF, en un intento de valorar el rendimiento de la TRAs en España, elabora cada año un informe estadístico con los resultados de cada centro participante –hasta el momento, dicha participación era voluntaria (SEF, 2013). Según el informe de 2013 –el más reciente disponible– en el que participaron 164 centros tanto públicos como privados (130 centros en FIV/ICSI y 158 centros en IA), un total de 57.330 *pacientes* fueron tratadas. De ellas, 27.780 se sometieron a procedimientos de FIV o ICSI y 29.550 a IA (SEF, 2013).

En cuanto a los métodos de fecundación *in vitro*, la ICSI fue la técnica más utilizada, tal y como se muestra en la tabla 3:

Tabla 3. Datos pertenecientes a oocitos propios: ciclos, punciones, transferencias, gestaciones y partos, dónde “mixta” se refiere a tratamiento combinado de FIV/ICSI y “ectópicos” se refiere a embarazos fuera del útero (SEF, 2013)

	FIV convencional	ICSI o mixta	TOTAL
Pacientes tratadas	3.140	24.640	27.780
Ciclos iniciados	4.522	34.069	38.591
Ciclos cancelados	546	3.683	4.229
Ciclos con punción	3.976	30.386	34.362
Transferencias	3.304	22.930	26.234
Gestaciones	1.200	8.575	9.775
Ectópicos y abortos	235 (19,6%)	1.676 (19,5%)	1.911 (19,5%)
Gestaciones con evolución desconocida	243	1.389	1.632
Partos	722	5.510	6.232
Recién nacidos vivos	868	6.661	7.529
% gestaciones por ciclos iniciados	26,5%	25,2%	25,3%
% gestaciones por punciones	30,2%	28,2%	28,4%
% gestaciones por transferencias	36,3%	37,4%	37,3%

1.2. Como la FIV difiere de la concepción natural

La fecundación *in vitro* puede verse como una extensión del proceso natural de reproducción. Simplemente, sortea muchas de las causas anatómicas o fisiológicas de infertilidad sustituyéndolas por técnicas de reproducción asistida (Sher *et al.*, 2005).

La fecundación *in vivo* es un proceso complejo que ha de darse en un periodo de tiempo muy estricto, teóricamente 12-24 horas justo después de la ovulación femenina (Sher *et al.*, 2005).

Además, ocurre sólo cuando ambos gametos –el oocito y el espermatozoide– han completado las etapas finales de maduración citoplasmática. Sin embargo, mientras que la meiosis en el espermatozoide ha finalizado previamente a la fecundación; la maduración nuclear del oocito con la segunda división mitótica sólo prosigue una vez ha sido fecundado. Por ello, se insiste en que la interacción oocito-espermatozoide es un proceso complejo de interacción célula a célula, que requiere reconocimiento específico de especie y la unión de los dos gametos (Elder & Dale, 2011).

La fecundación en humanos, ya sea espontánea o *in vitro*, parece ser un evento poco eficiente. Aún en edad reproductiva, la probabilidad promedio de embarazo es de un 15% por ciclo menstrual (Hjollund *et al.*, 2000). Tal y como se puede constatar en la tabla 4, las tasas de embarazo en el resto de mamíferos generalmente triplican las de la especie humana (Arthur *et al.*, 1991; Knox, 2015):

Tabla 4. Porcentajes (%) de gestación animal y humana comparados (Arthur *et al.*, 1991; Knox, 2015)

	Coito	Inseminación artificial	FIV con transferencia de embriones de buena calidad
Bovinos		79,7	79
Ovinos		65	
Equinos	79-90	67	
Cánidos		60-80	
Porcinos	70-80	86	
Búfalos	30-50	20-75	
Humanos	15-20	15	40

Esto se debe a que, para que un embarazo se dé en condiciones naturales en la especie humana se deben cumplir ciertos requisitos específicos (Sher *et al.*, 2005).

- Disponibilidad de **oocitos maduros y sanos** en el momento y las condiciones hormonales adecuadas.
- Producción de **espermatozoides sanos, maduros y resistentes**, que han de ser depositados en el canal cervical de la mujer coincidiendo con la ovulación de la mujer.
- Entorno **físico-químico** que favorezca la **capacitación** (activación) de los espermatozoides a medida que pasan por el tracto reproductivo femenino.
- **Trompas de Falopio** sanas que promuevan el paso de los espermatozoides y el oocito.
- **Cavidad uterina sana** sin anomalías que puedan impedir la implantación del embrión, como pueden ser tumores o endometriosis.
- **Endometrio** lo suficientemente grueso y desarrollado para soportar la correcta implantación del embrión en el útero.

La fisiología de los procesos nombrados puede apreciarse en la figura 5:

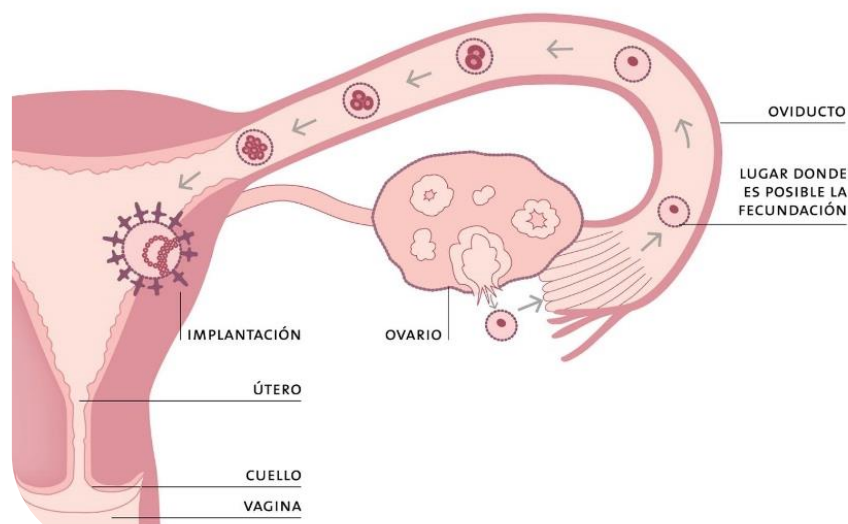


Figura 5. Trayecto del óvulo en el tracto reproductivo femenino a lo largo del proceso de fecundación e implantación (Fuente: <http://repositoriorecursos-download.educ.ar/dinamico/UnidadH>)

Teniendo en cuenta estas premisas, parece sencillo apreciar que la FIV se basa en los principios de la reproducción humana para conseguir el embarazo. Para ello, la estrategia seguida es la siguiente (Sher *et al.*, 2005):

- **Uso de medicación para producir más oocitos:** Se estimula el crecimiento de los folículos ováricos con la administración de hormonas. De esta manera, se desarrollan más folículos que en condiciones naturales, se intenta asegurar su correcta maduración y se estimula el desarrollo del endometrio. Cuantos más oocitos se extraigan, mayor es la probabilidad de conseguir embriones sanos.
- **La posibilidad de embarazo múltiple es mayor con la FIV:** una vez el embrión concebido de manera natural alcanza el útero, tiene aproximadamente un 15% de probabilidades de sobrevivir. Con la FIV, la tasa de implantación de embrión o blastocisto de buena calidad es entre un 20 y un 40% respectivamente. Para aumentar las posibilidades de éxito, en los tratamientos de reproducción asistida se tiene a transferir dos embriones a la vez. Sin embargo, el riesgo de concebir más de un bebé no sólo depende del número de embriones transferidos, si no de la calidad de los mismos –que a fin de cuentas, viene determinada por la calidad de los oocitos. Una mujer mayor de 40 tiene menor riesgo de embarazo múltiple que una mujer menor de 35, fundamentalmente por una cuestión de viabilidad embrionaria (Sher *et al.*, 2005). Dado que el embarazo múltiple se considera un efecto secundario de las TRAs y supone un peligro añadido para la paciente, la legislación española ha intervenido y establece como 3 el número de embriones máximo a transferir (Ley 14/2006).
- **La FIV hace prescindibles las trompas de Falopio:** con la extracción de los oocitos sus folículos mediante aspiración vía transductor vaginal; se subsanan los posibles problemas de ovulación u obstrucción de trompas. Más tarde, con la transferencia embrionaria y la deposición directa de los embriones en el útero también se sortea cualquier obstáculo que pueda ser causado por la infertilidad de este tipo.
- **Los espermatozoides se capacitan en el laboratorio en lugar de en el tracto reproductor femenino:** la FIV elimina muchas de las dificultades que los espermatozoides enfrentan a su paso por el moco cervical. Esto es especialmente ventajoso cuando el recuento y la calidad del esperma es pobre o cuando el moco cervical de la mujer es demasiado hostil para los espermatozoides. En la FIV, los protocolos de capacitación en el laboratorio sustituyen el papel del tracto femenino.
- **La FIV evita la reacción inmunológica contra los espermatozoides.** Cuando el esperma toma contacto con el sistema inmunológico del tracto femenino, este puede generar anticuerpos contra los espermatozoides. La FIV normalmente soluciona los casos de infertilidad debidos a dicha reacción, permitiendo la fecundación del oocito por los espermatozoides sin la interferencia de posibles anticuerpos presentes en el tracto reproductivo femenino.
- **La FIV es un procedimiento tanto de tratamiento como de diagnóstico.** La FIV se ha constituido como una herramienta para diagnosticar la fertilidad de una pareja. Permite testar si los gametos son capaces de fecundar juntos o si, por el contrario, el problema viene del oocito, del espermatozoide o de ambos. Si varios oocitos maduros se someten a FIV y se dan fallos de fecundación, queda patente que el siguiente paso será recurrir a la otra TRA: la ICSI.

1.3. La controversia acerca de la FIV de co-incubación corta (FIVc)

La técnica de Fecundación *In Vitro* (FIV) facilita el contacto directo de miles de espermatozoides capacitados con el oocito en un volumen y un tiempo determinados (16-18h) (Elder & Dale, 2011). De este modo, se eliminan las barreras que en condiciones naturales reducen el número de espermatozoides que logra llegar al sitio de fecundación en el ámpula (Trounson, 1994).

Aunque la larga duración de la co-incubación (16-18h) en FIV fue originalmente establecida por motivos prácticos –corresponde con el momento de evaluar la aparición de los pronúcleos; desde 1990 se empezaron a desarrollar protocolos de corta duración (Huang *et al.*, 2013). Esto fue gracias a Gianaroli y su equipo, que en 1996 sugirieron que la interacción espermatozoide-oocito ocurre en 1 hora (Gianaroli *et al.*, 1996). Así, la breve co-incubación de los gametos durante 1 hora antes del lavado del oocito y su paso a medio de cultivo fresco sería suficiente para permitir la fecundación (Quinn *et al.*, 1998). De hecho, aunque en 1 hora el espermatozoide no se hubiera fusionado con la membrana del oocito, sí le habría dado tiempo a adherirse a las células de la granulosa de manera que podrá fecundar finalmente en el medio fresco (Li *et al.*, 2016). Además, con este cambio de medio se descartaría el exceso de espermatozoides y se disminuiría la incidencia de la polispermia; más alta en aquellos oocitos expuestos 16-18h a los espermatozoides (Huang *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2016). Por otro lado, se mejorarían las condiciones de cultivo dado que se evitarían los productos tóxicos del metabolismo del espermatozoide, tales como las especies reactivas del oxígeno (ROS) (Aitken & Clarkson, 1987).

Sin embargo, existe cierto escepticismo hacia estos estudios –y en especial al inicial de Gianaroli y su equipo– debido a una supuesta falta de significancia estadística y reproducibilidad de resultados entre laboratorios (Bergh *et al.*, 1996; Walters, 1996; Barraud-Lange *et al.*, 2008; Lundqvist *et al.*, 2001). Los grupos en contra muestran tasas de fecundación más bajas al reducir el tiempo de co-incubación, sin además obtener una mejora en la calidad embrionaria (Barraud-Lange *et al.*, 2008).

