

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA
Y
TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN**

Efectos de la edad materna en la división temprana de los
embriones

**TRABAJO FIN DE MÁSTER REALIZADO
POR**

LORENA SOLANO ALONSO

TUTOR: M^a VICTORIA JIMÉNEZ MORENO

COTUTOR: CELESTINO GONZÁLEZ GONZÁLEZ

JUNIO 2012

Agradecimientos:

Quiero agradecer a la Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, el haberme brindado la oportunidad de conocer su mundo. En especial a las personas que mantienen las bases de datos, sin las cuales no tendría tanta información. Pero en especial a la persona que ha guiado este trabajo, la cual ha tenido paciencia de corregir los fallos y la amabilidad a la hora de hacérmelo saber. Sin la inestimable ayuda de Victoria Jiménez este trabajo no se podría haber llevado a cabo.

<i>Agradecimientos:</i>	3
<i>Introducción</i>	5
<i>Hipótesis y Objetivo</i>	11
<i>Material y Métodos</i>	11
Estimulación Ovárica	11
Procedimientos de laboratorio	12
Definición de variables:	13
Definición de los grupos de estudio:	14
Estudio 1	14
Estudio 2	15
Estudio 3	15
Estudio 4	16
Resultados	16
Estudio 1	16
Estudio 2.1	19
Estudio 2.2	21
Estudio 3.1	23
Estudio 3.2	25
Estudio 4.1	27
Estudio 4.2	29
Discusión	32
Conclusiones	35
Bibliografía	36

Introducción

Han transcurrido 34 años desde el nacimiento del primer bebe mediante la técnica de fecundación in Vitro. Ésta técnica fue desarrollada por los Dr Steptoe y Edward, y está englobada dentro de la técnicas de reproducción asistida (TRA), que consiste en poner en contacto los gametos, masculinos y femeninos, en una placa petri, de forma que pueda llevarse a cabo la fecundación y posterior transferencia de los embriones al útero materno con la finalidad de conseguir el nacimiento de un niño sano. Tal es el avance científico que realizaron, que en el año 2011 fue reconocido con la concesión del premio Nobel al Dr Edward.

Posteriormente la Microinyección intracitoplasmática (ICSI), fue desarrollada por Palermo y colaboradores en 1992, con el fin de solventar las causas de esterilidad debidas a factor masculino severo. La combinación de ambas técnicas supuso un gran avance en el campo de la reproducción, ya que en ese momento se brindó la oportunidad de tener descendencia propia a parejas que anteriormente solo tenían la opción de la adopción o una vida sin hijos.

En base a los estudios realizados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) aporta datos estadísticos en los que aproximadamente unos 80 millones de personas en todo el mundo se ven afectados por problemas de fertilidad. Y gracias a la aplicación de las TRA y los nuevos avances (criopreservación de gametos y embriones, diagnostico genético preimplantacional etc.) en este campo han permitido el nacimiento de unos 4 millones de niños y en países con tasa de crecimiento negativas como por ejemplo España contribuyen a un incremento del 2 % en la tasa de natalidad.

En la actualidad, la sociedad científica sigue enfrentándose a nuevos retos en el campo de la reproducción, uno de ellos es el incremento en la incidencia de gestaciones múltiples, pudiendo ser causada por factores tales como la edad materna (1), la paridad o la raza. El uso de técnicas de estimulación ovárica y TRA, han sido los principales causantes de este aumento, pudiendo llegar a producir una epidemia (2,3). Según los datos publicados por la European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) en el 2002, en España el porcentaje de embarazos gemelares es de un 40,3 % y los multifetales de un 11, 2% (4). Estas gestaciones son consideradas de riesgo por sus consecuencias obstétricas, neonatales y económicas (4,5). En el caso de la madre

pueden surgir complicaciones asociadas a hipertensión, toxemia, diabetes gestacional, preeclampsia (6) etc. y en el caso de los fetos estos pueden presentar bajo peso al nacimiento, prematuridad, mortalidad perinatal, síndrome de dificultad respiratoria (RDS), hemorragias y parálisis cerebrales etc (1,6).

La causa de los embarazos múltiples en TRA es debida a la necesidad de transferir más de un embrión al útero materno para obtener las máximas probabilidades de éxito (7) ya que aproximadamente un 85 % de los embriones (8) que se generan no tienen capacidad de implantar en el útero materno y carecemos de los medios adecuados para determinar que embriones tienen el mayor potencial implantatorio.

Con el paso del tiempo y gracias a los avances en la medicación, condiciones, técnicas empleadas, composiciones químicas de los medios de cultivo y sistemas físicos, se ha contribuido a mejorar el desarrollo embrionario (9,10). Por estos motivos la tendencia es a disminuir el número de embriones a transferir y en un futuro no muy lejano poder transferir un único embrión obteniendo las máximas probabilidades de embarazo. De hecho la legislación de ciertos países nórdicos solo permite la transferencia de un único embrión y organizaciones como la ESHRE lo está valorando, a su vez Canadá ha publicado una guía de buenas prácticas en la transferencia de embriones. (11)(12) En España, la ley 14/2006 permite transferir un máximo de 3 embriones en casos específicos aunque habitualmente se tiende a transferir 2 embriones, ya que no hay diferencia significativa en la tasa de embarazo y de nacimiento transfiriendo 2 o 3 embriones en mujeres menores de 35 años (13).

En base a todo lo expuesto, se puede decir que uno de los pasos claves en el éxito de las técnicas de reproducción asistida es la selección de los embriones con el mayor potencial implantatorio para ser transferidos al útero materno y de esta forma poder reducir el número de embriones a transferir sin disminuir las probabilidades de embarazo. Según T Ebner et al, una selección de múltiples parámetros en diferentes estadios de desarrollo permitirá filtrar al candidato correcto, un embrión el cual dará como resultado un recién nacido sano (14)

Y para realizar dicha selección, hay que tener presente que los sistemas de clasificación tienen que tener como premisa el no ser invasivos, por lo que no deben afectar a la capacidad de desarrollo del embrión (15), ser inocuas. Además de poder

realizarse en un periodo de tiempo corto, para que la viabilidad de los embriones no se vea afectada.

Actualmente, la practica más habitual, es seleccionar los embriones en base al ritmo de división y a la morfología del embrión el día de la transferencia (16,17) ya que los trabajos realizados por Edwards et al (18), Cummins et al (19), Hill et al (20) y Steer et al (21), revelaron que los embriones que tenían una buena morfología y un ritmo de división adecuado tienen mas posibilidades de dar lugar a un embarazo. La morfología de los embriones viene determinada por el número, tamaño, y forma de las blastómeras, porcentaje de fragmentación y presencia de blastómeras múltinucleadas (16), otros parámetros según la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), serían la presencia de vacuolas, grosor de la Zona Pelúcida (ZP), grado de compactación (22)

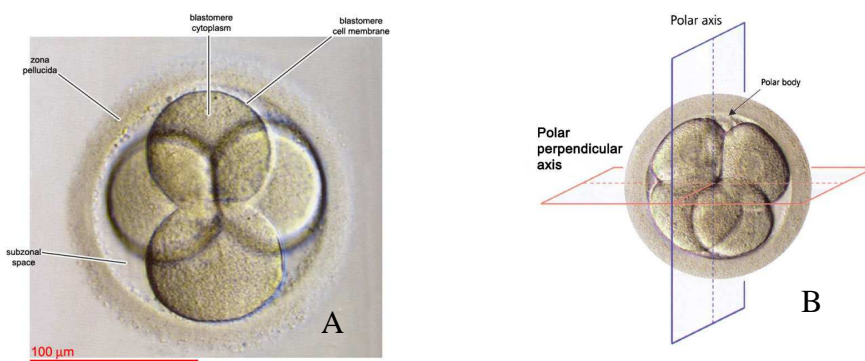


Figura 1A. Muestra un embrión de 4 células, 1B. Los planos de división de un embrión de 4 células. Imágenes obtenidas de www.ehd.org

En los últimos tiempos, para mejorar los sistemas de clasificación se han ido añadiendo nuevos parámetros como por ejemplo la morfología y localización de los pronúcleos (23), posición y número de nucleolos y apariencia del citoplasma, presencia o no del halo citoplasmático (24-25)

Otro de los parámetros que está adquiriendo importancia es la observación de la primera división mitótica del embrión, producida entre las 25 y 27 horas post fecundación, esta valoración no es invasiva para el embrión y su uso es accesible para cualquier laboratorio. Se denominan embriones de división temprana a aquellos divididos en este periodo de tiempo. Esta división nos permite valorar los embriones el

día de la transferencia no solo por el número de células y su morfología si no también por su variabilidad en el tiempo de división (26-27).

