

Embriología

## **Relación entre el cultivo de los embriones “sobrantes” y la tasa de implantación: una reflexión acerca de la calidad intrínseca de los embriones**

*Relationship between the culture of spare embryos and implantation rate: a reflection of intrinsic quality of the embryos*

Vendrell J, Bonada M, Marqueta J, Torres M, Roses A, Idrobo J

Instituto Balear de Infertilidad. Palma de Mallorca. España.

### **Resumen**

*Actualmente los programas de FIV dan lugar a una serie de embriones “sobrantes” que no cumplen ni los criterios de selección embrionaria para la transferencia en día 3 ni los criterios de congelación de embriones tempranos. Estos embriones se cultivan hasta el estadio de blastocisto y nos pueden aportar conocimientos acerca de su capacidad de desarrollo in vitro. Este trabajo pretende analizar la posible relación entre los resultados de los ciclos de FIV-TE en día 3 y el cultivo hasta estadio de blastocisto de los embriones no transferidos con el objeto de encontrar un posible potencial intrínseco de ciertos embriones para progresar en cultivo in vitro. Se estudiaron un total de 125 ciclos de IC-SI realizados a 108 pacientes. Los embriones no seleccionados para transferencia ni congelación en día 3 fueron destinados a cultivo prolongado en medios secuenciales. Los embriones sobrantes se dividieron retrospectivamente en dos grupos en función de la formación, o no, de blastocistos. El grupo de embriones que alcanzó el estadio de blastocisto mostró significativamente un mayor número de ovocitos extraídos, ovocitos maduros (MII) y embriones evolutivos, así como una mayor tasa de implantación y embarazo múltiple que los embriones que no alcanzaron el estadio de blastocisto. Por otra parte, la tasa de formación de blastocistos se relacionó con el número de blastómeros en día 3. La mayor tasa de blastocistos expandidos se alcanzó en aquellos embriones de 8 células/compactación en día 3. En conclusión, el desarrollo a blastocisto de los embriones sobrantes nos muestra una serie de embriones con un alto potencial intrínseco que se asocian con elevadas tasas de implantación. La transferencia de blastocistos a estas pacientes de “buen pronóstico” podría reducir el riesgo de embarazo múltiple.*

**Palabras clave:** Embriones sobrantes. Cultivo prolongado. Competencia de desarrollo. Blastocisto. Selección embrionaria

---

**Correspondencia:** Dr. J. Vendrell  
Laboratorio de Reproducción, Instituto Balear de Infertilidad  
Joan Ripoll i Trobat 23,  
07013 Palma de Mallorca  
Islas Baleares. España  
E-mail: vendrell@ibilab.com

## Summary

Currently, the IVF programs leave spare embryos that accomplish neither transfer nor cryopreservation criteria in day-3 and they are cultured to blastocyst stage. These embryos allow knowing us about the capability to in vitro development. This study aims to analyse the relation between day-3 ET results and blastocyst achievement of nontransferred sibling embryos in order to reflect on the possible intrinsic potential of certain embryos to progress in vitro. A total of 125 ICSI cycles were performed to 108 patients. Embryos were transferred at day 3 and supernumerary embryos were destined to extended culture. The sibling embryos were divided retrospectively in two groups depending on blastocyst formation. Blastocyst-forming group had a significantly increased number of oocyte retrieved, ICSI oocytes, developed embryos, an increased rate of implantation, and an increased percentage of multiple gestation compared with non blastocyst-formation group. On the other hand, the rate of blastocyst formation was related to number of blastomere at day-3. The higher rate of expanded blastocyst was achieved by eight-cells/compacted embryos at day-3. Sibling embryo blastocyst development may reflect inherent top quality embryos associated with high rates of implantation. The transfer of blastocyst in these "good-prognosis" patients could reduce the risk of multiple pregnancies.

**Key words:** Sibling embryos. Extended culture. Developmental competente. Blastocyst. Embryo selection.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente en los programas de fecundación in vitro (FIV) se tiende a transferir un número óptimo de embriones que permita alcanzar una tasa aceptable de embarazo reduciendo al máximo el porcentaje de embarazo múltiple. Numerosos factores como la causa de esterilidad, los protocolos de estimulación, la calidad espermática, las condiciones de cultivo embrionario y otros, pueden influir sobre la tasa de éxito en FIV. No obstante, a pesar del gran esfuerzo para controlar estos factores los resultados de FIV muestran en ocasiones gran variabilidad.