Para medir la eficacia de la FIVc, los trabajos hasta ahora publicados se basaban principalmente en los indicadores que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 5):

Tabla 5. Clasificación de la bibliografía según el indicador en el que se basaron para posicionarse a favor o en contra de la FIVc

Indicador	Trabajos
Tasa de fecundación	Trounson, 1994; Quinn <i>et al.</i> , 1998; Lundqvist <i>et al.</i> , 2001; Barraud-Lange <i>et al.</i> , 2008; Díaz <i>et al.</i> , 2015
Tasa de implantación	Gianaroli <i>et al.</i> , 1996
Calidad embrionaria según morfología	Quinn <i>et al.</i> , 1998; Lundqvist <i>et al.</i> , 2001; Barraud-Lange <i>et al.</i> , 2008
Tasa de recién nacidos	Huang <i>et al.</i> , 2013; Li <i>et al.</i> , 2016

No obstante, tras una búsqueda exhaustiva en PubMed (NCBI) y Scopus (Elsevier) no se encontraron estudios que buscaran diferencias en la morfofocinética de embriones obtenidos con las dos variantes de la FIV. Mientras que la mayoría de trabajos comparaban resultados de FIV convencional versus FIVc, hubo uno que utilizaba datos obtenidos por ICSI para testar la eficacia de la FIVc (Menezo & Barak, 2000). Por otro lado, cabe destacar que dos de los artículos

encontrados fueron cartas al editor en respuesta a la publicación de Gianaroli en 1996 (Walters *et al.*, 1996; Bergh *et al.*, 1996).

Finalmente, se clasificaron los artículos según se posicionaban a favor o en contra de la FIVc, tal y como se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Clasificación de la bibliografía seleccionada según su posicionamiento respecto a la eficacia de la FIVc (7 de 11 a favor y 4 de 11 en contra).

Autores y año de la publicación	
Autores pro FIVc	Trounson, 1994; Gianaroli <i>et al.</i> , 1996; Quinn <i>et al.</i> , 1998; Menezo & Barak, 2000; Huang <i>et al.</i> , 2013; Díaz <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2016
Autores contra FIVc	Bergh <i>et al.</i> , 1996; Walters <i>et al.</i> , 1996; Lundqvist <i>et al.</i> , 2001; Barraud-Lange <i>et al.</i> , 2008

Por todo lo anteriormente expuesto, parece difícil posicionarse ante esta variación en la técnica de FIV y resulta necesario generar más evidencias para poder establecer un criterio uniforme y aplicable a todos los laboratorios.

1.4. Etapas del desarrollo embrionario humano *in vitro*

La velocidad de división del embrión cultivado *in vitro* respecto al crecimiento *in vivo* es ligeramente inferior (Callesen & Holm, 2015). Por ello, la división temprana de los embriones *in vitro* es un indicador su calidad y capacidad de desarrollo (SEF, 2016).

Los tiempos de división normales esperados de un embrión madurado *in vitro* son:

- En día 0: 16-18 horas después de la FIV, es posible observar la fecundación normal, característica por la presencia de los 2 pronúcleos correspondientes al gameto femenino y masculino.
- En día 1: entre 25-27 horas, en algunos embriones se produce la primera división mitótica, pudiéndose observar 2 células. –también llamadas blastómeras.
- Las divisiones siguen a lo largo de los días de manera consecutiva (véase Figura 6) hasta llegar al estado de blastocisto, dónde normalmente el desarrollo *in vitro* se detiene.

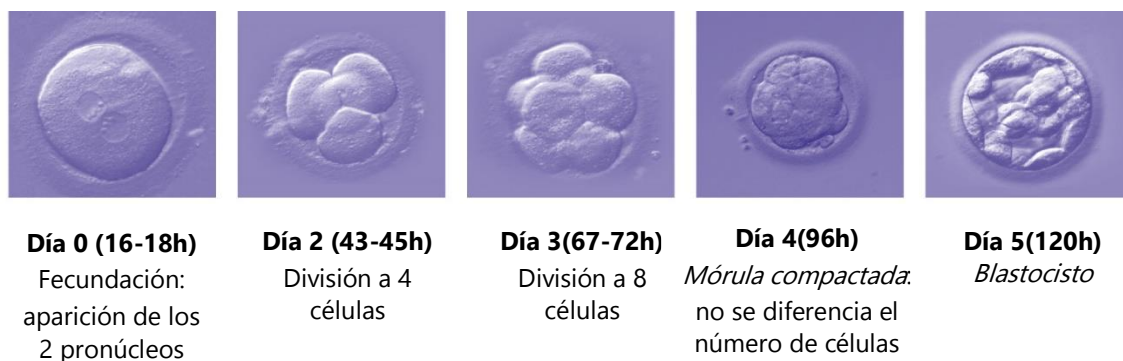


Figura 6. Principales estadios y cronología del desarrollo embrionario temprano humano *in vitro* (Adaptado de: <https://www.mivf.com.au/sites/mivf.com.au/files/fertility-treatment-ivf-treatment>)

1.5. Métodos de evaluación de la calidad embrionaria

Existen evidencias que apuntan tanto la receptividad endometrial como la calidad embrionaria como los elementos que repercuten directamente en las posibilidades de gestación (ASEBIR, 2015). Por ello, elegir el mejor embrión posible para transferir es el principal reto de la reproducción asistida (Chawla *et al.*, 2014).

Desde el nacimiento del primer bebé por FIV, la herramienta más establecida para valorar la calidad embrionaria es en base a parámetros morfológicos. El uso de otro tipo de criterios (criterios no morfológicos) aún no se ha implantado en los laboratorios, a pesar de estar demostrando su eficacia (ASEBIR, 2015).

1.5.1. Criterios morfológicos

La falta de consenso entre los distintos grupos dedicados a la embriología clínica conlleva problemas a la hora de generar estudios multicéntricos, interpretar informes clínicos de otros laboratorios o comparar datos bibliográficos (ASEBIR, 2015). Por ello, en julio de 2004 se creó por parte de ASEBIR la siguiente Comisión de trabajo: “Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de Oocito a Blastocisto”, con el objetivo de unificar los criterios de valoración embrionaria entre laboratorios (ASEBIR, 2015). En cada estadio del desarrollo embrionario se analizan ciertos parámetros morfológicos, de manera que; en el sistema final de clasificación se incluyen todos aquellos aspectos de la morfología relacionados de manera evidente con las posibilidades de implantación del pre-embrión (ASEBIR, 2015). Para el sistema de gradación se emplean 4 categorías divididas en función del potencial implantatorio esperado, tal y como se muestra en la tabla 7:

Tabla 7. Categorías de calidad embrionaria y el potencial implantatorio que de ellas se espera (ASEBIR, 2015).

	Potencial implantatorio esperado
Categoría A	Embrión de calidad óptima con máxima capacidad de implantación
Categoría B	Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación
Categoría C	Embrión regular con una probabilidad de implantación media
Categoría D	Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja. Dentro de esta categoría hay embriones con anomalías diversas, que convierten su probabilidad de implantación en nula

1.5.2. Criterios no morfológicos

Los métodos estándar de evaluación embrionaria están basados fundamentalmente la valoración subjetiva de la morfología en momentos discretos del desarrollo, tratándose así de una información limitada y muy variable inter- e intra-observador (Aparicio *et al.*, 2013). Además, la baja tasa de embarazo por transferencia obtenida (30%) conduce a la común práctica de transferir más de un embrión a la vez, incrementando el riesgo de gestación múltiple –con las complicaciones para la madre y el feto que ello conlleva (Herrero & Meseguer, 2013).

Por ello, la tendencia actual es intentar complementar el método actual de selección embrionaria mediante el uso de nuevas tecnologías. No obstante, estas nuevas técnicas deberán cumplir ciertas premisas para empezar a establecerse en la rutina de los laboratorios de FIV: invasividad

mínima para el embrión, precisión y reproducibilidad, rapidez, sencillez, objetividad y relación beneficio-coste rentable (Sturney *et al.*, 2008). A continuación, se enumeran en la siguiente tabla (Tabla 8) las nuevas técnicas de evaluación embrionaria mediante métodos no invasivos:

Tabla 8. Resumen de los nuevos métodos de valoración embrionaria

	Fundamento	Instrumentación
Diganóstico Genético Pre-implantacional (DGP) (Harper <i>et al.</i> , 2016)	Mediante el análisis genético de una o más células del embrión (blastómeras), identificar: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Viabilidad de los embriones ▪ En caso de enfermedad en los progenitores, selección del embrión sano/no portador o portador 	Biopsia de blastómeras en estado de blastocisto mediante el uso de microinyector. Análisis de su DNA y carga cromosómica por: <ul style="list-style-type: none"> ▪ rtPCR ▪ Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH) ▪ Hibridación Genómica Comparativa (CGH)
Consumo de oxígeno (CO) (Thompson <i>et al.</i> , 2016) (Tejera <i>et al.</i> , 2016)	La respiración celular como indicadora de activación mitocondrial: selección de oocitos con el mayor potencial de desarrollo Además, el aumento del CO se ha asociado a tiempos de división óptimos en los embriones – relacionado a su vez con potenciales de implantación más altos.	Medición del consumo de oxígeno, directamente proporcional a la respiración: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Métodos electroquímicos ▪ Microespectrofotometría ▪ Ultramicrofluorescencia ▪ Microscopía de escáner electroquímico ▪ Incubador con microsensor de oxígeno incorporado (Embryoscope™)
Transcriptómica de células del cúmulo (Fang <i>et al.</i> , 2016) (Ogino <i>et al.</i> , 2016)	Las células del cúmulo (CCs) acompañan al oocito en su desarrollo. Muchos de los genes expresados por dichas células controlan el crecimiento del oocito y el posterior desarrollo del embrión. Los patrones de expresión de dichos genes pueden suponer marcadores del potencial de desarrollo del oocito y del embrión.	Análisis transcriptómico del DNA presente en: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proteínas reguladoras de la transcripción ('Cited2') en las CCs ▪ DNA mitocondrial en las CCs
Análisis metabolómico del medio de cultivo (de los Santos <i>et al.</i> , 2015)	Análisis de la "huella metabólica" excretada por los embriones en el medio de cultivo como marcador del desarrollo embrionario.	Técnicas cuantitativas no invasivas: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Resonancia Magnética Nuclear (RMN) ▪ Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a MS (HPLC-MS)
Marcadores morfocinéticos mediante <i>time-lapse</i>	(Desarrollo en el siguiente epígrafe 1.4.3.1)	(Desarrollo en el siguiente epígrafe 1.4.3.1)

1.5.3. Una perspectiva morfofocinética

Una de las nuevas tecnologías introducida cada vez más en los laboratorios es el seguimiento continuo del desarrollo embrionario en tiempo real –más conocido como *time-lapse*

Los primeros usos de imágenes cinemicrográficas obtenidas por *time-lapse* fueron estudios de investigación básica en biología del desarrollo con modelos animales hace unas décadas (Grabowski & Schroeder, 1968; Gustafson & Wolpert, 1999). Uno de los primeros estudios de *time-lapse* en cinética de los embriones humanos fue el de Payne y su equipo en 1997. Este trabajo elucidó la secuencia completa de eventos morfológicos que ocurren en el embrión, incluyendo la formación de los pronúcleos (Payne *et al.*, 1997). Sin embargo, no fue hasta 2008 cuando se propuso la monitorización por *time-lapse* como un método potencial para la selección de embriones en la clínica (Arav *et al.*, 2008; Lemmen *et al.*, 2008). A partir de este momento, se empezó a incorporar esta tecnología al campo de la reproducción asistida, a la vez que el número de publicaciones sufrió un aumento exponencial–tal y como se muestra en la figura 7.