Existen diferentes trabajos que demuestran que la presencia de embriones en 2 células a las 25-27 horas postfecundación esta relacionado con la presencia de embriones de mejor calidad (28), con mayor potencial de implantación (29) y mayores tasas de desarrollo al estadio de blastocisto, comparado con los embriones no divididos a las 25 –27 h (30,31).

Trounson et al (32), y Capmany et al (33) describieron que la división temprana tenia lugar entre las 25 y 27 horas postfecundación y aunque el mecanismo es desconocido (34), se sabe que el tiempo que se requiere para avanzar del estadio de 2PN a la primera división mitótica varia entre los embriones de división temprana y los de división lenta (34) y que además esta relacionado con la formación de embriones de buena calidad (35,36)

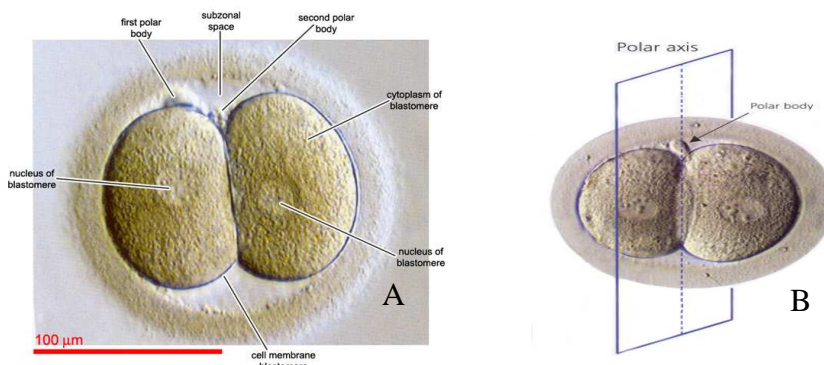


Figura 2A y 2B . Muestran un embrión.de división temprana

Imágenes obtenidas en www.ehd.org

El tiempo de duración del primer ciclo celular podría estar influenciado por la calidad o estatus del cigoto, ya que ha sido descrito la presencia de ciertos genes denominados “minor embryonic transcription” en embriones de mamífero cuya expresión tiene lugar durante el primer ciclo celular y esta regulada por la estructura de la cromatina, la accesibilidad al DNA y sistemas de feedback. Alteraciones en la funcionalidad de estos genes podrían retrasar la primera división celular (37).

Por otro lado, es conocido que la calidad de los gametos va a determinar en gran medida el potencial y viabilidad de un cigoto y por lo tanto en la capacidad que tiene este para llevar a cabo la primera división celular

En el caso de los espermatozoides, es importante tener en cuenta dos factores por un lado son los responsables de aportar los centriolos que dirigirán la primera división celular (38) y por otro, el status del DNA espermático, puesto que la integridad del genoma paterno es de vital importancia en el inicio y mantenimiento de un embarazo a termino, tanto in vivo como in vitro (26)

Los ovocitos, por un lado son los portadores de genes y proteínas que van a regular las primeras divisiones mitóticas. Por otro lado la maduración del citoplasma y sus organelas, también podría estar relacionada, ya que se conoce que por ejemplo alteraciones en las mitocondrias y concentraciones bajas de adenosina trifosfato afectan al desarrollo embrionario (39). Así como niveles bajos de ATP y de los niveles de mRNA materno. Así mismo, se ha demostrado en ganado vacuno, que los embriones de división temprana con bajo desarrollo embrionario tienen alterados los patrones de poliadenilación (40) de genes que intervienen en procesos fisiológicos implicados en la división temprana, metabolismo, estrés, etc.

La edad de la mujer es uno de los factores que afecta a la calidad ovocitaria, está demostrado que a partir de los 35 años existe un declive de la fertilidad, asociado a una disminución en la cantidad y calidad de los ovocitos (41-43). La mujer nace con una cantidad determinada de folículos primordiales, en éstos se encuentran los ovocitos. A partir del nacimiento comienza un declive ovocitario. Cuando se llega a la adolescencia y aparece la primera menstruación, el número de folículos habrá mermando a 30000-450000 y a partir de este momento el descenso es cada vez mayor, ya que en cada ciclo menstrual se reclutarán un determinado número de folículos. Según el estudio de Hamish y col en 2004, hasta la edad de los 35 años existe una óptima fertilidad, de los 35 años hasta mediados los 40, existe una fase de declive ovocitario y a partir de esta edad cesa la fertilidad.

Está bien establecido que la calidad del ovocito determina el patrón de desarrollo embrionario y la fertilización (44). Esta calidad es un proceso dependiente del tiempo y el deterioro de la misma se llama “envejecimiento ovocitario” y este proceso se produce

en los ovarios femeninos, los cuales muestran un declive progresivo de la fecundidad a medida que avanza su edad reproductiva, una transición que está asociada a un pobre desarrollo ovocitario. (45)

Los ovocitos envejecidos, presentan numerosas alteraciones celulares y morfológicas, incluidos cambios en la membrana plasmática (MP), zona pelúcida (ZP), citoesqueleto, mitocondria, desplazamiento del huso y mal alineamiento de los cromosomas, dispersión del material cromosómico, desplazamiento del cropúsculo polar (CP) y gránulos citoplásmicos (GC), como también la excitosis prematura de estos (45).

Battaglia et al determinaron que los ovocitos de mujeres de edad avanzada mostraban un huso meiotico anormal, los microtúbulos se distribuían de manera desordenada y a su vez el alineamiento de los cromosomas estaba alterado (46), proceso que también tiene lugar en diferentes especies, y ha sido verificado en especies bovinas (47) y murinas (48). Ya que en el huso meiótico se disponen los cromosomas y por lo tanto la información genética ovocitaria, el hecho de que el huso se encuentre intacto, es crítico para una precisa distribución de los cromosomas en la división de las blastómeras, lo cual asegura un preciso desarrollo embrionario (49).

Cambios anormales en los patrones epigenéticos están relacionados con el proceso de envejecimiento de los oocitos, la configuración epigenética es parte del proceso de maduración de los gametos, y es esencial para un correcto desarrollo postfertilización (50) y por lo tanto podría afectar la división a las 25-27h, la división temprana del embrión.

Actualmente la calidad ovocitaria como parámetro de selección embrionaria, no solo se refiere al ovocito ya desnudo, sino también a las células del cúmulo. Según Aafke et al hay diferencias en la expresión génica en las células del cúmulo en embriones con división temprana y tardía (51). Esto puede relacionarse con la calidad embrionaria, ya que las células del cumulus dan soporte y aportan factores de crecimiento y maduración al ovocito durante el desarrollo folicular (52), el modelo murino sugiere que la fragmentación del DNA ovocitario es una razón por la que oocitos envejecidos tienen una peor calidad, esta fragmentación está relacionada con el potencial apoptótico de las células de cumulus (53), en este mismo modelo, Quiao et

cols muestran que estas células secretan factores solubles que aceleran el envejecimiento del oocito (54).

Por todos estas razones, la calidad ovocitaria y por lo tanto lo edad materna podría estar influenciando la división.

Hipótesis y Objetivo

La hipótesis de partida, demostrar si el hecho observar a las 25h es un parámetro no invasivo y una vez realizado comprobar si esta relacionado con la edad de la mujer e influye de algún modo en el éxito de las TRA.

La finalidad del estudio es analizar los datos obtenidos y verificar o descartar la hipótesis de partida, para ello se debe demostrar que la división temprana del embrión cumple el criterio de no ser invasivo y nos servirá como parámetro de ayuda al seleccionar los embriones que se transferirán.

Material y Métodos

Se incluyeron en este estudio 6575 embriones procedentes de 1347 punciones, estos ciclos fueron realizados a 806 parejas en el periodo de tiempo que comprende entre Agosto de 2003 y Diciembre de 2010. Los embriones se obtuvieron del Programa de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Las parejas incluidas en este estudio fueron sometidas a Fecundación in Vitro convencional (FIV) o microinyección citoplasmática (ICSI) y se les transfirieron entre 1 y 3 embriones en día D+2 (n= 1078) y D+3(n=186)

La inclusión de pacientes a las que se las realizó la observación a las 25h, fue totalmente aleatoria, ya que el único criterio era el del personal que en ese momento estaba en el laboratorio.