Usualmente los embriones se transfieren en estadio de cuatro u ocho células. Los embriones se seleccionan en base a lo que llamamos "calidad embrionaria". La calidad embrionaria es un concepto multifactorial y difícil de definir. Es incuestionable que la morfología de los embriones a las 48-72 h post-inseminación/microinyección tiene un valor predictivo respecto al potencial de implantación (1). No obstante, la tendencia general sugiere que los criterios tradicionales de selección embrionaria basados en la morfología de los embriones tempranos están empezando a devaluarse. Recientemente, criterios como la simetría de los blastómeros, la fragmentación extracelular, la granulosis citoplásmica y la morfología de la zona pelúcida han sido completados por otros como la incidencia de la multinucleación de los blastómeros (2, 3), la morfología pronuclear (4, 5), la morfología del primer corpúsculo polar (6) y el tiempo de entrada en la primera división (7-9). A pesar de todo esto las técnicas de FIV exhiben una difícil con-

tradición: altas tasas de pérdida embrionaria y alta incidencia de embarazo múltiple (revisión:10).

En cualquier caso, muchos programas de FIV aplican rutinariamente un varem basado en los criterios arriba mencionados y muchos embriones se transfieren al útero con la esperanza de que alguno de ellos implante. Los embriones sobrantes se destinan a los programas de congelación. En la actualidad, practicamos una selección estricta de embriones destinados a la congelación con el objeto de optimizar los resultados de criotransferencia. De este modo los embriones sobrantes se destinan al cultivo prolongado y, si se alcanza el estadio de blastocisto, se incluyen en el programa de congelación de blastocistos. El cultivo de los embriones sobrantes constituye una valiosa oportunidad para analizar su potencial de desarrollo y relacionarlo con los resultados obtenidos con sus embriones "hermanos" transferidos en día 3.

En el presente trabajo utilizamos un sistema de cultivo secuencial para examinar la posible correlación entre el desarrollo de los embriones cultivados hasta el estadio de blastocisto y los resultados de las trasferencias en día 3. Por otra parte, analizaremos la relación entre la formación de blastocisto in vitro y el número de células en día 3.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente 427 embriones sobrantes procedentes de 108 pacientes de FIV de  $32,9 \pm 3,4$  (19-39) años de edad, en 125 ciclos de microinyección espermática (ICSI). El periodo de estu-

dio está comprendido entre enero de 2000 y diciembre de 2001. Todas las pacientes firmaron un consentimiento informado antes de realizar el tratamiento.

La estimulación ovárica se realizó mediante la administración de análogos de la GnRH combinados con FSH en un protocolo largo. La desensibilización pituitaria se inició a mitad de la fase lútea mediante la administración subcutánea de acetato de leuprolide (Procrin, Abott, Madrid, España) o Triptorelina (Decapeptyl, Ipsen Pharma, Barcelona, España). En determinados casos se utilizó el acetato de nafarelina (Synarel, Seid, Barcelona, España). La supresión se confirmó mediante ecografía transvaginal y niveles de 17  $\beta$ -estradiol sérico < 50 pg/ml. El crecimiento folicular se inició con FSH ultrapura (Neofertinorm, Serono, Madrid, España) o recombinante (Puregon; Organon, Oss, Holanda o Gonal-F, Serono). El tratamiento con FSH se inició el tercer día del ciclo menstrual y fue individualizado hasta que el diámetro del folículo dominante alcanzó 20 mm, en este momento se administró la gonadotropina coriónica humana (hCG; 10.000 IU; Profasi HP, Serono). La recuperación ovocitaria se realizó a las 36 h después de la inyección de hCG por aspiración transvaginal ecoguiada.

El complejo ovocito/cumulus se lavó en medio Gamete-20 (IVF Science Scandinavian, Gothenburg, Sweden) y se incubó en IVF-20 (IVF Science Scandinavian) a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> hasta el momento de la microinyección. La muestra de semen se preparó utilizando la técnica de swim-up en medio Sperm Rinse (IVF Science Scandinavian). Todos los ovocitos incluidos en este estudio fueron inyectados mediante ICSI de 4 a 5 h después de la extracción. Previamente se eliminaron las células de granulosa con hialuronidasa (Hyase-10X; IVF Science Scandinavian) mediante sucesivos pases a través de la pipeta. El PVP (ICSI; IVF Science Scandinavian) se utilizó para facilitar la inmovilización de los espermatozoides previo al ICSI. Los ovocitos fueron cultivados en microgotas de 20  $\mu$ l de medio IVF-20 bajo aceite (Ovoil; IVF Science Scandinavian). Entre las 17-20 h después de la microinyección se comprobó la fecundación normal mediante la presencia de dos pronúcleos. Los cigotos de dos pronúcleos se cultivaron individualmente en microgotas de 20  $\mu$ l de medio G1.1 (IVF Science Scandinavian) y 24 h más tarde (día 2) se clasificaron de acuerdo con el número, simetría y morfología de los blastómeros, el grado de fragmentación y la apariencia del citoplasma y la zona pelúcida. 72 h después de la microinyección (día 3) los embriones de mejor calidad se transfirieron a 1 ml de medio G2.2 (IVF Science Scandinavian) para la transferencia. Se establecieron cuatro categorías

desde el tipo 1 al 4 en función del porcentaje de fragmentación: tipo 1, ausencia de fragmentación; tipo 2, fragmentación < 20%; tipo 3, fragmentación entre el 20-50%; tipo 4, fragmentación > 50%. Los embriones destinados a la transferencia y congelación en día 3 fueron aquellos clasificados como tipo 1 ó 2, de 6-8 células, con blastómeros simétricos, citoplasma no granular y ausencia de vacuolas. Los embriones sobrantes se cultivaron individualmente en microgotas de 20  $\mu$ l de medio G2.2 (IVF Science Scandinavian) hasta el estadio de blastocistos de acuerdo con el manual del proveedor.