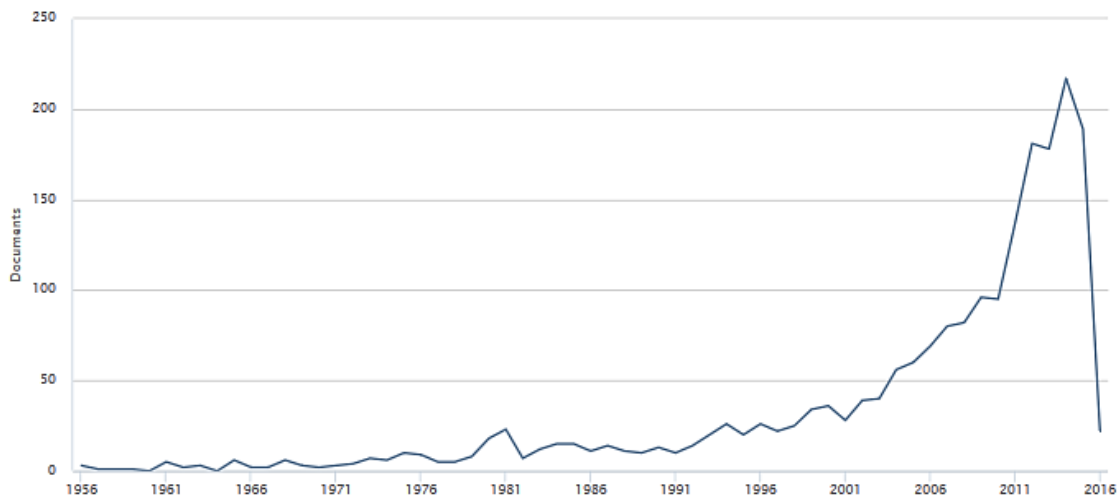


Figura 7. Número de publicaciones por año en la base de datos de Scopus según el criterio de búsqueda (Title-Abs-Key (time lapse) or Title-Abs-Key (time-lapse) and Title-Abs-Key (embryo)) (Fuente: www.scopus.com)

Usualmente, los embriólogos sacaban los embriones una vez al día del incubador para evaluar su morfología y estado de división, pero este tipo de seguimiento es limitado, ya que proporciona una sola instantánea de un proceso dinámico. Además, los embriones no toleran bien el cambio de las condiciones de cultivo óptimas del incubador. Gracias a la implantación de esta tecnología de imagen en los incubadores, los embriones pueden ser monitorizados sin tener que sacarlos. La cámara que incorporan los incubadores toma fotos de los embriones con una frecuencia determinada y en múltiples planos focales, de manera tal que, con el software apropiado pueden crearse vídeos dónde se muestra su progresión (Kovacs, 2015).



Figura 8. Incubador con tecnología *time-lapse* incorporada Miri® Time Lapse (Esco, Singapur) (Fuente: http://escoglobal.com/images/upload/MRI-TL_BIG.jpg)

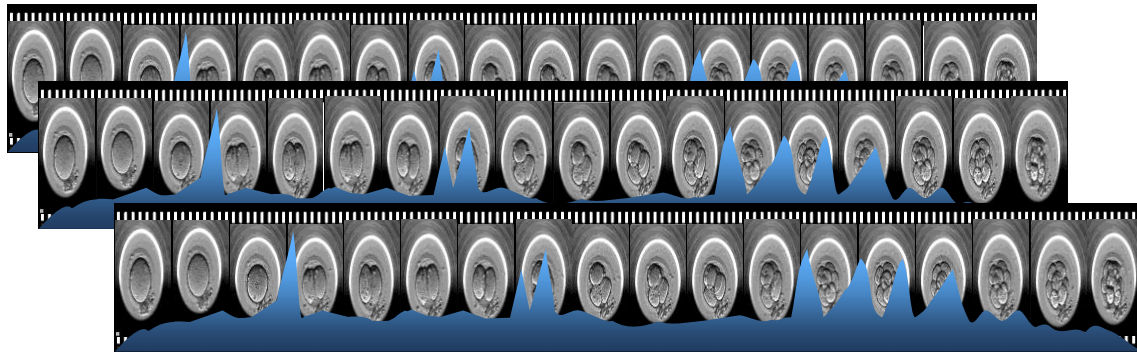


Figura 9. Secuencia de fotogramas tomados por la cámara integrada de este equipo (cada 5 minutos y en 7 planos focales) (Fuente: Cuevas, 2016)

Time-lapse permite la recolección de una gran cantidad de información acerca de los tiempos de división y la dinámica de los cambios morfológicos (Kovacs, 2015). A medida que el embrión prosigue con su desarrollo, el embriólogo puede observar, registrar y datar cada evento celular del embrión sin perturbar las condiciones de cultivo (Chamayou & Guglielmino, 2015).

Los parámetros morfocinéticos son variables numéricas (tiempos puntuales o intervalos), que relacionan fenotipos regulares o irregulares con el momento exacto en el que aparecen. Es decir, miden la aparición y/o duración de eventos celulares del embrión como, por ejemplo: el momento de aparición/desaparición de los pronúcleos (t_{PNf}), el tiempo que tarda el cigoto en dividirse en sus dos células hijas (t_2), la sincronización de la división de las sucesivas blastómeras (S_2, S_3) o el tiempo que tarda un blastocisto contraído en re-expandirse (Chamayou & Guglielmino, 2015). Actualmente, los estudios basados en *time-lapse* utilizan marcadores morfocinéticos para seleccionar embriones con potencial implantatorio (Kirkegaard *et al.*, 2015), testar diferentes medios de cultivo (Hardarson *et al.*, 2015), detectar multinucleación y anomalías en la división (Desai *et al.*, 2014), predecir aneuploidías (Kramer *et al.*, 2014) o predecir la llegada a estado de blastocisto (Milewski *et al.*, 2015).

Los parámetros morfocinéticos pueden dividirse en absolutos o relativos, tal y como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Clasificación de los marcadores morfocinéticos (Milewski *et al.*, 2015)

Marcadores morfocinéticos absolutos	Parámetros tempranos	Tiempo desde la fecundación hasta la desaparición de los pronúcleos y las sucesivas divisiones a 2, 3 y 5 blastómeras: t_{PNf}, t_2, t_3 y t_4
	Parámetros tardíos:	Tiempo desde la fecundación hasta las sucesivas divisiones a 6, 7, 8 blastómeras, mórula, blastocisto temprano y blastocisto: $t_5, t_6, t_7, t_8, t_M, t_{EB}$ y t_B
Marcadores morfocinéticos relativos	Intervalos entre sucesivas divisiones: duración del segundo ciclo celular CC_2 (t_3-t_2), sincronización de la división a 4 células S_2 (t_4-t_3), tercer ciclo celular CC_3 (t_5-t_3) y sincronización de la división a 8 células S_3 (t_8-t_5)	

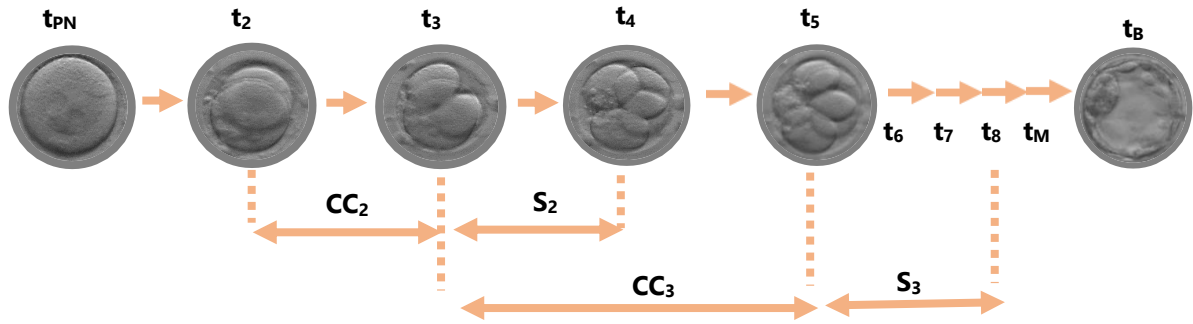


Figura 10. Correspondencia de los parámetros morfocinéticos con el evento celular que marcan, donde t_{PN} hace referencia al tiempo de aparición de los pronúcleos; t_2 , t_3 y t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8 , t_M , t_{EB} y t_B corresponden con los sucesivos tiempos de división y S_2 (t_4-t_3), CC_2 (t_3-t_2), S_3 (t_8-t_5), CC_3 (t_5-t_3) a los intervalos entre sucesivas divisiones

A partir de este tipo de datos se han publicado numerosos estudios relacionando la morfocinética del embrión con las características de los pacientes, la estimulación ovárica o los diferentes protocolos usados en el laboratorio. Cada autor crea un modelo estadístico para seleccionar los embriones con mayor potencial implantatorio (Chamayou & Guglielmino, 2015). Estos modelos establecen intervalos de confianza para cada parámetro morfocinético, teniendo en cuenta los valores procedentes de embriones que, o bien han llegado hasta el estado de blastocisto, o bien finalmente han resultado en implantación y embarazo exitoso (Kovacs, 2014). En la tabla 10 se recogen los intervalos de tiempo óptimos para los marcadores morfocinéticos según diferentes grupos:

Tabla 10. Intervalos de tiempo óptimos para diferentes marcadores morfocinéticos, expresados en horas (Kovacs, 2014)

	Wong <i>et al.</i> , 2010	Meseguer <i>et al.</i> , 2011	Cruz <i>et al.</i> , 2012	Conaghan <i>et al.</i> , 2013	Basile <i>et al.</i> , 2014
CC_2	11,1±2,2	≤11,9		9,33-11,45	
S_2	1 ±1,6	≤0,76	≤0,76	≤1,73	
t_5		48,8-56,6	48,8-56,6		47,2-58,2
CC_3					11,7-18,2

*parámetros morfocinéticos expresados en tiempo absoluto desde el inicio del procedimiento FIV (sin normalizar respecto a la desaparición de pronúcleos), donde CC_2 : t_3-t_2 ; S_2 : t_4-t_3 ; t_5 : tiempo hasta el estado de 5 células, CC_3 : t_5-t_3



2. OBJETIVO



2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la reducción en el tiempo de co-incubación de los gametos en FIV sobre el desarrollo embrionario. Para ello, se comparan los parámetros morfocinéticos de embriones procedentes de FIVc y FIV convencional. Además, se pretende cuantificar la presencia de radicales libres en ambos medios de co-cultivo.



3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población de estudio

El estudio tuvo lugar en la Unidad de Medicina Reproductiva del Hospital General Universitario de Valencia, dónde se hicieron 61 ciclos de reproducción asistida entre enero del 2015 y abril de 2016. De dichos tratamientos, 415 oocitos se fecundaron por FIV y de ellos, el 45,06% por FIVc y el 59,95% por FIV convencional.

Sin embargo, de esos 415 oocitos, sólo 83 embriones resultaron seleccionados para ser transferidos a la paciente o criopreservados para futura transferencia. Así, el análisis retrospectivo de parámetros morfofocinéticos contó con 83 películas *time-lapse* correspondientes a 83 embriones de buena calidad. De estos, el 53,01% habían sido concebidos por FIVc y el 46,98% por FIV.

3.2. Recogida de muestras

3.2.1. Tratamiento de estimulación ovárica controlada

Las pacientes fueron estimuladas con hormona folículo estimulante (FSH) (Gonal-F®, Merk, USA) (225ui/día) recombinante para maximizar el número de oocitos recuperados destinados al tratamiento. Una vez los folículos, controlados por ecografía vaginal, alcanzaban un tamaño de unos 15 mm, se administraban 0,25 mg/día de antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (Orgalutran®, Merk, USA) para bloquear la hipófisis y evitar el pico endógeno de LH. Cuando al menos 2 de los folículos alcanzaban la madurez y llegaban hasta los 18-20 mm de diámetro, se inducía la ovulación mediante la inyección (250 µg/0,5 mL) de hormona coriónica humana (hCG) (Ovitrelle®, Merk, USA).