Estimulación Ovárica

El primer paso de estas TRA comienza con la Estimulación Ovárica:

El protocolo utilizado ya ha sido descrito (55), para realizar la estimulación ovárica mediante el tratamiento de agonistas, se utilizó acetato de leuprolide (Procrin, laboratorios Abott®) en dosis de 0,2mg/día. Una vez que se produce la inhibición de la

secreción hipofisaria y se comprueba, se procede a la administración de FSH recombinante (Puregon® Lab.MSD; Gonal-F® Lab. Merk-Serono) una dosis adecuada a cada paciente durante un periodo de 5 días, que posteriormente será ajustado a las necesidades individuales de la paciente. Mientras que el tratamiento con antagonistas, comienza con la administración de FSH recombinante en el día dos del ciclo (Puregon® Lab.MSD; Gonal-F® Lab. Merk-Serono) las dosis se ajustan a cada paciente, posteriormente se observó la respuesta de la paciente hasta el sexto día y se personalizó la dosis ajustándola a sus necesidades.

Cuando se detecta mediante ecografía un folículo de 12mm o superior, se procede a la administración del antagonista (Orgalutran ® Lab. Organon), con una dosis de 0,25mg/día, hasta que el tratamiento llega a su fin.

Como control del desarrollo folicular se realizaron determinaciones de estradiol sérico y ecografía transvaginal. Cuando se cumplieron los criterios de madurez folicular (al menos 4 de los folículos de 16mm y niveles de estradiol adecuados a este estadio) se administró 10.000 UI de hCG (Ovitrelle® Merck-Serono) y 35h después, se procedió a la punción folicular, ecoguiada.

Procedimientos de laboratorio

Los ovocitos se obtuvieron del líquido folicular extraído mediante la punción de los folículos e incubados 3 horas en medio de cultivo (IVF medium®Medicult) 37°C 6%CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación en los casos que se realizó FIV, los ovocitos se inseminaron con 0,05x10⁶ espermatozoides móviles /ml por ovocito. Por el contrario, en los casos que se procedió a realizar ICSI, los ovocitos se desnudaron con hialuronidasa y los que estuvieron en Metafase II, fueron microinyectados y cultivados en ISMI (®Medicult)

Pasadas 18horas tras la inseminación o la microinyección, se comprobó que hubiera habido fecundación. Se observó y anotó la presencia de dos pronúcleos y corpúsculos polares en cada ovocito (cigoto), se hizo una valoración a las 18h post-fertilización siguiendo la clasificación de Gianaroli y col (56). Posteriormente se valoró la división a las 25h post FIV/ICSI indicando si esta había ocurrido.

Todos los cigotos fueron cultivados en ISMI (®Medicult) hasta el día+2o+3, día en el que se realizó la valoración de los embriones en función de sus características

morfológicas (% de fragmentación, blastómeras regulares y simétricas, grosor de la zona pelúcida, presencia de blastómeras multinucleadas) y nº de blastómeras, usando para ello las clasificaciones de L.Veek (57).

De toda la cohorte embrionaria se escogieron los 2 o 3 embriones de mejor calidad para ser transferidos y a igual calidad embrionaria, se eligieron aquellos embriones que se habían dividido a las 25-27h post FIV/ICSI.

La capacitación de las muestras seminales tanto para FIV como para ICSI, fue realizada mediante la técnica de Swim-up tanto directo como inverso. La concentración y la movilidad de las muestras seminales en fresco y capacitadas, fueron valoradas mediante el uso de la cámara Makler y un microscopio óptico de (20X).

El lavado durante el Swim-up directo, dependiendo de la motilidad y la concentración de las muestras se modificaron el número de tubos, tiempo de centrifugado y las revoluciones por minuto, se realizó con Flushing medium (®Medicult) por centrifugación de las muestras durante 10min a 300g. A los pellets obtenidos se les añadió entre 200 y 400µl de IVF medium (®Medicult) y se incubaron 1 hora a 37°C y 6% de CO₂.

Para la realización de la técnica de Swim up inverso, se repartió 1ml de Flushing en cada tubo, el número de tubos varió según la cantidad y la calidad de la muestra, una vez realizado se procedió a depositar la muestra seminal en el fondo del tubo, sin mezclar las dos fases, posteriormente se dejó incubando a 37°C y 6% de CO₂, pasada esta hora, se recogió el sobrenadante (SN) y se realizó la centrifugación de las muestras a 300g durante 10 min. Los pellets se recogieron en 300-400µl de IVF medium (®Medicult.Dinamarca).

Tras la capacitación, se determinó la concentración y la motilidad del capacitado.

Pasados 14 días tras la punción folicular, se valoraron los niveles de βhCG en sangre. Y el embarazo fue confirmado por ecografía a las 7 semanas tras la captación de los ovocitos.

Definición de variables:

- a- Edad de la paciente en el día de la punción
- b- Número de ovocitos: nº de ovocitos que se obtienen por punción

- c- Número de MII: nº de ovocitos maduros que se obtiene por punción.
- d- Número de embriones: nº de ovocitos fecundados, considerándose solo aquellos que tengan 2PN y 2CP
- e- Número de embriones transferidos: nº de pre-embryones por transferencia embrionaria.
- f- Porcentaje de Fecundación: $\text{n}^\circ \text{ de ovocitos con 2PN2CP} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ total de MII}$
- g- Tasa de embarazo: $\text{n}^\circ \text{ embarazos positivos} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ transferencias embrionarias}$
- h- Tasa de Implantación: $\text{n}^\circ \text{ total de sacos embrionarios con latido fetal positivo} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ total de embriones transferidos}$
- i- Porcentaje de Abortos: $\text{n}^\circ \text{ abortos} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ de embarazos}$
- j- Porcentaje de Transferencia: $\text{n}^\circ \text{ de embriones transferidos} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ de punciones}$
- k- Clasificación de los embriones transferidos:
 1. Buena calidad: en D+2 se encuentra entre 2 y 4 células de igual tamaño. Ausencia de blastómeras multinucleadas y menos de un 25% de fragmentación.
 2. Mala calidad: no cumplen ninguno de los criterios anteriores en D+2
 3. Mixta: Al menos uno de los embriones transferido es de buena calidad

La estadística se ha realizado con el programa estadístico SPSS 15.0

Definición de los grupos de estudio:

Estudio 1: En la Población general, determinar si el hecho de clasificar los embriones a las 25h tiene resultados negativos en los Tratamientos de Reproducción Asistida.

En el estudio se incluyeron 1347 punciones realizadas a 806 parejas con transferencias en día +2 (n= 1078) y en día +3 (n=186), que dieron como resultado 6575 embriones.

GRUPO A: Casos en los que se ha realizado la observación de la división a las 25-27h post fertilización. (n=806 parejas)

GRUPO B: Casos en los que no se ha realizado la observación de la división a las 25-27horas post fertilización. (n=450 parejas)

Estudio 2: Determinar si la presencia de embriones divididos a las 25h está relacionado con el éxito de las Técnicas de Reproducción Asistida.

- **Parte 1.** Para realizar el estudio se incluyeron 395 punciones, realizadas a 373 parejas. En todos los casos se realizó la observación de la división temprana.

GRUPO A. Embriones divididos a las 25h post-fecundación, (n=254).

GRUPO B. Embriones no divididos a las 25h post-fecundación. (n=141).

- **Parte 2.** Determinar si la transferencia de embriones divididos influye en las tasas de embarazo. Se incluye la población de mujeres con embriones divididos a las 25h post-fecundación, con o sin transferencia de estos embriones divididos.

GRUPO A. Mujeres que han tenido transferencia de embriones divididos a las 25-27h post-fecundación, (n=218)

GRUPO B. Mujeres que No han tenido transferencia de embriones divididos a las 25-27h post-fecundación, (n=35)

Estudio 3. Valorar si la edad de las mujeres influye en la división temprana del embrión.

- **Parte 1.** Mujeres de 35 años o menores.

Se incluye la población de pacientes menores o iguales a 35 años de edad en las que se realizó la observación de la división embrionaria a las 25-27h post-fecundación.