El porcentaje de formación de blastocistos se determinó entre los días 5 y 7 de cultivo. Los blastocistos fueron clasificados utilizando el sistema descrito por Gardner y Schoolcraft (11). Únicamente se seleccionaron para la congelación los blastocistos totalmente expandidos que presentaron una masa celular interna claramente empaquetada y un trofotodermo bien definido. Los embriones que no cumplían estos criterios se cultivaron hasta día 7. La congelación se llevó a cabo utilizando un protocolo estándar con glicerol, modificado de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Freeze-Kit 2; IVF Science Scandinavian).

La transferencia embrionaria se realizó en día 3 utilizando un catéter Gynetics (Gynetics Medical Products, Hamont-Achel, Bélgica) y guiado por ecografía. La fase lútea se suplementó con progesterona vaginal micronizada (Progeffik; Effik, Madrid, España; o Utrogestan, Seid, Barcelona, España). Once días después de la transferencia embrionaria se realizó la prueba de embarazo mediante la medida de los niveles séricos de  $\beta$ -hCG. El embarazo clínico se confirmó mediante ecografía vaginal a las 4 semanas de la transferencia y se definió por la presencia de latido fetal.

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el SPSS utilizando el t-test para comparar entre medias. La comparación entre porcentajes se realizó mediante la aplicación del test de la  $X^2$  de Pearson. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

Durante el periodo de estudio se realizaron 300 ciclos de ICSI. De éstos, 125 tuvieron embriones sobrantes destinados al cultivo prolongado (41,7%). Los ciclos con embriones sobrantes se dividieron retrospectivamente en dos grupos en función de la formación, o no, de blastocistos. La tabla 1 muestra los

resultados de los ciclos de ICSI en función de la formación, o no, de blastocistos de los embriones sobrantes cultivados in vitro. Se obtuvieron un total de 2082 ovocitos ( $16,6 \pm 6,8$ ; media  $\pm$  DE) y 888 embriones ( $7,1 \pm 3,1$ ) fueron evolutivos en día 3. El estadio de blastocistos se alcanzó en 80 ciclos (64%) y fueron congelados, o no, de acuerdo con los criterios del programa de congelación de blastocistos. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos en función de la edad de la paciente, la tasa de fecundación, el número de embriones transferidos y el porcentaje de embarazo.

El análisis revela que el grupo con formación de blastocistos mostraba un mayor número de ovocitos extraídos ( $18,3 \pm 6,8$  vs.  $13,8 \pm 5,8$ ;  $P < 0,0003$ ), ovocitos maduros ( $12,3 \pm 5,2$  vs.  $8,6 \pm 3,4$ ;  $P < 0,0001$ ), y embriones evolutivos ( $8,0 \pm 3,2$  vs.  $5,5 \pm 1,9$ ;  $P < 0,0001$ ). Asimismo este grupo mostraba una mayor tasa de implantación (38,1% vs. 22,4%;  $P < 0,003$ ) y un mayor porcentaje de embarazo múltiple (33,8% vs. 15,6%;  $P < 0,05$ ) comparado con el grupo sin formación de blastocistos.

La tabla 2 muestra el resultado del cultivo de los embriones sobrantes respecto al porcentaje de embarazo y en función de la formación de blastocistos. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas entre los dos grupos respecto a la edad de la paciente, el porcentaje de fecundación y el número de embriones transferidos. Por el contrario, el número de ovocitos extraídos y la tasa de implantación son significativamente mayores en el grupo con formación de blastocistos ( $P < 0,006$  y  $P < 0,01$ , respectivamente).

Por otra parte, la probabilidad de formación de blastocistos se relacionó con el número de blastóme-

ros a las 72 h postinyección (tabla 3). La mayoría de los embriones cultivados estaban en estadio de compactación en día 3 (20%), y las diferencias fueron significativas cuando comparamos con los estadios de tres, siete, ocho y más de ocho células ( $P < 0,001$  en todos los casos). Un total de 166 embriones alcanzaron el estadio de blastocistos (38,9%; 166/427). Las tasas de formación de blastocistos fueron mayores en aquellos embriones con un mayor número de células en día 3. La mayor tasa de formación de blastocistos corresponde a aquellos embriones en estadio de 8 células en día 3. Un total de 63,8% (30/47) de los embriones en estadio de 8 células se desarrollaron hasta blastocisto y esta tasa resultó significativamente diferente al compararla con la de los embriones en estadio de cuatro, cinco, siete y más de ocho células ( $P < 0,001$ ;  $P < 0,001$ ;  $P < 0,01$ ,  $P < 0,001$ , respectivamente). En el caso de blastocistos expandidos (grados 4 y 5 según el varemo de Gardner y Schoolcraft), el 61,7% de los embriones en estadio de 8 células alcanzó la fase de blastocisto con una tasa significativamente mayor que el resto de grupos ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSIÓN

La población de embriones sobrantes nos da la oportunidad de estudiar el potencial de desarrollo in vitro de los embriones no transferidos en el mismo ciclo. En el presente estudio incluimos únicamente los ciclos de ICSI debido a la gran incidencia de este procedimiento en nuestro programa de FIV y por razones de homogeneización del análisis. Nuestros resultados muestran que el grupo de embriones que al-

**Tabla 1**

*Resultados de los ciclos de ICSI en función de la formación, o no, de blastocistos de los embriones sobrantes cultivados in vitro.*

Formación de blastocisto	Nº de ciclos	Edad	Nº de ovocitos extraídos	Nº de ovocitos inyectados	Nº de ovocitos dos pronúcleos (%)	Nº de embriones día 3	Nº de embriones transferidos	Nº de embriones cultivados	Nº de embarazos /transfer (%)	Nº de embriones implantados/nº de embriones ransferidos (%)	No. of gestations/no. transfers (%)
Si	80	33,0 $\pm$ 2,9	18,3 $\pm$ 6,8	12,3 $\pm$ 5,2	9,3 $\pm$ 3,9 (75,9)	8,0 $\pm$ 3,2	2,6 $\pm$ 0,7	4,2 $\pm$ 2,6	43/80 (38,1)	(80/210)	27/80 (33,8) <sup>a</sup>
No	45	32,6 $\pm$ 3,9	13,8 $\pm$ 5,8	8,6 $\pm$ 3,4	6,3 $\pm$ 2,2 (73,3)	5,5 $\pm$ 1,9	2,7 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 1,3	20/45 (44,4)	28/125 (22,4)	7/45 (15,6) <sup>b</sup>
P		NS	<0,0003	<0,0001	NS	<0,0001	NS	<0,0001	NS	<0,003	<0,05

Resultados expresados como media  $\pm$  DE. NS = no significativo.  
<sup>a</sup>19 gemelares, 7 triples, 1 cuádruple.  
<sup>b</sup>6 gemelares, 1 triple.

**Tabla 2***Resultados del cultivo de los embriones sobrantes en función del embarazo*

Embarazo	Nº de ciclos	Edad	Nº de ovocitos extraídos	% dos pronúcleos	Nº de embriones transferidos	Nº de embriones implantados/nº de embriones transferidos (%)
Con formación de blastocisto	43	33,7±2,7	18,8±7,2	77,4 (417/539)	2,7±0,8	80/114 (70,2)
Sin formación de blastocisto	20	32,8±2,7	13,4±6,5	76,2 (125/164)	2,8±0,7	28/56 (50,5)
P		NS	<0,006	NS	NS	<0,01

Resultados expresados como media ± DE. NS = no significativo.

canzan el estadio de blastocisto exhibe un mayor número de ovocitos extraídos y embriones evolutivos, así como una mayor tasa de implantación y embarazo múltiple que el grupo sin formación de blastocistos. Estos resultados confirman los datos descritos previamente por otros autores (12-14). Además, cuando se analizan únicamente los embarazos, existe una mayor tasa de implantación en el grupo con formación de blastocistos. Por otra parte, detectamos una fuerte relación entre el número de células en día 3 y el posterior desarrollo in vitro hasta el estadio de blastocisto.

Según nuestros datos y de acuerdo con otros autores (15, 16), el número de células en día 3 puede tener un valor predictivo en relación con la formación de blastocistos in vitro. Los embriones en estadio de ocho células/compactación en día 3 muestran un mayor porcentaje de formación de blastocistos. Estas evidencias podrían sugerir la existencia de una población de embriones humanos de alta calidad que podrían mostrar una mejor capacidad de desarrollo en cultivo in vitro. Determinados embriones podrían ser capaces de implantar en un útero receptivo de acuerdo con un mejor programa de desarrollo intrínseco que podría predecirse en estadios tempranos del desarrollo in vitro. Para intentar explicar esta propiedad inherente al embrión podemos examinar los estados precedentes al desarrollo preimplantatorio centrandone nuestra atención en el ovocito competente para el desarrollo.

El concepto de competencia de desarrollo continúa siendo poco conocido y está relacionado con la maduración ovocitaria y, particularmente, con la maduración citoplásmica. Eppig y colaboradores (17) definieron la maduración citoplásmica como un proceso que prepara el ovocito para la activación, formación de pronúcleos, y desarrollo preimplantacional. De acuerdo con esta definición muchos autores (18-

22) explican que la correcta maduración citoplásmica da lugar a un ovocito competente para el desarrollo y capaz de producir una descendencia normal, viable y fértil después de la fecundación. Además, en los estadios finales de la diferenciación ovocitaria se adquieren las características funcionales para desarrollarse hasta blastocisto en cultivo in vitro.