3.2.2. Recuperación de los oocitos mediante punción y aspiración de los folículos

36-38 horas después de la administración de la hCG, se procedía a recuperar los oocitos mediante punción y aspiración folicular guiada por ecografía vaginal en quirófano bajo anestesia general superficial con propofol (2-3 g/kg). Para ello, se acoplaba una aguja de punción al transductor vaginal del ecógrafo. A su vez, dicha aguja contaba con una salida hacia un sistema aspirador de 180 mmHg y estaba conectada a un catéter acabada en un tapón acoplado a un tubo Falcon. Cuando la/el ginecóloga/o introducía el transductor por vía vaginal, exploraba la pelvis menor para comprobar la posición del útero, la calidad del endometrio, la accesibilidad y localización de los ovarios y los folículos a aspirar. De este modo, se puncionaban todos los folículos maduros y se aspiraban mediante el sistema de vacío, recogiendo el líquido folicular que contendría los oocitos en un tubo Falcon. Dichos tubos se mantenían a temperatura fisiológica en un bloque térmico mientras la/el embrióloga/o recuperaba los oocitos del líquido folicular bajo lupa y los colocaba en una placa de 4 pocillos (IVF Multidish 4 Well Nunclon™, Nunc) con medio de cultivo tamponado limpio (Multipurpose Handling Medium™, Irvine Scientific®, USA). Una vez terminada la punción, dicha placa se llevaba al laboratorio de FIV en un transportador térmico (Thermo Cell Transporter C40™, Labotect, Alemania), dónde los ovocitos se pasaban a un medio de cultivo previamente gaseado (Fertilization medium, COOK®, Australia) y se mantenían en incubador Labotect C42 (Labotect, Alemania) a 20% O₂, 6% CO₂, 95% de humedad relativa y 37°C hasta el momento de la fecundación.

3.2.3. Fecundación *In vitro* (FIV) de los oocitos

Según los antecedentes de la pareja, existen ciertas indicaciones para determinar la técnica de reproducción asistida: IA, FIV o ICSI. Sin embargo, en este estudio sólo se analizaron aquellos embriones obtenidos por FIV (FIVc o FIV convencional).

3.2.3.1. FIV convencional (FIV)

Desde el momento de la punción, los oocitos permanecían en medio de cultivo gaseado (Fertilization medium, COOK®, Australia) en el incubador.

Por otro lado, debía prepararse la muestra de semen para capacitarla y limpiarla del mayor número posible de impurezas (espermatozoides inmóviles, células inmunológicas, etc.). Con tal fin, se hacía uso de la capacitación mediante gradiente de densidad para procesar el semen que, posteriormente, se pondría en contacto con los oocitos. Esta técnica de capacitación se basa en las diferencias de densidad entre los diferentes componentes seminales y morfologías espermáticas para seleccionar los mejores espermatozoides. De manera que, dichos componentes no seminales (restos celulares y plasma seminal) quedaban en capas del gradiente superiores junto con los espermatozoides inmóviles o de motilidad limitada; mientras que aquellos espermatozoides que presentaban mejor motilidad, conseguían atravesar más rápidamente las diferentes capas del gradiente hasta llegar al fondo. El gradiente se preparaba mezclando 1,5 mL de PureSperm (Nidacon™) al 90% y 1 mL de PureSperm (Nicadon™) al 45% en un tubo Falcon. Sobre este, se colocaba 1 mL de la muestra de semen y se centrifugaba durante 20 minutos a 12000 rpm. Transcurrido ese tiempo, se aspiraba con pipeta Pasteur el pellet formado en el fondo del tubo. Esta fracción se resuspendía en medio de cultivo (Fertilization medium, COOK®, Australia) limpio y gaseado, y se volvía a centrifugar 7 minutos a 1800 rpm. El sobrenadante resultante se descartaba y el pellet se resuspendía de nuevo en medio de fecundación (Fertilization medium, COOK®, Australia). Se determinaba la concentración de espermatozoides en cámara Makler y se ajustaba la concentración hasta $1 \cdot 10^6$ spz/mL.

Una vez estaba listo el semen, se preparaba la placa para la inseminación de los oocitos. Dicha placa consistía en 3 gotas de lavado de 40 μ L de medio de fecundación (Fertilization medium, COOK®, Australia) y tantas gotas de 20 μ L de la dilución de espermatozoides como oocitos hubiera para inseminar. Siguiendo el sistema de gota flotante, la placa hidrofóbica se sombreaba con el medio. Inmediatamente, se cubría la placa con 3 mL de aceite mineral (Ovoil™, Vitrolife) y se colocaba la microgota sobre la sombra previa lo más rápido posible –para evitar cambios en la osmolaridad y concentración de CO₂ del medio. Seguidamente, la placa se colocaba en un incubador para gasearla y equilibrar el pH del medio de cultivo. 30 minutos después, se procedía a la inseminación de los oocitos, colocando cada uno de ellos en una de las gotas de espermatozoides con la ayuda de una pipeta Pasteur previamente flameada.

Finalmente, en el caso de la FIV convencional, 18-19 horas tras la inseminación se decumulaban los oocitos para poder evaluar la fecundación con claridad. La decumulación consiste en la eliminación de las células de la granulosa que forman, junto con el oocito, el complejo oocito-cúmulo-corona sometiendo a este a estrés mecánico al hacerlo pasar por pipetas Pasteur de diámetro decreciente.

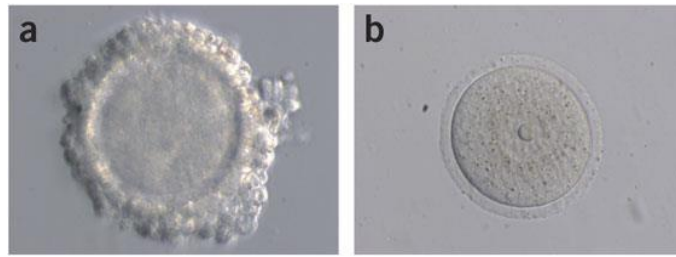


Figura 11. La imagen A muestra un complejo oocito-cúmulo-corona recién sacada del folículo. La imagen B muestra el resultado de la decumulación: el oocito desnudo (Fuente: Kawahara *et al.*, 2008)

3.2.3.2. FIV corta (FIVc)

El procedimiento de FIVc sólo difería del seguido en FIV convencional en cuanto al periodo de tiempo transcurrido entre la inseminación de los oocitos y su decumulación. Mientras que en la última se co-incubaban ambos gametos 18-19 horas, en el caso de la FIVc eran 2 horas.

3.2.4. Cultivo de embriones en incubador *time-lapse*

Una vez los oocitos resultantes de la FIV habían sido decumulados, se valoraba la fecundación o no de los mismos. Sólo aquellos embriones en los que se observaban dos pronúcleos y dos corpúsculos polares (CPs) eran los correctamente fecundados. Dichos embriones se pasaban a placas de cultivo Miri® TL, específicas para cultivo en el incubador con tecnología *time-lapse* incorporada (Miri® *Time Lapse Incubator*, Esco, Singapur) bajo condiciones de cultivo a 5% O₂, 6% CO₂ y 37° C de temperatura. En dichas placas, las microgotas de medio de cultivo (Single Step Media, Irvine Scientific®, USA) eran de 20 µL y también se preparaban según el sistema de gota flotante, cubiertas por 3,5 mL de aceite mineral Sage®.

Una vez colocados los embriones en cada pocillo, la placa se introducía en el incubador Miri® *Time Lapse Incubator* (Esco, Singapur), dónde se enfocaba cada embrión a través de la pantalla frontal del equipo. Posteriormente, el software del ordenador facilitaba la asignación de los embriones a cada paciente. De manera tal que, era posible acceder en cualquier momento al perfil de cada paciente, dónde se encontraban recogidas las grabaciones de cada uno de sus embriones.

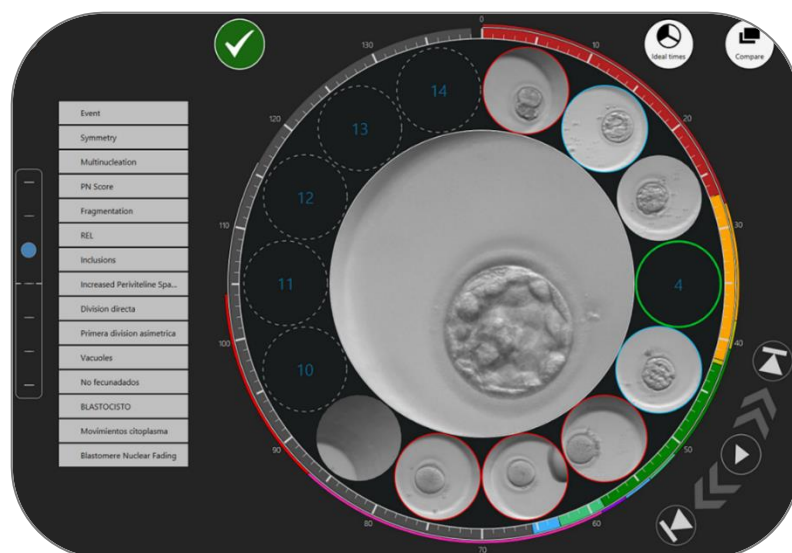


Figura 12. Captura de pantalla del software del incubador Miri® TL dónde se muestra el "perfil" de una paciente y todos sus embriones en cultivo

3.2.5. Valoración de los embriones

Con el seguimiento continuo del desarrollo del embrión, tanto a nivel morfológico como cinético (tiempos de división), era posible establecer marcadores objetivos y cuantitativos asociados con la viabilidad del embrión y su capacidad de implantación. Dos tipos de criterios se tenían en cuenta para valorar los embriones cada día del cultivo *in vitro*, desde el día 1 –a las 24 horas de la fecundación, hasta el día de la transferencia:

A. Criterios morfológicos

A cada embrión se le asignaba una categoría según la clasificación de ASEBIR (A, B, C o D) teniendo en cuenta los aspectos morfológicos pertinentes.

B. Criterios morfocinéticos

Los marcadores evaluados en cada embrión fueron los anteriormente indicados en la figura 10: tiempo hasta la división a 2 células (t_2), a 3 células (t_3) y así sucesivamente hasta el estado de blastocisto (t_B).

3.2.6. Destino de los embriones

Siempre que se encontraban embriones morfológicamente óptimos en día 2, 3 o 5 de cultivo (Grado A en clasificación ASEBIR) dentro de la cohorte, éstos eran elegidos para transferir. Si había más de uno, o bien se transferían dos –práctica que se está intentando sustituir por la transferencia de un único blastocisto (*Single Embyo Transfer, SET*), o bien se transfería uno y se vitrificaba el resto. También se vitrificaba los embriones en las pacientes que habían sufrido el síndrome de hiperestimulación ovárica, en cuyo caso se debía de evitar la implantación.

La transferencia embrionaria consistía en la deposición del embrión/embriones a 1 cm del endometrio mediante control ecográfico abdominal. El o los embriones a transferir, se pasaban de la placa Miri® TL a un medio de cultivo específico para la transferencia (Continuous Single Culture™, Irvine Scientific®, USA), que contenía ácido hialurónico para favorecer la implantación. Permanecían en él durante 10-15 minutos antes de la transferencia. En ese tiempo, el/la ginecólogo/a canaliza la vagina con una cánula exterior y atraviesa los orificios cervicales externo e interno con una cánula interior. Una vez ha sido canalizado el endometrio con la cánula exterior, el/la embriólogo/a carga los embriones en una jeringuilla de insulina y la introduce en la cánula. Siguiendo las instrucciones de el/la ginecólogo/a, que controla la posición de la cánula en el endometrio por ecografía, el/la embriólogo/a va inyectando el contenido de la jeringuilla hasta depositar los embriones en la posición correcta –de modo que quedan embebidos en el endometrio para facilitar su implantación (véase figura 13).

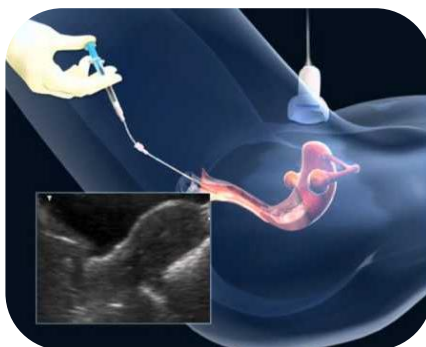


Figura 13. Representación de la transferencia embrionaria ecoguiada (Fuente: <https://i.ytimg.com/vi/BSYkjZR4xmE/hqdefault.jpg>)

15 días después de la transferencia, se medían los niveles de β -hCG en sangre para comprobar, con el resultado positivo (≥ 25 mUI β -hCG/mL sangre), la implantación del/los embriones. El embarazo clínico se confirmaba con la visualización del saco gestacional intrauterino con latido fetal 5 semanas después de la transferencia.