GRUPO A. Mujeres menores o iguales a 35 años con embriones divididos a las 25h, (n= 166)

GRUPO B. Mujeres menores o iguales a 35 años cuyos embriones no se han dividido a las 25h, (n=83)

- **Parte 2.** Mujeres mayores de 35 años.

Se incluye la población de mujeres mayores de 35 años de edad, en los que si se ha realizado la observación de la división temprana de los embriones a las 25 h.

GRUPO A. Mujeres mayores de 35 años cuyos embriones si se han dividido a las 25-27h post-fecundación, (n=88).

GRUPO B. Mujeres mayores de 35 años cuyos embriones no se han dividido a las 25-27h post-fecundación, (n=58).

Estudio 4. Analizar y valorar si en el grupo de pacientes cuyos embriones se han dividido a las 25h, los resultados de las Técnicas de Reproducción Asistida, se han visto influidos por la edad de la paciente.

- **Parte 1.** Población de mujeres con embriones divididos a las 25-27h post-fecundación.

GRUPO A. Mujeres iguales o menores a 35 años con división temprana de los embriones, (n= 166).

GRUPO B. Mujeres mayores de 35 años con división temprana de sus embriones, (n=58)

- **Parte 2.** El estudio incluye mujeres con embriones de división temprana que han tenido transferencia de los mismos pero comparando según los grupos de edad.

GRUPO A. Mujeres con transferencia de embriones divididos a las 25-27h post-fecundación, de edad igual o menor a 35 años.

GRUPO B. Mujeres con transferencia de embriones divididos a las 25-27h post-fecundación, de edad mayor a 35 años.

.Los datos se analizaron mediante el test t-Student y la prueba Chi-cuadrado.

Resultados

Estudio 1

El estudio incluye los datos de 1347 punciones realizadas a 806 parejas con transferencias en D+2 (n=1078) y D+3 (n=186). El grupo A comprende 806 casos NO

se realizó la observación a las 25h, mientras que en el grupo B se realizó la observación a las 25h y se incluyeron 450 casos. En los casos en los que se realizó la observación a las 25 horas fue al azar

No se han observado diferencias significativas en la media de edad, número de ovocitos, número de metafases II, número de embriones transferidos, número de sacos, número de nacimientos, aunque si existe una cierta tendencia a un incremento en el número de ovocitos, metafases II y 2PN, esto puede ser debido a la casuística (Tabla 1).

Respecto a la tasa de embarazo por transferencia no existen diferencias significativas, ni en los porcentajes de aborto, implantación. Pero si hay diferencias en de fecundación y transferencia, en ambas tasas la muestra es el doble en el Grupo A que en el grupo B. (Tabla 2)

Tampoco se ha observado diferencias significativas en la calidad de los embriones transferidos, aunque hay una tendencia a haber embriones de mejores calidades en el Grupo B (Si observación a las 25h). (Tabla 3)

Tabla 1*Análisis de la población general, observados a las 25h y no observados*

	GRUPO A	GRUPO B	P
Edad	34,87±3,55	34,75±3,55	NS
Nº Ovocitos	10,06±5,30	9,58±5,90	NS
Nº MII	8,14±4,76	7,66±5,09	NS
Nº 2PN	5,09±3,43	4,62±3,62	p<0,05
Nº Embriones transferidos	2,26±0,65	2,28±0,62	NS
Nº Sacos	1,30±0,52	1,34±0,54	NS
Nacimientos	1,04±0,66	1,11±0,63	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 2*Análisis de la población general, observados a las 25h y no observados*

	GRUPO A	GRUPO B	P
% Embarazo/transferencia	222 (27,4%)	135 (30,0%)	NS
% Abortos	33 (14,9%)	17 (12,6%)	NS
% Fecundación	4116(62,4%)	2480(60,3%)	p<0,05
% Transferencia	806 (99,9%)	450(83,6%)	p<0,05
% Implantación	289(15,8%)	181(17,7%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 3

Análisis de la calidad de los embriones transferidos, población general, observados y no observados a las 25 h.

	GRUPO A	GRUPO B	P
Calidad 1 (Buena)	393(48,6%)	225(50,0%)	NS
Calidad 2 (Mala)	187(23,1%)	94(20,9%)	NS
Calidad 3 (Mixta)	228(28,3%)	131(29,1%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Estudio 2.1

Parte 1: En este estudio se incluyeron 395 punciones, realizadas a 373 parejas y en todos se llevo a cabo la observación de la división temprana del embrión a las 25h.

Según los resultados obtenidos no existe diferencia en la entre la edad, número de sacos y nacimientos de los dos grupos, pero si hay diferencias significativas entre el número de ovocitos, número de metafases II, número de 2PN y número de embriones transferidos, siendo en todos los casos mayor en el Grupo A (embriones si divididos a las 25 horas), mostrados en la Tabla 4.

Analizando las tasas de embarazos, fecundación e implantación, se observan diferencias significativas, todos los porcentajes están incrementados en el Grupo A (embriones si divididos a las 25h) salvo la tasa de abortos que es no significativo. (Tabla 5)

La calidad embrionaria muestra diferencias significativas, en el grupo A existen un mayor porcentaje de embriones transferidos de mejor calidad que en el grupo B. (Tabla 6)

Tabla4*Análisis población donde se realizó la observación a las 25h*

	GRUPO A	GRUPO B	P
Edad	34,25±3,24	34,18±3,66	NS
Nº Ovocitos	11,14±5,32	8,53±5,23	NS
Nº MII	9,12±4,67	6,57±4,55	NS
Nº 2PN	5,94±3,30	4,03±3,07	p<0,05
Nº Embriones transferidos	2,39±0,58	2,21±0,69	NS
Nº Sacos	1,43±0,55	1,18±0,48	NS
Nacimientos	1,20±0,62	1,18±0,55	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 5*Análisis de los resultados en la población que si se realizó la observación a las 25h*

	GRUPO A	GRUPO B	P
% Embarazo/transferencia	84 (33,1%)	28 (19,9%)	p<0,05
% Abortos	9 (10,7%)	1 (3,6%)	NS
% Fecundación	1510(65,2%)	568(61,3%)	p<0,05
% Implantación	119(19,6%)	33(10,6%)	p<0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 6

Análisis de resultados, población que si se realizó observación de embriones a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
Calidad 1 (Buena)	137(53,9%)	57(40,4%)	p<0,05
Calidad 2 (Mala)	33(13,0%)	43(30,5%)	p<0,05
Calidad 3 (Mixta)	84(33,1%)	41(29,1%)	p<0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p>0,05$

Estudio 2.2

El estudio se divide en dos partes en las que se pretende comparar la población de mujeres con embriones divididos transferidos, respecto a mujeres a las que se les han transferido embriones no divididos y además contrastar los resultados obtenidos entre mujeres menores de 35 años con transferencia de embriones divididos y mujeres mayores de 35 años que también han tenido este tipo de transferencia.

Parte 2. Población con embriones divididos a las 25h post-fertilización, grupos de mujeres a las que se les han transferido embriones divididos y a las que no se les han transferido embriones divididos. El grupo de mujeres con transferencia de embriones divididos tiene un tamaño muestral de 218, mientras que el grupo de mujeres con transferencia de embriones no divididos el tamaño muestral es de 35.

Los resultados de esta segunda parte muestran que no existen diferencias significativas entre la edad, número de ovocitos, número de embriones transferidos, número de sacos y nacimientos. Si existen diferencias entre número de metafases II y número de 2PN (Tabla 7)

Los demás resultados de porcentajes de embarazos/transferencias, implantación, abortos, fecundación (Tabla 8) y calidad de los embriones transferidos, no muestran ninguna diferencia significativa (Tabla 9)

Tabla 7*Resultados población con embriones divididos pero con y sin transferencia de los mismos*

	GRUPO A	GRUPO B	p
Edad	334,35±3,18	33,75±3,60	NS
Nº Ovocitos	10,87±5,17	12,57±5,99	NS
Nº MII	8,83±4,52	10,66±5,11	p<0,05
Nº 2PN	5,68±3,19	7,43±3,48	p<0,05
Nº Embriones transferidos	2,39±0,591	2,37±0,49	NS
Nº Sacos	1,46±0,56	1,31±0,480	NS
Nacimientos	1,20±0,65	1,23±0,44	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 8*Resultados población con embriones divididos pero con y sin transferencia de los mismos*

	GRUPO A	GRUPO B	p
% Embarazo/transferencia	71 (32,6%)	13 (37,1%)	NS
% Abortos	9 (10,7%)	0 (0,0%)	NS
% Fecundación	(64,31%)	(63,90%)	p<0,05
% Implantación	102 (19,6%)	83 (20,5%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 9

Calidad de los embriones transferidos o no, en la población cuyos embriones se han divididos a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	p
Calidad 1 (Buena)	114 (52,3%)	22 (62,9%)	NS
Calidad 2 (Mala)	32 (14,7%)	1 (2,9%)	NS
Calidad 3 (Mixta)	72 (33,0%)	12 (34,3%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Estudio 3.1

En este estudio se pretende valorar si la edad de la mujer influye en la división temprana del embrión. Para ello se dividirá en dos partes, la primera parte se compararán mujeres de 35 años o menores en los que haya habido división a las 25 y en los que no, mientras que en la segunda parte se analizará la misma división, pero en el grupo de edad de mujeres mayores de 35 años.