Aparentemente el complejo proceso implicado en la maduración nuclear y citoplásmica del ovocito durante la ovogénesis podría regular el correcto desarrollo preimplantacional (23,24). La complejidad molecular de este control temprano del desarrollo ha sido revisado por numerosos autores (18, 21, 24-26). El control de la maduración nuclear está condicionado por factores extrínsecos como la estimulación con gonadotropinas que está implicada en la reanudación meiótica y la culminación de la maduración del ovocito (26, 27), la existencia de la proteína quinasa C dependiente de un umbral de AMPc que inicia una cascada de fosforilaciones la cual promueve la reanudación de la meiosis (20, 28, 29), la presencia de uniones gap heterólogas entre las células de granulosa y el ovocito como mediadoras de la transferencia de inductores de la reanudación meiótica (30, 31), y el papel especial del tamaño folículo/ovocito en el momento del nivel máximo de LH (21). Por otra parte, existen factores intrínsecos como el Factor Promotor de la Maduración (FPM) considerado como el factor clave regulador de la transición G2/M en células eucariotas. El FPM es una serina-treonina proteína quinasa con actividad H1 quinasa (32) regulada por reacciones de fosforilación/desfosforilación. El FPM se activa e inactiva a lo largo de la maduración ovocitaria, la activación del FPM induce la salida del estado de vesícula germinal (VG), la condensación cromosómica y la formación del huso durante la meiosis I. El FPM alcanza sus niveles máximos en

**Tabla 3***Tasa de formación de blastocistos en función del número de blastómeros 72 h post-punción folicular*

Nº de células a las 72 h post-punción folicular	Nº de embriones sobrantes en día 3 (%)	Nº de blastocistos (%)	Nº de blastocistos expandidos (%)
3	12 (2.8)	-	-
4	71 (16.6)	17 (23.9)	12 (16.9)
5	72 (16.9)	15 (20.8)	11 (15.3)
6	70 (16.4)	34 (48.6)	27 (38.6)
7	49 (11.5)	18 (36.7)	16 (32.7)
8	47 (11.0)	30 (63.8) <sup>b</sup>	29 (61.7) <sup>c</sup>
>8 (8-14)	18 (4.2)	9 (50.0)	6 (33.3)
Compactación	85 (20.0) <sup>a</sup>	42 (49.4)	34 (40.0)
Otros*	3 (0.7)	1 (33.3)	-
Total	427	166 (38.9)	135 (31.6)

\* Embriones con un número incontable de células debido a una elevada fragmentación.

<sup>a</sup>P<0,001 comparado con los grupos de 3, 7, 8, >8 células.

<sup>b</sup>P<0,01 comparado con los grupos de 4, 5, 7, >8 células.

<sup>c</sup>P<0,05 comparado con todos los grupos.

estadio de metafase II (MII) (33-35). La activación/inactivación del FPM durante la maduración del ovocito está estrechamente relacionada con la acción del proto-oncogen *c-mos* (MOS) y la proteína quinasa activada por agentes mitogénicos (MAPK). La oncoproteína de MOS es una serina-treonina proteína quinasa (p39<sup>mos</sup> o *c-mos*) y es la primera que se sintetiza por el ovocito detenido durante la meiosis con una VG intacta. *c-mos* está presente durante la maduración meiótica y en ovocitos no fecundados pero no se detecta en ovocitos en fase de crecimiento o en ovocitos fecundados. La literatura registra las funciones más representativas atribuidas a *c-mos* (21, 35-38). Está implicada en: (i) la fosforilación de la ciclina B y el mantenimiento de la estabilidad de las ciclinas y, consecuentemente, la regulación del FPM en *Xenopus laevis* (39), (ii) el mantenimiento de la detención en estadio de MII en ovocitos de ratón y *X. laevis* (40), (iii) la activación de la MAPK en ovocitos de ratón y *X. laevis* (41, 42), y (iv) el control de la correcta formación y morfología del huso acromático del correcto ensamblaje y morfología de los cromosomas de ovocitos de ratón (43).

Por otra parte, la maduración citoplásmica del ovocito ha sido estrechamente relacionada con la capacidad de desarrollo embrionario (18, 44). La maduración citoplásmica ha sido menos estudiada, no obstante existen una serie de cambios moleculares, bioquímicos y fisiológicos asociados como el desa-

rollo de la capacidad de descondensación de la cromatina espermática y liberación de gránulos corticales y Ca<sup>2+</sup> procedente de los almacenes intracelulares (17, 19, 45, 46). Recientemente, Cheung et al. (47) registraron que la capacidad para generar trasiegos de Ca<sup>2+</sup> en respuesta al espermatozoide aumentaba en las fases finales de la maduración ovocitaria y esto podría contribuir a la adquisición de la competencia de desarrollo y a la progresión a lo largo del primer ciclo celular en embriones de ratón.