3.3. Procesamiento de los datos

Una vez crecidos los embriones, se exportaban sus datos morfofocinéticos contenidos en la base de datos del incubador. De manera que, los datos se organizaban del siguiente modo: diferentes tiempos de división, t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 , t_8 , t_M , t_{EB} , t_B , cc_2 , s_2 , cc_3 y s_3 , para cada tipo de FIV, FIV y FIVc, según el destino final de los embriones: implantados, no implantados, posiblemente implantados o vitrificados. El grupo de posible implantación correspondía a transferencias de dos embriones que resultaron en embarazos de un saco. Posteriormente, se normalizaron todos los tiempos respecto al tiempo de desaparición de los pronúcelos (t_{PNf}). Por otro lado, se construyeron diagramas de cajas (gráficos *Box-and-Whisker*) comparando los valores de cada parámetro morfofocinético según procediera de FIV o de FIVc. Estos gráficos se hicieron también para apreciar la distribución de los parámetros morfofocinéticos entre FIVc y FIV en los embriones no implantados.

3.4. Medida indirecta de las ROS en los medios de fecundación

Dado que la una de las ventajas más destacada por los defensores de la FIVc es la menor exposición del oocito a las ROS secretadas por los espermatozoides al medio (Gianaroli *et al.*, 1996), se planteó la comparación del potencial redox en el medio de fecundación de FIVc y FIV. Con dicho propósito se hicieron 9 medidas haciendo uso del dispositivo MiOXSYS™ (MiOXSYS System™). El sistema MiOXSYS™ se basa en la tecnología electroquímica para cuantificar el potencial de oxidoreducción estático (sORP) en milivoltios (mV) (MiOXSYS Manual).

El diseño experimental para la toma de las 9 medidas fue el siguiente:

- 3 muestras "blanco": se tomaron 20 μ L del medio de cultivo de fecundación en fresco y embebido en aceite mineral tras 2 y 19 horas de cultivo.
- 3 muestras de medio de FIV: se tomaron 20 μ L del medio de fecundación después de 19 horas de haber inseminado los oocitos de 3 pacientes diferentes
- 3 muestras de medio de FIVc: se tomaron 20 μ L del medio de fecundación después de 2 horas de haber inseminado los oocitos de 3 pacientes diferentes

Para ello, se depositaron 20 μ L de cada muestra en el sensor (MiOXSYS Sensor™), que contenía un electrodo de platino. Este a su vez, se insertaba en el analizador (MiOXSYS Analyzer™), que contaba con un electrodo de referencia de plata y cloruro de plata (Ag/AgCl). A medida que se completaba el circuito electroquímico cuando la muestra fluía a través del electrodo del sensor y llenaba el electrodo de referencia del analizador, se iniciaba la cuantificación (véase Figura 14).

Sin embargo, el resultado proporcionado por MiOXSYS™ no era una cuantificación directa de las ROS, si no del estrés oxidativo total a través de la medida sORP. El potencial de oxidoreducción estático (sORP) es un ratio entre la actividad oxidativa total (procedente de ROS, tioles oxidados, radicales superóxido, radicales hidroxilo, etc.) y la actividad reductora total (gracias a grupos tiol libres, ascorbatos, β -carotenos, ácido úrico, etc.).

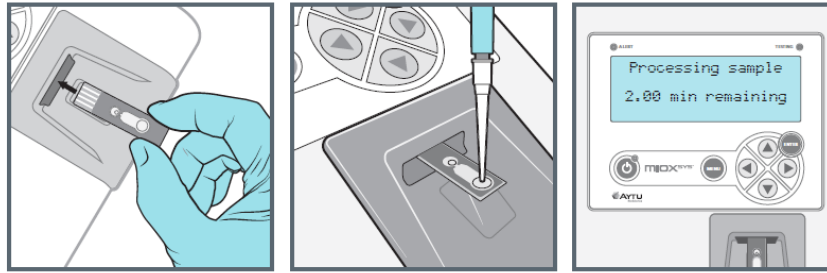


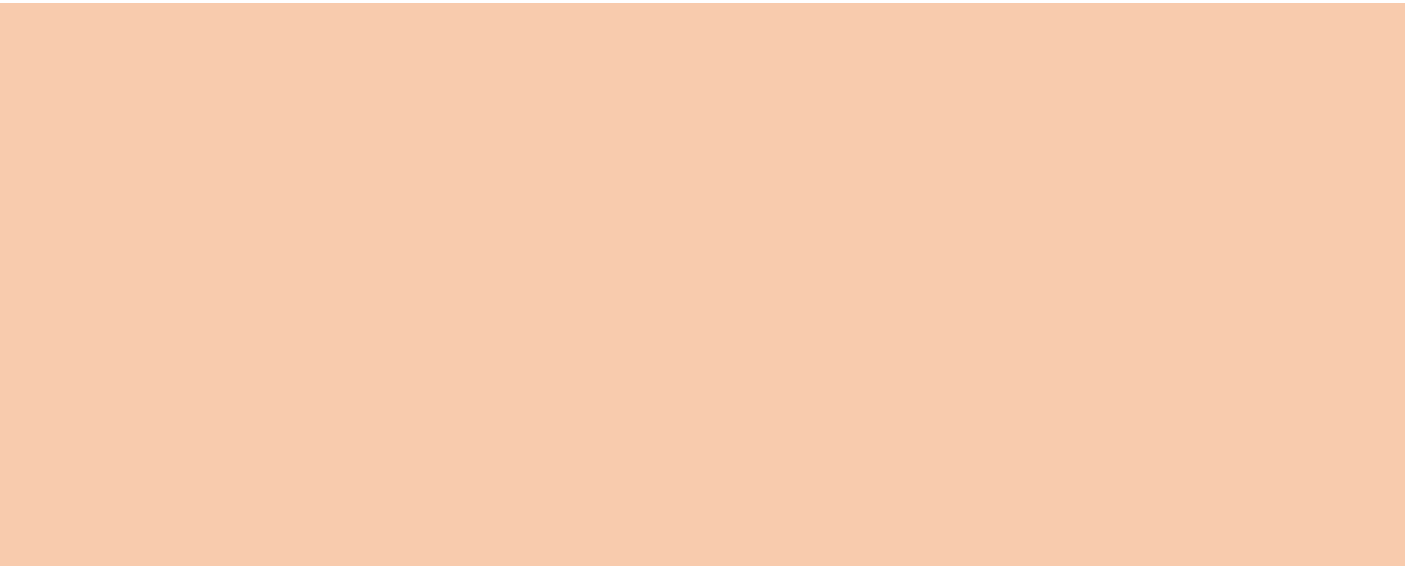
Figura 14. Esquema del procedimiento seguido para hacer la medición en MiOXSYS System™ (Fuente: MyOXYS, 2015)

3.5. Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos se hicieron usando el software SPSS Statistics v19 (IBM©). Se usó la prueba no paramétrica para la comparación de muestras independientes U de Mann-Whitney dado que se corroboró previamente la ausencia de distribución normal en los datos con el test de Kolmogórov-Smirnov. El nivel de significación establecido fue de 0,05.



4. RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. Porcentaje de fecundación en FIVc frente a FIV

En primer lugar, se comparó la tasa de fecundación de los oocitos mediante FIVc frente a FIV. Para ello, se mediaron los porcentajes de fecundación de los 415 oocitos iniciales, según si fueron sometidos a FIVc o FIV. No obstante, no se tuvieron en cuenta los fallos de fecundación (0% tasa de fecundación), dado que en dichos casos el factor determinante no fue tanto la técnica usada sino los propios gametos, incapaces de fecundarse. La siguiente tabla (Tabla 11) muestra los porcentajes de éxito de cada técnica:

Tabla 11. Porcentajes de fecundación de cada variante de la FIV y el p-valor resultante de la comparación de sus medias

	Media ± DS	N oocitos	Total oocitos
% grupo experimental (FIVc)	66,69 ± 23,77	223	404
% fecundación FIV (control)	61,48 ± 25,79	181	
p-valor	0,514		

*Dónde SD significa desviación estándar, N hace referencia al número de oocitos analizados y p-valor testa la diferencia estadísticamente significativa de las medias (U de Mann-Whitney)

Como puede apreciarse en la tabla 11, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados proporcionados por FIVc y FIV a nivel de fecundación. De estos oocitos, sólo 83 fueron de la suficiente calidad como para ser transferidos o criopreservados. De este modo, se procedió a analizar los resultados, pero esta vez desde el punto de vista del desarrollo de dichos embriones valorados como de buena calidad.

4.2. Morfofocinética del desarrollo embrionario

4.2.1. FIVc frente a FIV

Se estudió el efecto de la reducción en el tiempo de co-incubación de los gametos en el posterior desarrollo embrionario desde una perspectiva morfofocinética. Es decir, para cada parámetro morfofocinético se compararon los valores procedentes de 83 embriones según venían de FIVc o de FIV. Para ello, se compararon las medias de los respectivos grupos (Tabla 12 y 13).

Tabla 12. P-valores resultantes de la comparación de los parámetros morfofocinéticos absolutos en FIVc y FIV, de los que t_6 y t_M presentan significancia estadística (p -valor $\leq 0,05$) y se destacan en amarillo

	p-valor
t_2	0,462
t_3	0,451
t_4	0,471
t_5	0,104
t_6	0,012-
t_7	0,138
t_8	0,059
t_M	0,033
t_{EB}	0,710
t_B	0,176

*Dónde t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 y t_8 hacen referencia a los tiempos de división a dos, tres, cuatro y sucesivas blastómeras, t_M división a mórula, t_{EB} a blastocisto temprano y t_B a blastocisto

Tabla 13. P-valores resultantes de la comparación de los parámetros morfocinéticos relativos en FIVc y FIV, de los que ninguno presenta significancia estadística

	p-valor
CC ₂	0,318
S ₂	0,717
CC ₃	0,738
S ₃	0,272

*Dónde CC₂ es t₃-t₂; S₂ es t₄-t₃, CC₃ es t₅-t₃ y S₃ es t₈-t₅

Posteriormente, se construyó un diagrama de cajas para representar la distribución de aquellos parámetros que salieron significativos: t₆ y t_M (Figura 15).