Parte 1: Se va a estudiar la división temprana en mujeres menores de 35 años inclusive, en las que si se ha realizado observación de los embriones a las 25h. En el estudio se incluyen 166 mujeres con embriones divididos y 83 sin embriones divididos.

Los resultados obtenidos en la primera parte del estudio, no muestran diferencias significativas en la Edad, el número de embriones transferidos, el número de sacos y el de nacimientos, sin embargo existen estas diferencias en cuanto al número de ovocitos, número de metafases II y número de 2PN, siendo mayores en el Grupo A (embriones si divididos a las 25h) mostrado en la Tabla 10.

Respecto a los porcentajes de embarazos, abortos y fecundación, no existen tales diferencias significativas, pero si se observa una tendencia a ser mayores en el Grupo A, además la tasa de implantación es mayor en este grupo, esta tasa muestra diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla 11) Siguiendo la tónica general de los resultados, la calidad embrionaria muestra diferencias significativas entre los dos

grupos, en el Grupo A se observan tasas mayores de embriones transferidos de la mejor calidad. (Tabla 12)

Tabla 10

Resultados, población de, mujeres iguales o menores a 35 años con o sin embriones divididos a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
Edad	32,43±2,37	31,65±2,47	NS
Nº Ovocitos	11,48±5,09	9,08±6,38	p<0,05
Nº MII	9,42±4,39	7,07±5,23	p<0,05
Nº 2PN	6,13±3,23	4,45±3,65	p<0,05
Nº Embriones transferidos	2,27±0,521	2,16±0,67	NS
Nº Sacos	1,46±0,54	1,21±0,54	NS
Nacimientos	1,23±0,60	1,16±0,60	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 11

Resultados, población de mujeres iguales o menores a 35 años con o sin embriones divididos a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
% Embarazo/transferencia	57 (34,3%)	19 (22,9%)	NS
% Abortos	5 (8,8%)	1 (5,3%)	NS
% Fecundación	1018 (65,0%)	369 (62,9%)	NS
% Implantación	82 (21,8%)	23 (12,8%)	p<0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 12

Calidad de los embriones transferidos en población de mujeres iguales o menores a 35 años, con embriones divididos o no

	GRUPO A	GRUPO B	P
Calidad 1 (Buena)	102 (61,4%)	36 (43,4%)	p<0,05
Calidad 2 (Mala)	19 (11,4%)	25 (30,1%)	p<0,05
Calidad 3 (Mixta)	45 (27,1%)	22 (26,5%)	p<0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Estudio 3.2

Se pretende valorar si la edad temprana de la mujer influye en la división temprana del embrión

- **Parte 2.** Mujeres mayores de 35 años en las que se ha realizado la observación de los embriones a las 25h. Se incluyen datos de 88 mujeres con embriones divididos y 58 mujeres con embriones no divididos.

Los resultados de la segunda parte del estudio, se repite el patrón obtenido anteriormente en la primera parte, la edad, el número de sacos, nacimientos que no demuestran diferencias, mientras que el número de ovocitos, número de metafasesII, número de 2PN y número de embriones transferidos muestra diferencias significativas entre los dos grupos y muestran mayores resultados en el Grupo A (embriones si divididos a las 25h) mostrado en la Tabla 13.

Los valores de porcentajes de embarazos fecundación e implantación muestran diferencias con una $p < 0,05$, siendo mayores en el Grupo A, pudiendo duplicarse en la tasa de embarazo. El porcentaje de aborto, al igual que en la parte 1 de este estudio no muestra diferencias significativas (Tabla 14).

Resultados de calidad embrionaria, no muestran diferencias significativas, pero existen un mayor porcentaje de embriones transferidos de mejor calidad en el Grupo A (Tabla 15).

Tabla 13

Resultados en la población de mujeres mayores de 35 años con o sin embriones divididos a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
Edad	37,67±1,29	37,79±1,24	NS
Nº Ovocitos	10,50±5,72	7,74±3,905	p<0,05
Nº MII	8,56±5,13	5,84±3,28	p<0,05
Nº 2PN	5,59±3,41	3,43±1,83	p<0,05
Nº Embriones transferidos	2,60±0,617	2,28±0,72	p<0,05
Nº Sacos	1,37±0,57	1,11±0,33	NS
Nacimientos	1,15±0,66	1,22±0,44	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 14

Resultados en la población de mujeres mayores de 35 años con o sin embriones divididos a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
% Embarazo/transferencia	27 (30,7%)	9 (15,5%)	p<0,05
% Abortos	4 (14,8%)	0 (0,0%)	NS
% Fecundación	492 (65,3%)	199 (58,7%)	p<0,05
% Implantación	37 (16,2%)	10 (7,60%)	p<0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 15

Calidad de los embriones transferidos en la población de mujeres mayores de 35 años, con embriones divididos o no

	GRUPO A	GRUPO B	P
Calidad 1 (Buena)	35 (39,8%)	21 (36,2%)	NS
Calidad 2 (Mala)	14 (15,9%)	18 (31,0%)	NS
Calidad 3 (Mixta)	39 (44,3%)	19 (32,8%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Estudio 4.1

Valorar en el grupo de pacientes que tienen embriones que si se han dividido a las 25h, si la edad de las mujeres influye en los resultados de las TRA.

Parte 1. Mujeres de diferentes grupos de edad, mayores y menores de 35 años, con embriones divididos a las 25 h post-fecundación. En el estudio se incluyen 166 casos de mujeres menores de 35 años con embriones divididos a las 25 h y 58 mujeres mayores de 35 que también tienen embriones de división temprana.

Los resultados muestran que no existen diferencias significativas en el número de ovocitos, número de metafases II, número de 2PN, número de sacos y número de nacimientos.

Si que existe diferencia en la edad, y en el número de embriones transferidos, esto se debe a que estamos comparando mujeres por grupos de edad, por lo tanto debe existir tal diferencia. El número de embriones es más alto en el grupo de mujeres mayores de 35 años, puesto que hay un límite de edad para someterse a las TRA y en estos casos se tiende a transferir más embriones (Tabla 16)

Con respecto a los tasas de Embarazo, aborto, fecundación e implantación, no existen diferencias significativas, pero se observa una tendencia en el Grupo A (menores de 35 años) a incrementar todos los porcentajes, salvo el de abortos que disminuye, respecto al Grupo B (Tabla17)

Los resultados la calidad de los embriones transferidos, muestran unas diferencias significativas entre los dos grupos, incluso duplicándose el porcentaje de embriones de mejor calidad en las mujeres menores de 35 años, Grupo A, con respecto al Grupo B, (Tabla18).