En la actualidad y a pesar de las crecientes investigaciones sobre el conocimiento del mecanismo molecular implicado en la adquisición de la competencia de desarrollo no se conoce como el ovocito alcanza la competencia completa para desarrollarse en un embrión. Es posible que estos ovocitos competentes puedan dar lugar a una población especial de embriones con aptitudes inherentes para el desarrollo embrionario. Está ampliamente aceptado, desde el punto de vista genético, que los dos primeros ciclos de división celular de la embriogénesis temprana en humanos están regulados a nivel postraducciona por información heredada de la madre (48). El control de la transición madre/embrión parece estar regulado fundamentalmente por mecanismos dirigidos por componentes citoplásmicos sintetizados durante el crecimiento y maduración del ovocito (46). El ARNm materno permanece almacenado durante la maduración ovocitaria y experimenta un proceso de enmascaramiento

mediante poliadenilación citoplásmica. El acortamiento de la cola poli(A) enmascara el ARNm y produce una parada en la traducción, por el contrario la extensión de esta cola produce su activación (revisado: 23). La activación del genoma embrionario en humanos tiene lugar en los estadios de 4 a 8 células (48, 49). Durante la transición hacia la transcripción embrionaria existe un proceso gradual de degradación del ARNm materno. Durante este proceso, que es dependiente del tiempo, la síntesis de proteínas procedentes del ARNm materno continúa en las fases más tempranas de desarrollo embrionario (19). Si tenemos en cuenta estos argumentos, y de acuerdo con Fisch y colaboradores (14), la transferencia embrionaria tiene lugar cuando el potencial de desarrollo de los embriones es todavía ampliamente desconocido.

Desde un punto de vista práctico la transferencia de un gran número de embriones con una buena capacidad de desarrollo podría dar lugar a una tasa inaceptable de embarazos múltiples. La transferencia de blastocistos parece una alternativa válida permitiendo una mejor selección de los embriones a transferir de acuerdo con su evolución en cultivo *in vitro*. Es evidente que el desarrollo de los medios secuenciales para el cultivo de embriones humanos ha significado un gran avance en el campo de la FIV (50-54). Recientemente han aparecido un gran número de trabajos que señalan los beneficios de la transferencia de blastocistos: (i) una mayor tasa de embarazo e implantación en comparación con la transferencia de embriones tempranos (11, 51, 52, 55-57); (ii) representa un método no invasivo de seleccionar los embriones más viables para la transferencia ("autoselección") (58, 59); (iii) la transferencia de blastocistos ofrece una mayor sincronía con el ambiente uterino (60, 61); (iv) significa una reducción del número de embriones a transferir y, en consecuencia, de los embarazos múltiples (11, 52, 58, 62, 63); (v) puede evitar la herencia de errores del genoma paterno después de procedimientos de ICSI (64); y (vi) ofrece el marco temporal necesario para la realización de técnicas de diagnóstico genético preimplantacional (65). No obstante esta técnica no está extendida en los grupos de FIV debido fundamentalmente a la existencia de un miedo remanente a prolongar el cultivo *in vitro*. Según diferentes autores en el 40% de los casos ningún embrión alcanza el estadio de blastocisto (59, 66). La transferencia de embriones tempranos podría aumentar la tasa de éxito en estos casos. Además existe un debate acerca de la validez de esta técnica en pacientes no seleccionadas (15). Scholtes y Zeilmaker (55) en un estudio prospectivo y aleatorio registraron tasas similares de embarazo e implanta-

ción al comparar las transferencias de día 3 y día 5, y los mismos resultados han sido confirmados recientemente (67-70).

En nuestra experiencia el cultivo de embriones sobrantes nos ha resultado un sistema realmente válido para identificar un grupo especial de lo que podríamos llamar "pacientes de buen pronóstico" cuyos embriones han mostrado una cualidad inherente para progresar hasta estadios finales del desarrollo *in vitro* y se han relacionado con mayores tasas de implantación. Estos pacientes podrían derivarse a la transferencia de blastocistos para intentar reducir las altas tasas de embarazo múltiple. Además el cultivo de embriones sobrantes permite testar nuestro propio sistema de cultivo. No obstante, la transferencia de blastocistos debe ofrecerse con cautela. La existencia de blastocistos morfológicamente normales no implica necesariamente un desarrollo posterior normal. El desarrollo *in vitro* en si mismo altera la competencia de desarrollo tanto en el metabolismo temprano de los embriones como en su expresión génica (18). En este sentido y a pesar de que el desarrollo *in vitro* puede servir de filtro para aquellos embriones cromosómicamente anormales que se bloquean en estadios tempranos del cultivo, no existe una selección en contra de todas las anomalías (71). Una mejor adaptación de los medios de cultivo al metabolismo embrionario *in vitro* podría ayudarnos a una mejor selección y a decidir si la transferencia de blastocistos puede ser la técnica de primera elección en nuestro plan de trabajo rutinario.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Rijnders, P.M. and Jansen, C.A.M.:** The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod* 1998; 13, 2869-2873.
2. **Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN.:** Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertile Steril.* 1998; 70, 60-66.
3. **Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, and Lundin K.:** Human. Embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum. Reprod.* 2001; 16, 313-318.
4. **Tesarik J, and Greco E.:** The probability of abnormal

- preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.* 1999; 14, 1318-1323.
5. **Montang M and An der Ven:** Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod.* 2001; 16, 2384-2389.
  6. **Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, and Tews G.:** Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 2000; 15, 427-430.
  7. **Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D.:** Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997; 12, 1531-1536.
  8. **Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, and Campana A.:** Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum. Reprod.* 1998; 13, 182-187.
  9. **Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M.:** Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod.* 2002; 17, 407-412.
  10. **Racowsky C.:** High rates of embryonic loss, yet high incidence of multiple births in human art: is this paradoxical?. *Theriogenology.* 2002; 57, 87-96.
  11. **Schoolcraft W.B, Gardner D.K, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR.:** Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril.* 1999; 72, 604-609.
  12. **Sjögren A, Sjöblom P, Hamberger L.:** Culture of human spare preembryos: association between blastocyst formation and pregnancy. *J. Assist Reprod Genet.* 1992; 9, 41-44.
  13. **Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Nuhoglu A.:** Progression of excess embryos to the blastocyst stage predicts pregnancy and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998; 13, 2564-2567.
  14. **Fisch JD, Milki A.A, Behr B.:** 1999 Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40. *Fertil Steril.* 1999; 71, 750-752.
  15. **Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES.:** The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril.* 2000; 73, 558-564.
  16. **Shapiro BS; Harris DC, Richter KS.:** Predictive value of 72-hour blastomere cell number on blastocyst development and success of subsequent transfer based on the degree of blastocyst development. *Fertil Steril.* 2000; 73, 582-586.
  17. **Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F.:** Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994; 164, 1-9
  18. **Duranthon V; and Renard JP.:** The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology.* 2001; 55, 1227-1289.
  19. **Gandolfi B, and Gandolfi F.:** The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology.* 2001; 55, 1255-1276.
  20. **Guixue Z, Luciano A M, Coenen K, Gandolfi F, Sirard MA.:** The influence of AMPc before or during bovine oocyte maturation on embryonic developmental competence. *Theriogenology.* 2001; 55, 1733-1743.
  21. **Trounson A, Anderiesz C, Jones G.:** Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction.* 2001; 121, 51-75.
  22. **Sirard M.A.:** Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology.* 2001; 56, 1241-1254.
  23. **Gosden R.G.:** Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Hum Reprod.* 2002; 186, 149-153.
  24. **Amleh A. and Dean J.:** Mouse genetics provides insight into folliculogenesis, fertilization and early embryonic development. *Hum Reprod Update.* 2002; 8 395-403.
  25. **Trounson A, Anderiesz C, Jones G.M, Kausche A, Lolatgis N, Wood C.:** Oocyte maturation. *Hum Reprod.* 1998; 13, (Suppl 3) 52-75.
  26. **Schramm RD and Bavister BD.:** A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates. *Hum Reprod.* 1999; 14, 2544-2555.
  27. **Patsoula E, Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Bletsas R, Michalas S.:** Expression of mRNA for the LH and FSH receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction.* 2001; 121, 455-461.
  28. **Lu Q, Smith GD, Chen DY, Yang Z, Han ZM, Schatten H, Sun QY.:** Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is regulated by protein kinase C, cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, and protein phosphatase modulators during meiosis resumption in rat oocytes. *Biol Reprod.* 2001; 64, 1444-1450.
  29. **Lu Z, Xia G, Zhang J.:** Protein kinase C, rather than protein kinase A is involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of mouse cumulus cell enclosed oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. *Moll Cell Endocrinol.* 2001; 182, 225-232.