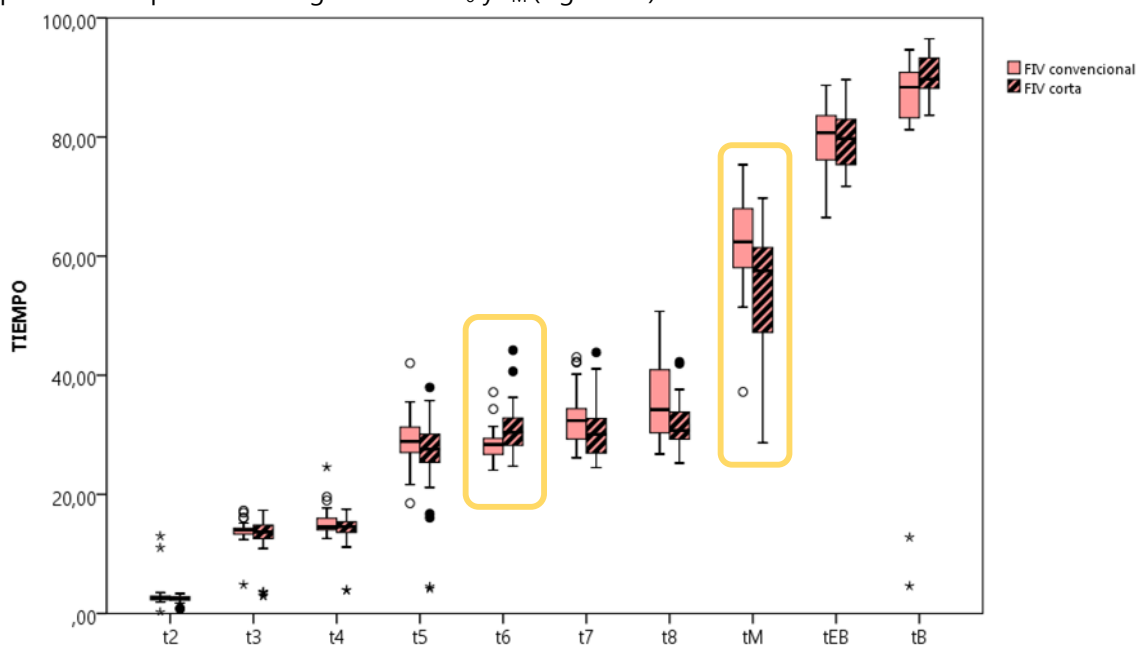


Figura 15. Diagrama de cajas representando la dispersión de los tiempos de división (en horas) de FIVc y FIV, dónde se destaca en amarillo aquellos parámetros estadísticamente significativos

Tal y como se pudo comprobar mediante el análisis estadístico, las dos variantes de la FIV presentan diferencias significativas a nivel morfocinético, concretamente en los tiempos t₆ y t_M. Con el propósito de profundizar en la interpretación de los resultados, el siguiente paso fue estudiar los marcadores morfocinéticos de FIVc frente a FIV según cuál fue el destino final del embrión. Es decir, aunque la calidad de partida era similar entre los 83 embriones, finalmente no todos se implantaron. Algunos resultaron en fallo de implantación y otros se hubieron de interpretar como posiblemente implantados. Por otro lado, hubo también casos cuya situación final está por resolver debido a que se crioconservaron y permanecen pendientes de ser transferidos. En la siguiente tabla (Tabla 14) se recoge el número de embriones ordenados según fueron fecundados por FIVc o FIV y según su destinación final.

Tabla 14. Casos de FIVc y FIV que conforman el estudio, según si corresponden al grupo de embriones implantados, no implantados, posiblemente implantados o vitrificados pendientes de transferencia

		N	TOTAL
Implantados	FIVc	0	5
	FIV	5	
No implantados	FIVc	17	33
	FIV	16	
Posiblemente implantados	FIVc	21	33
	FIV	12	
Vitrificados pendientes de transferencia	FIVc	6	12
	FIV	6	
TOTAL	FIVc	43	83
	FIV	39	

Tal y como se puede observar en la tabla 14, no se dispuso de ningún embrión fecundado por FIVc en el grupo de implantados. Esto quiere decir que se dieron estas dos situaciones:

- a. Todas las transferencias únicas de embriones de FIVc resultaron en no implantación.
- b. Aquellas transferencias dobles que dieron lugar a implantación sólo generaron un saco, asignándose así al grupo de posiblemente implantados.

Por esta razón, no se pudieron comparar los parámetros morfofocinéticos entre FIV y FIVc en el grupo de implantados y se decidió hacerlo en el caso de los no implantados, cuyo resultado está plasmado en la tabla 15 y la figura 16 (diagrama de cajas).

4.2.2.No implantados de FIVc frente a FIV

Tabla 15. P. valores resultantes de la comparación de los parámetros morfofocinéticos relativos en FIVc y FIV en el grupo de no implantados, dónde aquellos p-valores significativos ($\leq 0,05$) se destacan en amarillo: t_5

p-valor	No implantados
t_2	0,358
t_3	0,113
t_4	0,087
t_5	0,036
t_6	0,010
t_7	0,028
t_8	0,131
t_M	0,077
t_{EB}	0,245
t_B	0,520
CC_2	0,678
S_2	0,441
CC_3	0,839
S_3	0,091

*Dónde t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 y t_8 hacen referencia a los tiempos de división a dos, tres, cuatro y sucesivas blastómeras, t_M división a mórula, t_{EB} a blastocisto temprano, t_B a blastocisto, CC_2 es t_3-t_2 ; S_2 es t_4-t_3 , CC_3 es t_5-t_3 y S_3 es t_8-t_5

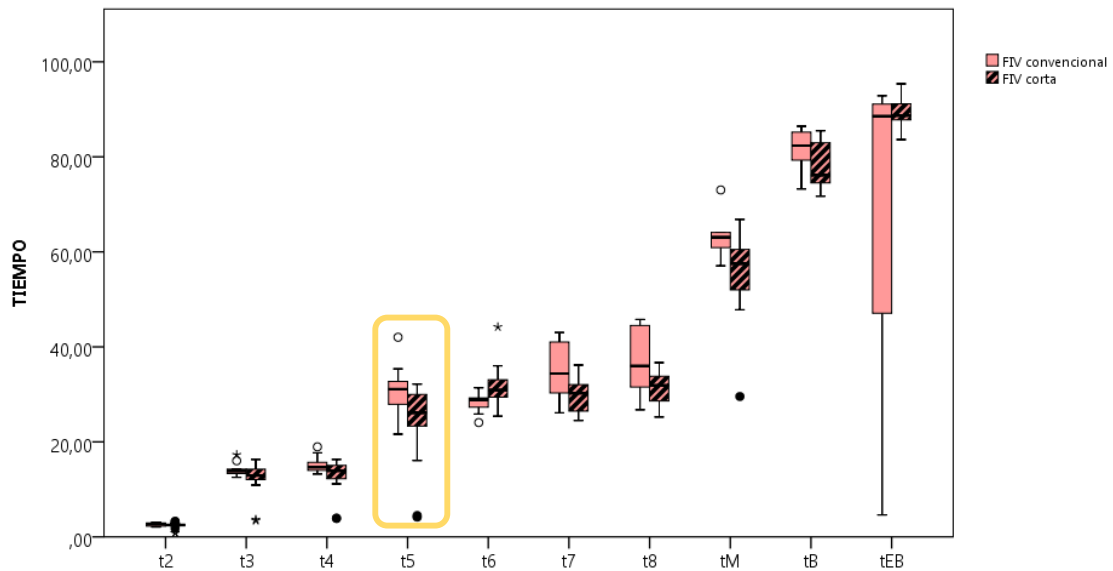


Figura 16. Diagrama de cajas representando la dispersión de los tiempos (en horas) de los embriones no implantados según procedieran de FIVc o FIV, dónde se destaca en amarillo aquellos parámetros estadísticamente significativos

4.2.3. Implantados frente a no implantados en FIV

Dado que en este estudio no se disponía de embriones concebidos por FIVc contabilizados como implantados, se propuso el análisis de los parámetros morfocinéticos entre embriones implantados y no implantados dentro del propio grupo de FIV convencional. Con dicha comparación se pretendía suplir la falta de datos y, además, comprobar la significancia estadística de los parámetros morfocinéticos encontrados en bibliografía. Para ello, se compararon las medias y se construyó un diagrama de cajas.

Tabla 16. Valores resultantes de la comparación de los parámetros morfocinéticos de embriones implantados y no implantados procedentes de FIV, dónde aquellos p-valores significativos ($\geq 0,05$) se destacan en amarillo: t_5

	p-valor
t_2	0,535
t_3	0,385
t_4	0,363
t_5	0,051
t_6	0,243
t_7	0,083
t_8	0,735
t_M	0,197
t_{EB}	0,071
t_B	0,569
CC_2	0,631
S_2	0,238
CC_3	0,610
S_3	0,076

*Dónde t_2 , t_3 , t_4 , t_5 , t_6 , t_7 y t_8 hacen referencia a los tiempos de división a dos, tres, cuatro y sucesivas blastómeras, t_M división a mórula, t_{EB} a blastocisto temprano, t_B a blastocisto, CC_2 es t_3-t_2 ; S_2 es t_4-t_3 , CC_3 es t_5-t_3 y S_3 es t_8-t_5

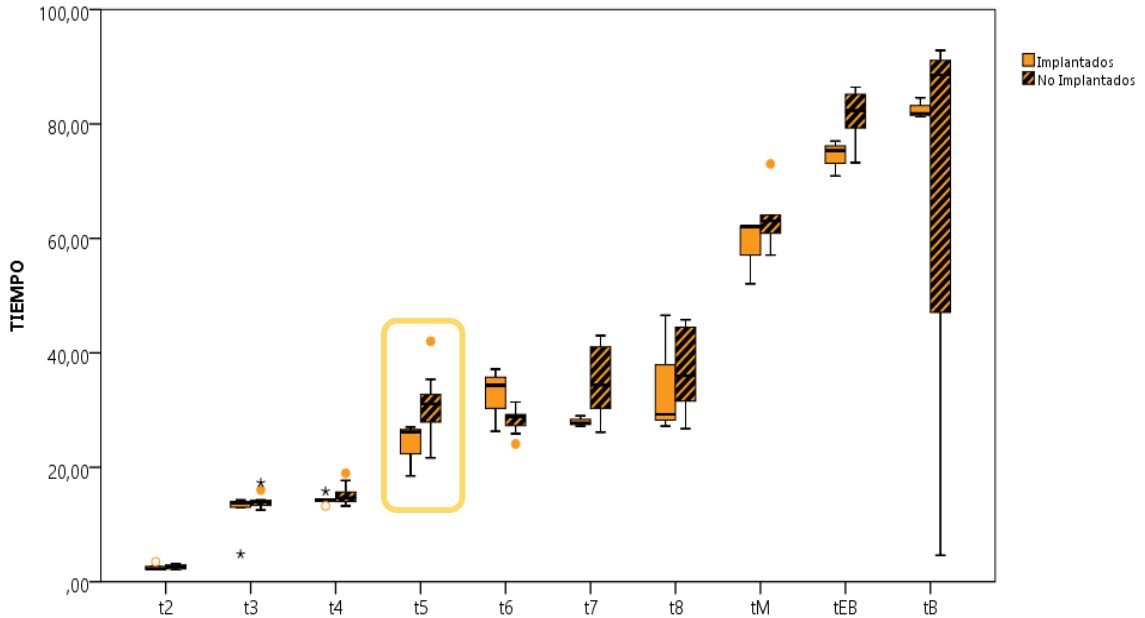


Figura 17. Diagrama de cajas representando la dispersión de los tiempos (en horas) entre implantados y no implantados de FIV, dónde se destaca en amarillo aquellos parámetros estadísticamente significativos

4.3. Cuantificación relativa de ROS en los medios de fecundación

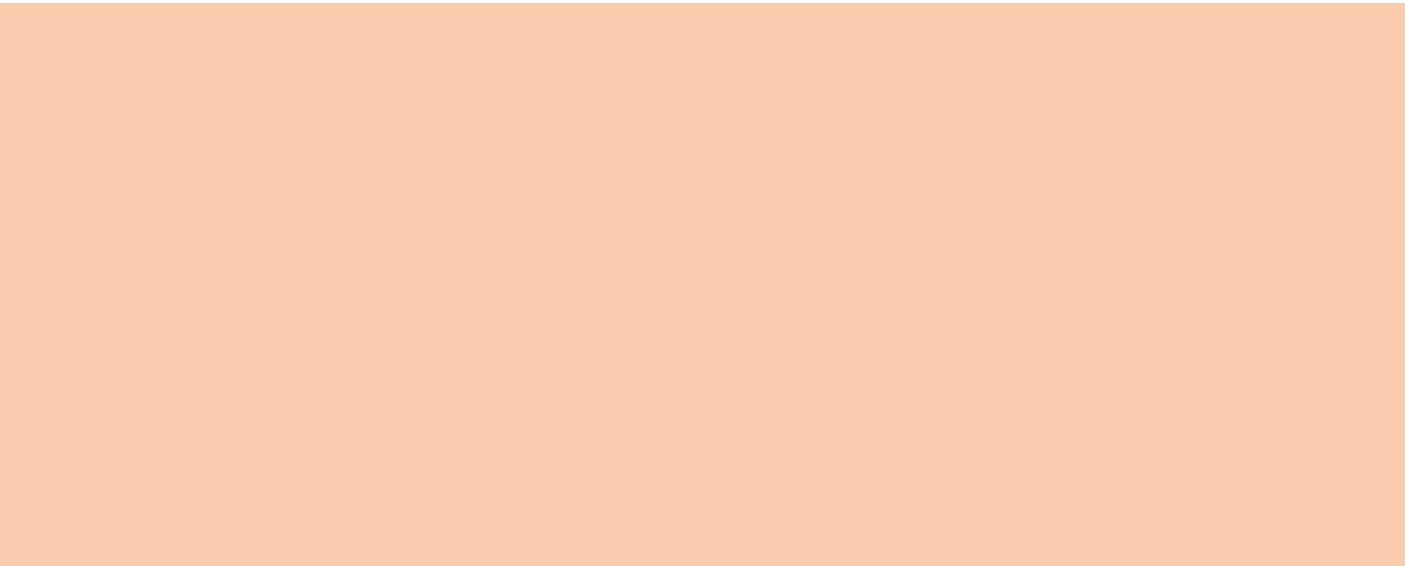
Dado que sólo se hicieron 9 mediciones, no se pudieron comparar las medias de cada grupo. Sin embargo, como se puede apreciar en la tabla 17, los valores de sORP en la primera muestra difieren de los obtenidos en la muestra 2 y 3. Dichos valores siguen la tendencia esperada: a medida que aumentaba el tiempo de co-incubación, aumentaba también el potencial sORP, supuestamente debido a la presencia de radicales libres en el medio, excretados por los espermatozoides.