Tabla16

Resultados según grupo de edad de las mujeres, en la población cuyos embriones se han dividido a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
Edad	32,43±2,37	37,67±1,29	p<0,05
Nº Ovocitos	11,48±5,09	10,50±5,72	NS
Nº MII	9,42±4,39	8,56±5,13	NS
Nº Embriones	6,13±3,23	5,59±3,41	NS
Nº Embriones transferidos	2,27±0,521	2,60±0,617	p<0,05
Nº Sacos	1,46±0,54	1,37±0,57	NS
Nacimientos	1,23±0,60	1,15±0,66	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla17

Resultados según grupo de edad de las mujeres, en la población cuyos embriones se han divididos a las 25h

	GRUPO A	GRUPO B	P
% Embarazo/transferencia	57 (34,3%)	27 (30,7%)	NS
% Abortos	5 (8,8%)	4 (14,8%)	NS
% Fecundación	1018(65,1%)	492 (65,3%)	NS
% Implantación	82 (21,8%)	37(16,2%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Tabla18

Calidad de los embriones divididos transferidos a las 25h según grupo de edad de las mujeres, en la población en las que sí se han dividido los embriones

	GRUPO A	GRUPO B	P
Calidad 1 (Buena)	102 (61,4%)	35 (39,8%)	$p < 0,05$
Calidad 2 (Mala)	19 (11,4%)	14 (15,9%)	$p < 0,05$
Calidad 3 (Mixta)	45 (27,1%)	39 (44,3%)	$p < 0,05$

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Estudio 4.2

Contrastar los resultados obtenidos entre mujeres menores de 35 años con transferencia de embriones divididos y mujeres mayores de 35 años que también han tenido este tipo de transferencia.

Parte 2. Mujeres con embriones divididos a las 25h y transferidos, según grupos de edad, mujeres de 35 años de edad o menores y mujeres mayores de 35 años. Se incluye en una población de mujeres con embriones divididos transferidos y menos de

35 años de 141 casos. Mientras que el grupo de mujeres con embriones divididos transferidos mayores de 35 años de 77 casos.

La última parte del estudio 4, muestra que no existe diferencias significativas entre los dos grupos a los que se les han transferidos embriones divididos, salvo en la edad y el número de embriones transferidos, pero estos es debido a que los grupos están divididos por edad y por lo tanto debería existir una diferencia significativa en cuanto a ésta y el número de embriones transferidos, que es lógico puesto que a las mujeres de edad más avanzada se le transfieren más embriones y como muestran los resultados, el número es mayor en éstas Grupo B (mayores de 35 años) Tabla 19.

Las tasas de embarazos, implantación y abortos no muestran diferencias significativas entre los dos grupos (Tabla 20) aunque existe una tendencia al alza en el grupo de mujeres más jóvenes en el porcentaje de embriones transferidos de mejor calidad en el Grupo A (mujeres de 35 años o menores), esto puede ser debido a que son mujeres más jóvenes y por lo tanto la calidad ovocitaria es mejor (Tabla 21)

Tabla 19

Resultados de la población según grupos de edad con transferencia de embriones divididos

	GRUPO A	GRUPO B	P
Edad	32,55±2,35	37,65±1,24	p<0,05
Nº Ovocitos	11,28±5,11	10,10±5,22	NS
Nº MII	9,17±4,40	8,21±4,68	NS
Nº Embriones	5,92±3,22	5,23±3,11	NS
Nº Embriones transferidos	2,28±0,54	2,58±0,67	p<0,05
Nº Sacos	1,51±0,55	1,35±0,57	NS
Nacimientos	1,23±0,63	1,13±0,70	NS

T student, media ± desviación típica, NS: no significativo cuando p>0,05

Tabla 20

Resultados de la población según grupos de edad con transferencia de embriones divididos

	GRUPO A	GRUPO B	P
% Embarazo/transferencia	48 (34,0%)	13 (29,9%)	NS
% Abortos	5 (10,4%)	4 (17,4%)	NS
% Implantación	71 (22,0%)	34 (15,6%)	NS
% Fecundación	64,57 %	63,76 %	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Tabla 21

Calidad de los embriones divididos transferidos, según grupos de edad, en la población con embriones divididos transferidos

	GRUPO A	GRUPO B	P
Calidad 1 (Buena)	83 (58,9%)	31 (40,3%)	$p < 0,05$
Calidad 2 (Mala)	19 (13,5%)	13 (16,9%)	$p < 0,05$
Calidad 3 (Mixta)	39 (27,7%)	33 (42,9%)	$p < 0,05$

Chi-cuadrado. NS: no significativo cuando $p > 0,05$

Discusión

El uso de la división temprana a las 25h, como co-parámetro en la selección del mejor embrión para transferencia por su mayor potencial implantatorio, ha sido estudiado y usado por diferentes grupos (58-59), con el fin de minimizar la incidencia de embarazos múltiples Aafke et col. (60)

La realización de la clasificación temprana del embrión, obliga a sacar los embriones del incubador, y esto podría causar cambios en el pH y la temperatura, los cuales pueden influir en su desarrollo embrionario y posteriormente en su capacidad de implantación. Según el estudio realizado por Sakkas y col, el hecho de clasificar los embriones a las 25-27 h postpunción, no afecta al desarrollo embrionario y aumenta las probabilidades de embarazo y la tasa de implantación (26). Tal como indican los resultados del estudio 1, no existen diferencias entre los distintos grupos, esto demuestra que el proceso de sacar los embriones del incubador y observar la división a las 25 horas, no afecta a la tasas de embarazo ni a la capacidad de implantación, por lo tanto no perjudica el éxito de las TRA y a esto hay que añadir que la tasa de embarazo existe una tendencia creciente en el grupo de embriones de división temprana. Aunque en nuestro estudio, si que hay que mencionar que se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de fecundación y el de transferencia, pero probablemente pueda ser debido a la casuística y no tenga relación con el estudio en sí, ya que todos los casos fueron escogidos al azar.

El grupo de Andrés Salumets y col (61), publicaron un estudio en el que se evidenciaba que los embriones de división temprana poseía una competencia de desarrollo significativamente mayor y que su transferencia estaba relacionada con altas tasas de embarazo respecto a los embriones tardíos. Los resultados obtenidos en nuestro estudio 2, coinciden con los publicados por el grupo de Salumets, ya que las tasas tanto de embarazo como la de implantación, son significativamente mayores en el grupo de pacientes donde si observó la división a las 25 h. Una de las razones podría ser la siguiente, la activación del genoma embrionario ocurre en el estadio 4-8 células y hasta entonces el desarrollo del preembrión depende del uso del RNAm de herencia materna (62) y en base a esto Clegg y col (63), proponen que los embriones que presente

división temprana a las 25h tendrán un menor consumo del RNAm, lo que les permitirá dar lugar a embriones de mejor calidad, ya que las reservas maternas podrían durar más.

Una de las causas por las que las TRA en mujeres de edad avanzada no es tan eficaz como en mujeres más jóvenes, es por la calidad de sus ovocitos, esto es debido al declive en la función reproductiva que sufren las mujeres a partir de los 35 años (64). Por estos motivos hemos decidido dividir nuestra población en dos grupos de edad, mayores de 35 y menores de 35 años. En la primera parte del estudio 3 comparamos la población de mujeres de 35 años o menores en las que si han tenido lugar la observación de la división a las 25h, en los resultados existen diferencias significativas en cuanto a la implantación y la calidad embrionaria, siendo mejor en el grupo en que si ha ocurrido la división temprana. En cuanto a las tasas de embarazo, no se observan diferencias significativas pero si existe una cierta tendencia a ser mayores en el grupo que si hubo división. Los embriones transferidos en las pacientes que si presentaron división a las 25h, tienen mejores tasas de implantación, incluso duplican las tasas de implantación con embriones de división tardía. A su vez la calidad de los embriones transferidos es mucho mejor en los casos donde se observó división temprana. Los resultados son similares a la población general del estudio 2.

La segunda parte del estudio 3 engloba a mujeres mayores de 35 años. Las tasas de fecundación, implantación y embarazo son significativamente mayores en mujeres con embriones divididos a las 25 h, los datos obtenidos en el estudio 3 coinciden con los obtenidos en el estudio dos y por lo tanto la edad no influye en los resultados, todo esto concuerda con los obtenidos en la población general.

Por lo tanto haciendo una comparativa de edad y teniendo en cuenta la división temprana de los embriones, pasamos al estudio 4, donde nuestros grupos serán, aquellas pacientes en las que la división temprana haya tenido lugar y estarán segmentadas en base al criterio de edad expuesto anteriormente. Los resultados no revelan diferencia alguna entre tasas de embarazo, fecundación e implantación, y no coinciden con los de Laurent y Menezo (64) en cuyo estudio revelaron una relación la edad materna con un mal desarrollo embrionario temprano y la formación de blastocisto (64-65). Una de las explicaciones plausibles es que el tamaño poblacional de nuestro grupo sea pequeño,

por lo que se debería incrementar la población de estudio para confirmar los resultados obtenidos. Otra de los razonamientos que podría explicar esta diferencia, es que los embriones que son capaces de realizar la división a las 25h, cuentan con una reserva de mRNA ovocitario, la cual les permite llegar al estadio de blastocisto mejor que el resto de embriones (63). Esto podría significar que estaríamos comparando los mejores embriones de cada grupo de edad y por lo tanto no tendría porque existir diferencias entre ellos, ya que ambos han sido capaces de llevar a cabo la división temprana.