30. **Albertini D.F. and Carabatsos MJ.:** Comparative aspects of meiotic cell cycle control in mammals. *J Mol Med.* 1998; 76, 795-799.
31. **Carabatsos MJ, Sellitto C, Goodenough DA, Albertini D.F.:** Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol.* 2000; 226, 167-179
32. **Hunt T.:** Maturation promoting factor, cyclin and the control of M phase. *Curr Opin Cell Biol.* 1989; 1, 268-274.
33. **Mitra J and Schultz RM.:** Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *J Cell Science.* 1996; 109, 2407-2415.
34. **Vantéry C, Gavin AC, Vassalli J.D, Schorderet-Slatkine S.:** An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Dev Biol.* 1996; 174, 335-344.
35. **Nebreda A.R. and Ferby I.:** Regulation of the meiotic cell cycle in oocytes. *Cur Opin Cell Biol.* 2000; 12, 666-675.
36. **Wassarman PM and Albertini D.F.:** The mammalian ovum. In Knobil, E. and Neill, J.D. (eds). *The Physiology of Reproduction.* 1994, 2nd ed. of the Raven Press, New York, USA, pp. 79-122.
37. **Ferrell J.E.:** *Xenopus* oocyte maturation: new lessons from a good egg. *BioEssays.* 1999; 21, 833-842.
38. **Tachibana K, Tanaka D, Isobe T, Kishimoto T.:** *C-Mos* forces the mitotic cell cycle to undergo meiosis II to produce haploid gametes. *PNAS.* 2000; 97, 14301-14306.
39. **Frank-Vaillant M, Haccard O, Ozon R, Jessus C.:** Interplay between cdc2 kinase and the *c-Mos*/MAPK pathway between metaphase I and Metaphase II in *Xenopus* oocytes. *Dev Biol.* 2001; 231, 279-288.
40. **Dupre A, Jessus C, Ozon R, Haccard O.:** *Mos* is not required for the initiation of meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 2002; 21, 4026-4036.
41. **Verlhac MH, Lefebvre C, Kubiak JZ, Umbhauer M, Rassinier P, Colledge W, Maro B.:** *Mos* activates MAP kinase in mouse oocytes through two opposite pathways. *EMBO J.* 2000; 19, 6065-6074.
42. **Castro A, Peter M, Lorca T, Mandart E.:** *c-Mos* and cyclin B/cdc2 connections during *Xenopus* oocyte maturation. *Bioll Cell.* 2001; 93, 15-25.
43. **Verlhac M.H, Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Colledge W.H, Evans MJ, Maro B.:** *Mos* is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Developmet.* 1996; 122, 815-822.
44. **Dieleman SJ, Hendriksen PJ, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella B.M, et al.:** Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology.* 2002; 57, 5-20.
45. **Eppig J.J.:** Regulation of mammalian oocyte maturation. In Eli, Y., and Adashi, P. (eds) *The ovary.* 1993 Leung Raven Press, New York, USA, pp 185-208.
46. **Eppig, J.J.:** Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. *Reprod Fertil Dev.* 1996; 8, 485-489.
47. **Cheung A, Swann K, Carroll J.:** The ability to generate normal Ca<sup>2+</sup> transients in response to spermatozoa develops during the final stages of oocyte growth and maturation. *Hum Reprod.* 2000; 15, 1389-1395.
48. **Braude P, Bolton V, Moore S.:** Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature.* 1988; 332, 459-461.
49. **Telford NA., Watson AJ, Schultz GA.:** Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 1990; 26, 90-100.
50. **Gardner D.K.:** Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int.* 1994; 18, 1163-1179.
51. **Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.:** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1998; 13, 3434-3440.
52. **Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft W.B.:** Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril.* 1998; 69, 84-88.
53. **Behr B, Pool T.B, Milki AA, Moore D, Gebhardt J, Dasig D.:** Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod.* 1999; 14, 454-457.
54. **Jones GM, Trounson AO, Gardner DK, Kausche A, Lolatgis N, Wood C.:** Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Hum Reprod.* 1998; 13, 169-177.
55. **Scholtes MC. and Zeilmaker GH.:** A prospective, randomized study of embryo transfer results after 3 or 5 days of embryo culture in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996; 65, 1245-1248.
56. **Alves da Motta EL, Alegretti JR, Baracat E, Olive D, Serafin P.:** High implantation and pregnancy rates with transfer of human blastocysts developed in preimplantation stage one and blastocyst media. *Fertile Steril.* 1998; 70, 659-663.
57. **Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B.:** Comparison of blastocyst transfer with day 3

- embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril.* 2000; 73, 126-129.
58. **Jones GM. and Trounson A.O.:** Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. *Human Reprod.* 1999; 4, 1405-1408.
  59. **Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D.:** The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. *Hum. Reprod.* 1998; 13, 676-681.
  60. **Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J.:** Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertile Steril.* 1996; 65, 349-353.
  61. **Gardner DK, Lane M, Calderon I.:** Culture and selection of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF?. *Hum Reprod Update.* 1997; 3, 367-382.
  62. **Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB.:** Culture and transfer of viable blastocyst: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod.* 2000; 15, 9-23.
  63. **Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R.:** Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril.* 2002; 77, 693-6.
  64. **Sakkas D.:** The use of blastocyst culture to avoid inheritance of an abnormal paternal genome after ICSI. *Hum Reprod.* 1999; 14, 4-5.
  65. **Edwards R.G. and Hollands P.:** New advances in human embryology: implications of the preimplantation diagnosis of genetic disease. *Hum Reprod.* 1998; 3, 549-556.
  66. **Scholtes MC. and Zeilmaker G.H.:** Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertil Steril.* 1998; 69, 78-83.
  67. **Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K.:** Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod.* 2000; 15, 1947-1952.
  68. **Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters M.H.:** Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril.* 2000; 73, 117-122.
  69. **Alper MM, Brinsden P, Fischer R, Wikland M.:** To blastocyst or not to blastocyst? That is the question. *Hum Reprod.* 2001; 16, 617-619.
  70. **Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D.:** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002; 2, CD002118.
  71. **Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S.:** Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2001; 16, 1954-1958.