Tabla 17. Distintas medidas tomadas en los medios de cultivo de fecundación, su media y su desviación estándar expresadas en sORP (milivoltios)

Muestra	co incubado 2 h	co incubado 19 h	medio blanco 2 h	medio blanco 19 h
1	226,8	212,9	252	253,7
2	243,7	245,2	252	253,7
3	232	237,8	252	253,7
Media	234,17 ± 8,65	231,97 ± 16,92	252	237,7



5. DISCUSIÓN



4. DISCUSIÓN

5.1. ¿Puede la FIV de co-incubación corta reemplazar la FIV convencional?

El análisis de los distintos parámetros morfocinéticos procedentes de embriones fecundados por FIV o FIVc muestra diferencias significativas en el tiempo de división a 6 células (t_6) y a mórula células (t_M). (Tabla 12). Esto apunta a que, aunque los porcentajes de fecundación son similares (Tabla 11), el desarrollo de los embriones sí se ve afectado por la variación en el tiempo de co-incubación y queda patente en su morfocinética. Los resultados obtenidos no son lo suficientemente concluyentes como para generar evidencias a favor o en contra del uso de la FIVc en la clínica. Es necesario partir de un tamaño poblacional más grande y disponer de datos morfocinéticos derivados de embriones de FIVc que finalmente se implantaron. Para ello, la tendencia en la práctica clínica debería de inclinarse hacia la transferencia de un único embrión. De este modo, se evitarían las gestaciones múltiples y las complicaciones tanto para la madre como para interpretar resultados que conllevan.

Sin embargo, a pesar de la falta de datos en el grupo de implantados, se amplió el análisis haciendo dos comparativas más: los parámetros morfocinéticos de los embriones no implantados obtenidos por FIVc y FIV, y los parámetros de implantados y no implantados en FIV. De ambos resultó el t_5 el único significativo. Esto significaría que, tal y como ya se había expuesto anteriormente en base a bibliografía, t_5 parece ser un marcador del futuro potencial implantatorio del embrión (Basile *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2012; Meseguer *et al.*, 2011). Los valores óptimos de t_5 asociados con un mayor potencial de implantación reportados por Basile, Cruz y Meseguer fueron 48,8-56,6 horas, 48,8-56,6 horas y 47,2-58,2 h respectivamente –valores no normalizados. Sería posible, mediante la comparación de estos valores de referencia con los valores obtenidos por FIV y FIVc en este estudio, aproximar cuál es el potencial implantatorio medio resultante de las diferentes técnicas.

Los argumentos en contra de la FIVc hacen referencia al efecto negativo tanto de la temprana decumulación del oocito (Huang *et al.*, 2013) como a la insuficiencia del tiempo de co-incubación para permitir la fecundación (Barraud-Lange *et al.*, 2008). Por ello, a la hora de valorar el uso de la FIVc habrá que tener en cuenta; no sólo si el tiempo es suficiente para la fecundación, sino también la madurez inicial del oocito –ya que al dar por terminada la FIVc en 2 horas, el gameto se decumula para valorar la fecundación y con ello, se detiene su maduración. Esta es una particularidad del protocolo seguido en este trabajo que difiere en los artículos revisados (Gianaroli *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2015), dónde en la FIVc se pasaba el oocito a un medio de cultivo fresco para aislarlo de los espermatozoides a las 2 horas, pero no se denunciaba hasta 17 horas después (al mismo tiempo que se decumulan los oocitos de FIV convencional). De este modo, se aseguraban tanto evitar el posible efecto de las ROS producidas por el exceso de espermatozoides como permitir que los oocitos inmaduros acabaran de completar su desarrollo. Además, dado que los espermatozoides que logran alcanzar el oocito se quedan pegados al complejo cúmulo-oocito-corona, también se daría tiempo suficiente a la fecundación si no hubiera podido darse en las 2 horas de co-incubación corta.

Además, a la hora de interpretar resultados en este tipo de estudios habría que tener en cuenta los diversos factores que afectan la tasa de implantación en FIV. Uno de ellos es la edad de los oocitos; aquellos con más de 35 años han demostrado ser más sensibles a las especies ROS

durante la inseminación (Thouas *et al.*, 2005). Otro factor que influye en el daño al oocito es la calidad de los espermatozoides; de manera que el espermatozoides patológico es propenso a generar más ROS que aquel clasificado como normozoospermico (Huang *et al.*, 2013).

5.2. ROS en el medio de fecundación

Durante el periodo de co-incubación, algunos metabolitos como las ROS, E₂ y P₄ son producidos por los espermatozoides y las células del cúmulo (Li *et al.*, 2016). El estrés oxidativo se asocia a la peroxidación de macromoléculas como lípidos y proteínas de membrana, así como daño en el DNA. De este modo, la fluidez de la membrana celular se vería afectada y la rigidez de la membrana plasmática del oocito podría prevenir la división celular (Gianaroli *et al.*, 1996). La incidencia de estas alteraciones, aumentada en la FIV por el largo periodo de incubación, desembocaría en altos porcentajes de fragmentación y bloqueo en los embriones (Shih *et al.*, 2014) y afectaría a su viabilidad, e incluso potencialmente la epigenética de los futuros niños (Menezo & Barak, 2000).

Con la medida del estrés oxidativo fue posible establecer el desequilibrio entre la manifestación sistémica de ROS y otros oxidantes, y la habilidad del sistema biológico en cuestión para detoxificar dichos oxidantes o reparar el daño que puedan causar. Variaciones en el potencial redox normal en las células puede causar efectos tóxicos, incluyendo la oxidación de proteínas, peroxidación de lípidos o fragmentación del DNA (MiOXSYS©, 2016). Los resultados de las tres repeticiones de las medidas (en diferentes pacientes) parecen a primera vista ambiguos. Tal y como está recogido en la tabla 17, en dos de las medidas el balance redox aumenta al aumentar el tiempo de co-incubación de los gametos. Sin embargo, en la primera medida que se hizo la relación es inversa: al aumentar el periodo de co-incubación, disminuyó el potencial redox. Estas variaciones pueden estar debidas al estado de los gametos en los diferentes tiempos y las diferentes muestras. Es decir, dado que el sORP refleja el ratio entre las especies oxidantes y reductoras, hay que tener en cuenta al interpretar los datos si las células en ese momento presentes en el medio fueron capaces o no de hacer frente a la oxidación secretando especies reductoras.

5.3. Limitaciones del estudio

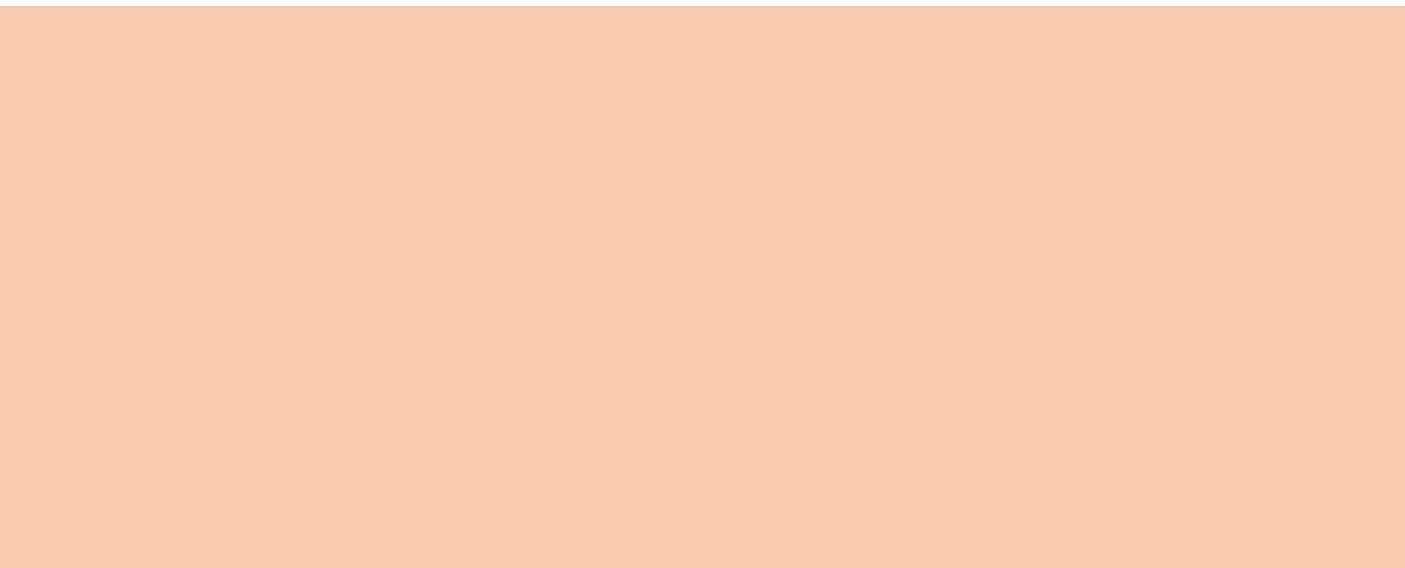
Dada la naturaleza de este tipo de estudios, de cara a nuevas investigaciones hay que tener en cuenta ciertas limitaciones para subsanar la supuesta falta de credibilidad y reproducibilidad de los trabajos anteriores.

Por un lado, es conocida la tendencia a transferir dos blastocistos en las clínicas de reproducción asistida. Esto dificulta el cálculo de la tasa de implantación y reduce el tamaño muestral a aquellos casos en que el nº de embriones transferidos coincida con el número de sacos gestacionales (Meseguer *et al.*, 2012). En definitiva, es necesaria una población inicial de pacientes y ovocitos muy grande.

Por otro lado, el éxito de la implantación y la gestación es un evento multifactorial. Es decir, no sólo depende del factor calidad embrionaria sino del factor endometrio. De este modo, muchos de los fallos de implantación o gestación son interpretados como responsabilidad del embrión, mientras puede que haya sido el endometrio el factor determinante (Weissman *et al.*, 1999).



6. CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

Aunque los porcentajes de fecundación permanecen similares ante la variación en el tiempo de co-incubación de FIV, la morfocinética de los embriones resulta significativamente diferente. Esto significa que, mientras los mecanismos de fecundación parecen no verse afectados, el posterior desarrollo embrionario sí lo está. En base a lo anterior y dados los porcentajes de implantación, en su forma actual, la FIVc no parece mejorar los resultados, si bien nuevos ensayos con otros tiempos serían necesarios.