El criterio principal que se ha usado para seleccionar los embriones transferidos es la calidad que tienen los embriones el día de la transferencia, para valorar si la transferencia de embriones de división temprana por si sola podría ser usada como parámetro único a la hora de seleccionar los embriones a transferir, se realizó la parte 2 del estudio 2, donde se compararon dos grupos, en uno se había transferido al menos un embrión de división temprana y en otro no se transfirieron embriones divididos porque estos no eran los de mejor calidad, no se observaron diferencias en cuanto a tasas de implantación y embarazo. Cuando se realizó el mismo estudio segmentando la población según edad el resultado fue idéntico al anterior, no había diferencias en cuanto a las tasas de implantación y embarazo. Por lo tanto podríamos asumir que la división temprana del embrión por si sola no es un buen parámetro de selección embrionario. Sin embargo en situaciones en las que se disponga de embriones de igual calidad, la división temprana sería positiva porque nos permitiría elegir los embriones no solo por su calidad sino por su tiempo de división. Hasta ahora solo se ha tenido en cuenta el hecho de que la división a las 25 h haya tenido lugar y no se ha dado importancia a otras características de esta división, que actualmente se están comenzando a incluir, como pueden ser: la morfología de las blastómeras (66), la morfología y localización de los pronúcleos posición y número de nucleolos y apariencia del citoplasma, presencia o no del halo citoplasmático (67-69). Puede que en un próximo estudio se deban analizar estos parámetros.

Conclusiones

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos y la bibliografía revisada, se puede concluir, que el hecho de sacar los embriones del incubador para observar la división temprana, no afecta a su potencial, ni al éxito de las TRA, por lo que se puede concluir que es no invasivo. Si a esto le añadimos que no requiere nuevo material, lo puede realizar cualquier embriólogo de manera rutinaria en el laboratorio y no añade coste a las técnicas, es un parámetro a tener en cuenta en el momento de seleccionar los embriones a transferir,

En base a los resultados obtenidos la división temprana no se podrá utilizar como único criterio a la hora de seleccionar los embriones, tal y como muestran nuestros resultados, pero es una herramienta muy útil para poder seleccionar los embriones a transferir cuando tenemos más de 3 embriones de igual calidad.

Aparentemente es un parámetro que no se ve afectado por la edad de la paciente, aunque sería recomendable incrementar el tamaño muestral, puesto que nuestros resultados no coinciden con los de otros grupos.

Cuando se transfiere al menos un embrión de división temprana, las tasas de implantación son mejores que cuando no se transfieren embriones divididos tanto en mujeres de la misma edad como mujeres de edad avanzada, por lo que la edad no influye. Habitualmente las mujeres mayores de 35 años y puesto que la fertilidad de las mujeres disminuye con la edad, existe una tendencia a transferir 3 embriones, por lo tanto en mujeres mayores de 35 años en las que existan embriones de buena calidad y estén divididos a las 25 h, se podría plantear la transferencia de 2 embriones.

Bibliografía

1. Mairead Black, Siladitya Bhattacharya. (2010) Epidemiology of multiple pregnancy and the effect of assisted conception Department of Obstetrics & Gynaecology, University of Aberdeen, School of Medicine, Aberdeen Maternity Hospital, Aberdeen AB25 2ZL, UK Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 15. 306-312
2. Rafaela Gonzalez, J Remohi IVI Valencia. Reducción embrionaria. Gestación multiple, porblemáticas actuales en Medicina Reproductiva y Perinatología pág 87. Ed: Eduard Gratacós y Alberto Romeu.
3. Bettaneli Group (2003) Infertility therapy- associated multiple pregnancies (births: on ongoing epidemia. Rep. Biomed Online 7, 515-542
4. Remohí J, Bellver J, Domingo J, Bosh E. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana, 3ª edición Mc Graw Hill. Capitulo 29
5. De Sutter P, Gerris J and Dhont M (2003b) A health-economic decision analytic model comparing double with single embryo transfer in IVF/ICSI: a sensitivity analysis. Hum Reprod 18,1361.
- 6- Practice committee of American Society for Reproductive Medicine. (2011) Multiple gestation associated with infertility therapy: an American Society for Reproductive Medicine Practice Committee opinion. ASRM pages vol97 n°4 825-827
- 7- Allan Templeton FRCOG (2004) The multiple gestation epidemic: The role of the assisted reproductive Technologies Department of Obstetrics and Gynecology,

University of Aberdeen, Aberdeen Maternity Hospital, Aberdeen, United Kingdom
American Journal of Obstetrics and Gynecology 190, 894-8

8- Edwards RG. (1995) Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation. *Hum Reprod* 10, Suppl 2:60-6

9- J.E. Swan and G.D. Smith (Marzo 2011) Advances in embryo culture platform: novel approaches to improve preimplantation embryo development through modifications of microenvironment. *Human reproduction* 541-557

10- Gary D. Smith Shuichi Takayama Jason E. Swain (2012) Rethinking In Vitro Embryo Culture: New Developments in Culture Platforms and Potential to Improve Assisted Reproductive Technologies. Department of Obstetrics & Gynecology, University of Michigan. *Biol Reprod.* 8;86(3):62

11- ESHRE Task force on Ethics and Law (2003) Ethical issues related to multiple pregnancies in medically assisted procreation. *Hum Reprod* 18,1976–1979.

12- Jason K. Min, Paul Claman, Ed Hughes, (2006) MB, Guidelines for the Number of Embryos to Transfer Following In Vitro Fertilization

13-Dean NL, Philips SJ, Buckett WM, Biljan MM and Lin Tan S (2000) Impact of reducing the number of embryos transferred from three to two in women under the age of 35 who produced three or more high-quality embryos. *Fertil Steril* 74,820–823.

14-T.Ebner¹, M.Moser, M.Sommergruber and G.Tews (2003) Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review *Human Reproduction Update*, Vol.9, No.3 pp. 251-262

15- Lynette Scott (2003) The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. Human Reproduction Update, Vol.9, No.3,pp.237-249

16- Van Montfoort APA, Dumoulin J.C.M, Kester A.D.M and Evers J.L.H. (2004). Early cleavage is a valuable addition to existing embryos selection parameters: a study using single embryo transfers. Human Reprod. Vol 9, n° 9 pp 2103-2108

17- S.Ziebe1, K.Petersen, S.Lindenberg, Andersen A, Gabrielsen and A.Nyboe Andersen (1997) Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Human Reproduction vol.12 no.7 pp.1545–1549

18- Edwards RG, Fishel SB, Cohen J. et al. Factor influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. (1984) J. In Vitro Fert. Embryo transf., 1, 2-23

19- Cumminns JM, Breen, TM, Harrison , K.L, et al. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization : its value in predicting pregnancy and in comparation with visual estimated of embryo quality. (1986)J. In vitro fert.Embryo transf., 3, 284-295.

20- Hill, G.A., Freeman M, Bastias MC. Et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rates in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. (1989). Fétil.Steril., 105,1-8.

21- Steer CV, Mills CL, Tan SL, et al. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer program. (1992) Hum. Reprod.7, 117-119.

22- Cuadernos de Embriología Clínica. ASEBIR. Criterio ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Asociación para el Estudio de la Biología de la reproducción.