En cuanto al ensayo de cuantificación redox, es posible concluir que el estado redox del medio de cultivo pre-equilibrado usado para la fecundación se mantiene estable tras 17 horas. Además, el balance redox del medio de cultivo donde los espermatozoides han fecundado los oocitos tras 19 horas de co-incubación es ligeramente superior respecto al estado redox a las 2 horas al comparar 2 de las 3 muestras. Sin embargo, quedaría pendiente su correlación con el estado de los gametos en el momento de la fecundación y el desarrollo embrionario posterior.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J., & CLARKSON, J. S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81(2), 459-469.
- APARICIO, B., CRUZ, M., & MESEGUER, M. (2013). Is morphokinetic analysis the answer?. *Reproductive biomedicine online*, 27(6), 654-663.
- ARAV, A., AROYO, A., YAVIN, S., & ROTH, Z. (2008). Prediction of embryonic developmental competence by time-lapse observation and 'shortest-half' analysis. *Reproductive biomedicine online*, 17(5), 669-675.
- ARTHUR, G. H. N., PEARSON, D. E., ARTHUR, H. G. H., NOAKES, D. E., & PEARSON, H. (1991). *Reproducción y obstetricia en veterinaria: teriogenología*.
- BARRAUD-LANGE, V., SIFER, C., POCATE, K., ZIYYAT, A., MARTIN-PONT, B., PORCHER, R., ... & WOLF, J. P. (2008). Short gamete co-incubation during in vitro fertilization decreases the fertilization rate and does not improve embryo quality: a prospective auto controlled study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 25(7), 305-310.
- BASILE, N., CAIAZZO, M., & MESEGUER, M. (2015). What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 27(3), 193-200.
- BASILE, N., DEL CARMEN NOGALES, M., 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.
- BERGH, C., WALDENSTROM, U., & HAMBERGER, L. (1996). Reducing the time of spermatozoa-oocyte interaction in human IVF improves the implantation rate. *Human reproduction*, 11(8), 1809.
- BOIVIN, J., BUNTING, L., COLLINS, J. A., & NYGREN, K. G. (2007). International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction*, 22(6), 1506-1512.
- BREZINA, P. R., & ZHAO, Y. (2012). The ethical, legal, and social issues impacted by modern assisted reproductive technologies. *Obstetrics and gynecology international*
- CALLESEN, H., & HOLM, P. (2016). Developmental characteristics of later-stage porcine embryos produced in vivo or in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 158-159.
- CATALÁN, B., COLLADO RAMOS, O., PRADOS MONDEJAR, F., & PÉREZ-BERMEJO, G. (2007) El estudio básico de esterilidad desde el punto de vista de la medicina basada en evidencia. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*
- CHAMAYOU S & GUGLIELMINO A (2015). The power and the limits of morphokinetic parameters in selecting embryos with full capacity to implant. *CCE Current Trends in Clinical Embriology CIC Edizioni Internazionali*, 47-55

- CHANG, M., C. (1959). Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 466-467
- CHAWLA, M., FAKIH, 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.
- 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), 371-381.
- CUEVAS, I (2016). "Contribution of time-lapse technology to improve IVF results". New Technologies within the IVF sector Sharm El Sheikh International Congress Center, Egypt
- DE LOS SANTOS, M. J., GÁMIZ, P., DE LOS SANTOS, J. M., ROMERO, J. L., PRADOS, N., ALONSO, C., & DOMINGUEZ, F. (2015). The Metabolomic Profile of Spent Culture Media from Day-3 Human Embryos Cultured under Low Oxygen Tension. *PLoS one*, 10(11), e0142724.
- 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. *Reprod Biol Endocrinol*, 12(1), 54.
- DÍAZ N, CUEVAS I, OLMEDO C & GARCÍA A. ¿Podemos reducir el tiempo de co-incubación de oocitos y espermatozoides en FIV convencional? 8º Congreso ASEBIR; 2015 Noviembre 15-16; San Sebastián, España
- EDWARDS, R. G., BARRY D. B. & PATRICK C. STEPTOE. (1969) Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro *Nature*, 221: 632-35.
- ELDER K & DALE B. *In-vitro fertilization* (2011). Cambridge University Press.
- EUROSTAT (2009). Europe In Figures. *Eurostat Yearbook*. p155
- FANG, Y., SHANG, W., WEI, D. L., & ZENG, S. M. (2016). Cited2 protein level in cumulus cells is a biomarker for human embryo quality and pregnancy outcome in one in vitro fertilization cycle. *Fertility and Sterility*.
- GARCÍA-RUIZ, Y., & GUERRA-DÍAZ, D. (2012). Gamete and embryo donation: a legal view from Spain. *Reproductive Donation: Practice, Policy and Bioethics*, 112-29.
- GIANAROLI, L., MAGLI, M. C., FERRARETTI, A. P., FIORENTINO, A., TOSTI, E., PANZELLA, S., & DALE, B. (1996). Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in-vitro fertilization improves the implantation rate. *Human Reproduction*, 11(1), 166-171.
- GRABOWSKI, C. T., & SCHROEDER, R. E. (1968). A time-lapse photographic study of chick embryos exposed to teratogenic doses of hypoxia. *Development*, 19(3), 347-362.
- GUSTAFSON, T., & WOLPERT, L. (1999). Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo: directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae. *Experimental cell research*, 253(2), 288-295.

HARDARSON, T., BUNGUM, M., CONAGHAN, J., MEINTJES, M., CHANTILIS, S. J., MOLNAR, L., ... & WIKLAND, M. (2015). Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertility and sterility*, 104(6), 1452-1459.

HARPER, J., WELLS, D., & SIMPSON, J. L. (2016). Current Controversies in Prenatal Diagnosis 4: preimplantation genetic screening should be routinely offered to all preimplantation genetic diagnosis cases. *Prenatal diagnosis*, 36(1), 25-28.

HERRERO, J., & MESEGUER, M. (2013). Selection of high potential embryos using time-lapse imaging: the era of morphokinetics. *Fertility and sterility*, 99(4), 1030-1034.

HJOLLUND, N. H. I., JENSEN, T. K., BONDE, J. P. E., HENRIKSEN, T. B., ANDERSSON, A. M., KOLSTAD, H. A., & OLSEN, J. (2000). Spontaneous abortion and physical strain around implantation: a follow-up study of first-pregnancy planners. *Epidemiology*, 11(1), 18-23.

HUANG, Z., LI, J., WANG, L., YAN, J., SHI, Y., & LI, S. (2013). Brief co-incubation of sperm and oocytes for in vitro fertilization (IVF) techniques. *Health*.

INSTITUTO BERNABEU, 2014. *Diferencias entre esterilidad e infertilidad (primarias y secundarias)*. Visto el 10 de mayo de 2016. <https://www.institutobernabeu.com/es/faq/diferencias-entre-esterilidad-e-infertilidad-primarias-y-secundarias/>

INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA (INE) (2010). Movimiento natural de la población 2008. Madrid.

JONES H.W. (1996), Moments in the life of Patrick Steptoe," *Fertility and Sterility*, 66: 15–16.

JONES, H. W., COOKE, I., KEMPERS, R., BRINSDEN, P., & SAUNDERS, D. (2011). International federation of fertility societies surveillance 2010. *Fertil Steril*, 95(2), 491.

KIRKEGAARD, K., AHLSTRÖM, A., INGERSLEV, H. J., & HARDARSON, T. (2015). Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertility and sterility*, 103(2), 323-332.

KNOX, R. V. (2016). Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology*, 85(1), 83-93.

KOVACS, PETER (2014). "Embryo selection: the role of time-lapse monitoring." *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12: 124.

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), 1231-1242.

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), 385-391.

LEY 14/2006, de 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Asistida. BOE núm. 126, de 27 de mayo de 2006; 19947-19956

- LI, R. Q., OUYANG, N. Y., OU, S. B., NI, R. M., MAI, M. Q., ZHANG, Q. X., & WANG, W. J. (2015). Does reducing gamete co-incubation time improve clinical outcomes: a retrospective study. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(1), 33-38.
- LUNDQVIST, M., JOHANSSON, U., MILTON, K., WESTIN, C., & SIMBERG, N. (2001). Reducing the time of co-incubation of gametes in human in-vitro fertilization has no beneficial effects. *Reproductive biomedicine online*, 3(1), 21-24.
- MASCARENHAS, M. N., FLAXMAN, S. R., BOERMA, T., VANDERPOEL, S., & STEVENS, G. A. (2012). National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*, 9(12), e1001356.
- MÉNÉZO, Y., & BARAK, Y. (2000). Comparison between day-2 embryos obtained either from ICSI or resulting from short insemination IVF: influence of maternal age. *Human Reproduction*, 15(8), 1776-1780.
- 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*, 26(10), 2658-2671.
- 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), 1481-1489.
- 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), 571-579.
- MYOXYS ANALYZER (2016). User Manual.
- OGINO, M., TSUBAMOTO, H., SAKATA, K., OOHAMA, N., HAYAKAWA, H., KOJIMA, T., ... & SHIBAHARA, H. (2016). Mitochondrial DNA copy number in cumulus cells is a strong predictor of obtaining good-quality embryos after IVF. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 1-5.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS), 2016 *Sexual and reproductive health*. Visto el 8 de mayo de 2016. <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/burden/en/>
- 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*, 12(3), 532-541.
- QUINN, P., LYDIC, M. L., HO, M., BASTUBA, M., HENDEE, F., & BRODY, S. A. (1998). Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human in vitro fertilization. *Fertility and sterility*, 69(3), 399-402.
- SHER, G., DAVIS, V. M., & STOESS, J. (2005). *In vitro fertilization: the ART of making babies*. Infobase Publishing.

SHIH, Y. F., LEE, T. H., LIU, C. H., TSAO, H. M., HUANG, C. C., & LEE, M. S. (2014). Effects of reactive oxygen species levels in prepared culture media on embryo development: a comparison of two media. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 53(4), 504-508.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE LA FERILIDAD (SEF) (2011). Libro Blanco Sociosanitario: "La Infertilidad en España: Situación Actual y Perspectivas"

STURNEY RG, BRISON DR, & LEESE HJ (2008). Symposium: Innovative techniques in human embryo viability assessment. Assessing embryo viability by measurement of amino acid turnover. *Reproductive BioMedicine Online*;17;4;486-496

TEJERA, A., CASTELLÓ, D., DE LOS SANTOS, J. M., PELLICER, A., REMOHÍ, J., & MESEGUER, M. (2016). Combination of metabolism measurement and a time-lapse system provides an embryo selection method based on oxygen uptake and chronology of cytokinesis timing. *Fertility and Sterility*.

THOMPSON, J. G., BROWN, H. M., & SUTTON-MCDOWALL, M. L. (2016). Measuring embryo metabolism to predict embryo quality. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(2), 41-50.

THOUAS, G. A., TROUNSON, A. O., & JONES, G. M. (2005). Effect of female age on mouse oocyte developmental competence following mitochondrial injury. *Biology of reproduction*, 73(2), 366-373.

TROUNSON, A. O. (1994). The choice of the most appropriate microfertilization technique for human male factor infertility. *Reproduction, fertility and development*, 6(1), 37-43.

WALTERS D. (1996). Reducing the time of spermatozoa-oocyte interaction in human IVF improves the implantation rate. *Human Reproduction*, 11(8):1810-1811.

WEISSMAN A., GOTLIEB L., & CASPER R.F (1999). The detrimental effect of increased endometrial thickness on implantation and pregnancy rates and outcome in an in vitro fertilization program. *Fertility and sterility*, 71.1: 147-149.

WHITTEN, WESLEY K. & JOHN D. BIGGERS (1968). Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *Journal of reproduction and fertility* 17.2, 399-401.

WONG, C. C., LOEWKE, K. E., BOSSERT, N. L., BEHR, B., DE JONGE, C. J., BAER, T. M., & PERA, R. A. R. (2010). Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature biotechnology*, 28(10), 1115-1121.

YANAGIMACHI, R. & CHANG M., C. (1963). Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature*, 281-282.