23-J. Tesarik, A.M.Junca, A.Hazout, F.X Aubriot, C.Nathan, P.Cohne Bacrie, A,Dumont- Hassan (2000) Embryos with high implantation potencial after intracitoplasmatic sperm injection can be recognized by a simple, non invasive examination of pronuclear morphology. Human repro vol 15. 1396-139923-

24- Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal implantation development can be predicted by a single static observation on PN stage morphology. Human Reprod 14: 1318-1323

25- Saluments A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T (2001) The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Human Reprod 16 (10): 2177:2181

26- Sakkas D, Shourkir Y, Chardonens, Bianchi P.G., Campana A. (1998) Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmatic sperm injection as an indicator of embryo viability. Human Reproduc. Vol 13 n° 1 pp182-187

27- Aafke P.A.Van Montfoort, John C.M.Dumoulin, Arnold D.M.Kester and Johannes L.H.Evers (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. Human Reproduction Vol.19, No.9 pp. 2103–2108

28- K. Lunding, C.Berg, T.Hardarson (2001) Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum repro vol 16 2652-2657

29- M.-L.Windt, T.F.Kruger, K.Coetzee and C.J.Lombard (2004) Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos Human Reproduction Vol.19, No.5 pp. 1155-1162

30- Ciray H.N, Karangenc L, Ulug U, Bener F. (2006). Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. Fertility and Sterility Vol.85, n° 2 pp 358-365

31- Aafke P.A.Van Montfoort¹, John C.M.Dumoulin, Arnold D.M.Kester and Johannes L.H.Evers (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers Human Reproduction Vol.19, No.9 pp. 2103–2108

32- Trounson, A.O., Mohr, L.R., Wood, C. and Leeton, J.F. (1982) Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. J. Reprod. Fertil., 64, 285–294.

33- Capmany, G., Taylor, A., Braude, P.R. and Bolton, V.N. (1996) The timing of pronuclear formation, DNA synthesis and cleavage in the human 1-cell embryo. Mol. Hum. Reprod., 2, 299–306

34- Ciray H.N, Karangenc L, Ulug U, Bener F. (2005). Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertility and Sterility vol.84, no5

35- Andres Salumets, Christel Hyde-Granskog, Sirpa Mäkinen, Anne-Maria Suikkari, Aila Tiitinen and Timo Tuuri (2003) Early cleavage predicts the viability of

human embryos in elective single embryo transfer procedures Human Reproduction Vol.18, No.4 pp. 821- 825

36- Capmany,G., Taylor,A., Braude,P.R and BoltonV.N (1996) the timing of pronuclear formatio, DNA síntesis and cleavage in human 1-cell embryo. Mol Human Reproduction 2, 299-306

37- McKiernan, S.H. and Bavister, B.D (1994) Timing of development is a critical parameter for predicting sucessful embryogenesis. Hum. Reprod 9(11) 2123-2129

38- Maureen Moony, Liliana T. Colombero, Lucinda .L.Veek, Zev.Rosenwaks and Gianpiero D. Palermo (1999) Sperm integrity is critical for normal mitotic division an early embryonic development. Human repro vol 5 836-844

39- A. J. Watson (2007) Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competente J ANIM SCI 2007, 85:E1-E3.

40- T.A.L. Brevini, P. Lonergan, F. Cillo, C. Francisci, L.A. Favetta, T. Fair and F. Gandolfi (2002)Evolution of mRNA Polyadenylation Between Oocyte Maturation and First Embryonic Cleavage in Cattle and Its Relation With Developmental Competence. Molecular Reproduction and Development 63:510–517

41- Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA (2008) A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle Lumber from Barth. Hum Repro 23: 699-708

42.- Menken J, Trussel J and Larsen U (1986) Age and infertility. Science 26 September Vol. 233 no. 4771 pp. 1389-1394.

43- B M van Noord-Zaadstra, C W Looman, H Alsbach, J D Habbema, E R te Velde, and J Karbaat. (1991) Delaying childbearing: effect of age on fecundity and outcome of pregnancy *BMJ*;302:1365-7

44- Giritharan G, Talbi S, Donjacour A, Di Sebastiano F, Dobson AT, Rinaudo PF (2007) Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction*;134:63–72.

45- Yi-Liang Miao, Kazuhiro Kikuchi, Qing-Yuan Sun, and Heide Schatten (2009) Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility *Human Reproduction Update*, Vol.15, No.5 pp. 573–585

46-Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR.(1996) Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod* 11(10):2217-22.

47- Kim NH, Moon SJ, Prather RS, Day BN. (1996) Cytoskeletal alteration in aged porcine oocytes and parthenogenesis. *Mol Reprod Dev* 43:513–518.

48- Segers I, Adriaenssens T, Coucke W, Cortvrindt R, Smitz J (2008) Timing of nuclear maturation and post-ovulatory aging in oocytes of in vitro-grown mouse follicles with or without oil overlay. *Biol Reprod* ;78:859–868.

49-Schatten H. (2008) The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochem Cell Biol* ;129:667–686

50- Li E. (2002) Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*;3:662–673

51- Aafke P.A. van Montfoort, Joep P.M. Geraedts, John C.M. Dumoulin¹, Alphons P.M. Stassen, Johannes L.H. Evers¹ and Torik A.Y. Ayoubi (2008) Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis MHR-Basic Science of Reproductive Medicine Vol.14, No.3 pp. 157–168

52- Zhongwei Huang and DaganWells(2010) The human oocyte and cumulus cells relationship: new insights from the cumulus cell transcriptome Molecular Human Reproduction, Vol.16, No.10 pp. 715–725

53.- Gloria I.Perez and Jonathan L.Tilly (1997) Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice Human Reproduction vol.12 no.12 pp.2781–2783,

54.- Qiao TW, Liu N, Miao DQ, Zhang X, Han D, Ge L, Tan JH (2008) Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s) Mol Reprod Dev. ;75(3):521-8

55- Navarro I, Quintero LA, Jimenez-Moreno V, Monzo A, Santana AG, Montañana V, Romeu A (2001) Comparación del porcentaje de fecundación y la calidad embrionaria tras la realización de FIV e CSI en un mismo ciclo de tratamiento: estudio preliminar. R. Iberoamericana de Fertilidad 18 (2): 75-79

56- Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A.P, Fortini D, Griego N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. Fertil. Steril 2003, 80: 341-349

57- Veeck LL.: Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio de FIV Remohi J, Pellicer A, Bonilla-Musoles F,(Eds): Avances en reproducción asistida. Madrid Ediciones Diaz de Santos S.A.; 1992.Páginas 117-162.

58- Ciray HN, Ulug U, BahÇeci M (2004) transfer of early-cleavage embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI embryo transfer.Reprod Biomed online feb;8(2):219-23

59- Haydar Nadir Ciray, Levent KaragengÇ, Ulun Ulug, Faruk Bener, Mustaka Bahceci (2005) Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles.fertility and Sterility vol84; Issue 5, pages 1411-1416.

60- Aafke P.A.Van Montfoort, John C.M.Dumoulin, Arnold D.M.Kester and Johannes L.H.Evers (2004) Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfersHuman Reproduction Vol.19, No.9 pp. 2103–2108,

61- Andres Salumets, Christel HydeÂn-Granskog, Sirpa MaÈkinen, Anne-Maria Suikkari Aila Tiitinen and Timo Tuuri (2003) Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures Human Reproduction Vol.18, No.4 pp. 821±825,

62 Nancy A Telford, Andrew J Watson, and Gilgert A Schultz (1990) Transition From Maternal to Embryonic Control inEarly Mammalian Development: A Comparison of Several Species. Molecular Reprod and Dev 2690-100

63-Clegg K.B., Piko I. (1983) Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos. *J. Embryol.Exp.Morphol.*, , 74: 169-182.

64- W. Hamish Wallace^{1,3} and Thomas W.Kelsey, (2004) Ovarian reserve and reproductive age may be determined from measurement of ovarian volume by transvaginal sonography .*Human Reproduction* Vol.19, No.7 pp. 1612±1617

65- Laurent Janny, Yves J.R. Menezo (1996) Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Molecular Reproduction and Development*. Volume 45, Issue 1, pages 31–37, September

66- Pantos K, Athanasiou V, Stefanidis K, Stavrou D, Vaxevanoglou T, Chronopoulou M. (1999) Influence of advanced age on the blastocyst development rate and pregnancy rate in assisted reproductive technology. *Fertil Steril*. Jun;71(6):1144-6

67-J. Tesarik, A.M.Junca, A.Hazout, F.X Aubriot, C.Nathan, P.Cohne Bacrie, A,Dumont- Hassan (2000) Embryos with high implantation potencial after intracitoplasmatic sperm injection can be recognized by a simple, non invasive examination of pronuclear morphology. *Human repro* vol 15. 1396-139923-

68- Scott L A, Smith S. (1998) The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. *Human Reprod* 13 (4): 1003-1013

69- Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal implantation development can be predicted by a single static observation on PN stage morphology. *Human Reprod* 14: 1318-1323

70- Saluments A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T (2001)
The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human
embryo quality. Human Reprod 16 (10): 2177:2181