

Nuevos métodos de selección embrionaria: una nueva tendencia para transferencias únicas

New methods for embryo selection; towards single transfer

Javier Herrero¹, Alberto Tejera¹, M^a José de los Santos¹, Nicolás Garrido¹, Niels Ramsing² y Marcos Meseguer¹

¹Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, España.

²Fertilitech, Unisense, Ahrus, Dinamarca.

Resumen

Las transferencias únicas de embriones, la legislación restrictiva de algunos países tanto en términos de fecundación como de criopreservación embrionaria y sobre todo la mejora de las tasas de implantación, están promoviendo el desarrollo de nuevas técnicas no invasivas para seleccionar ovocitos y embriones más eficazmente que mediante el mero criterio morfológico.

Por ello pretendemos revisar la utilidad de marcadores de calidad embrionaria y ovocitaria tales como el consumo de oxígeno y la cinética de división embrionaria, mediante un sistema automatizado. Evaluamos los estudios prospectivos de carácter observacional realizados hasta el momento. En ellos se han analizado las tasas de respiración ovocitaria y embrionaria y los tiempos de división en relación con la calidad embrionaria.

El uso de estos indicadores proporcionaría un método cuantitativo y objetivo de valoración de calidad ovocitaria y embrionaria sustituyendo los métodos de clasificación morfológicos subjetivos por un sistema automatizado que combina morfología, cinética de división y respiración.

La implementación de esta nueva tecnología nos permitirá mejorar las tasas de implantación embrionaria gracias a la disminución de la manipulación de los embriones y de la alteración de las condiciones de cultivo in vitro. Además el nuevo método para la mejora de la selección podría aumentar las probabilidades de éxito de estos embriones.

Palabras clave: Embrión. Ovocito. Implantación. Respiración embrionaria. División embrionaria.

Summary

Oxygen consumption measurements from oocytes and embryos together with the assessment of the kinetics of embryo division could be applied routinely in the clinical embryology laboratory in order to

Correspondencia: Dr. D. Javier Herrero
Instituto Valenciano de Infertilidad
Plaza de la Policía Local, 3
46015 Valencia - España
e-mail; marcos.meseguer@ivi.es

AYUDA: CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) y EUREKA 4503 (Unión Europea).

assess embryo quality, replacing the classical microscope based methods to select embryos. The use of this automated research instrument with programmable measurement cycles for unattended operation, would allow data to be collated on respiration rates of single embryos during development as well as taking measurements of embryonic development by analysing time-lapse images in real time to quantify the timing of cell division.

The studies here reviewed are based in a prospective cohort observational studies in which has been measured the oocyte and embryonic respiration rates averages. Also the timing of the embryo divisions these values were correlated with embryos quality.

Once these parameters will be determined as appropriated we will be able to introduce a novel quantitative method to measure oocyte quality (actually this determination is based in subjective morphological features). Also we will be able to substitute the standard procedures to select embryos for transference following exclusively morphological criteria by those automatic which combine morphology, division kinetic and respirometry.

By doing this studies we could be able to improve implantation rates in future studies because by using this technology we will decreased embryo manipulation (strictly necessary for the standard procedures) which considerably alters in vitro culture conditions. Also the future application of a new embryo selection method could increase chances of implantation success.

Key words: Embryo. Implantation. Respiration. Cleavage. Timing.

INTRODUCCIÓN

Con el creciente uso de las técnicas de reproducción asistida, el número de niños concebidos por fecundación in vitro (FIV) está aumentando paulatinamente en todo el mundo y en la actualidad representa entre el 2 y el 4% de los nacimientos anuales, incremento asociado a una elevada tasa de embarazos múltiples. En la última década, la reducción en el número de embriones transferidos ha conseguido descender el número de estos embarazos, pero todavía tienen lugar un elevado porcentaje de gestaciones gemelares (1), lo que conlleva altos riesgos para la salud tanto de la madre como de los fetos, incluyendo parto prematuro, bajo peso del recién nacido, mortalidad perinatal y otras complicaciones obstétricas (2). Por consiguiente, el compromiso de mejorar las tasas de embarazo a través de técnicas de fecundación in vitro debería encaminarse a la transferencia embrionaria única con garantías de éxito.

Con el objetivo de elegir el embrión óptimo para la transferencia única, las pruebas de diagnóstico cromosómico o genético preimplantacional (DGP) mediante hibridación in situ fluorescente han cobrado gran importancia (3). Los problemas que se plantean son que las indicaciones de estos análisis son bastante restrictivas y existe cierta controversia en la literatura sobre su eficacia y beneficios. Algunos artículos argumentan que el empleo de estas técnicas en ciertos tipos de pacientes no mejora las tasas de gestación (4,5). Otros incluso encuentran que en pacientes de

edad avanzada no sólo no se benefician del uso del DGP, sino que empeoran sus tasas de gestación (6,7).

De manera rutinaria, la selección embrionaria se basa en criterios morfológicos subjetivos, generalmente insuficientes y que requieren un largo proceso de formación del personal. El mencionado objetivo de conseguir transferencias únicas de embriones, las legislaciones restrictivas de algunos países (tanto en términos de fecundación como de criopreservación embrionaria) y, sobretodo, la mejora de las tasas de implantación precisan el desarrollo de nuevas técnicas para seleccionar ovocitos, cigotos y embriones de manera más efectiva que el mera clasificación morfológica.

Los principales marcadores morfológicos de calidad ovocitaria usados hasta la fecha han sido la evaluación de la morfología del ovocito propiamente dicha (8), de la zona pelúcida, del corpúsculo polar (9,10), del huso meiótico (11,12) y de la viscosidad citoplasmática (9). A nivel cigótico se han analizado la morfología y posición de los pronúcleos, el número, tamaño y posición de precursores nucleolares (13,14), la orientación de los corpúsculos polares respecto a los pronúcleos (15,16) y la presencia del halo citoplasmático (9,17). Con respecto a las blastómeras del embrión los parámetros considerados son su número (9,18), el porcentaje y tipo de fragmentación, el tamaño y simetría (19), la apariencia del citoplasma, la compactación, la multinucleación, el ritmo de división y el contacto entre ellas (18).

Entre los métodos de análisis de la calidad embrionaria no morfológicos se encuentra el grupo de

las ómicas (transcriptómica, proteómica y metabolómica) que han mostrado evidencias de que los gametos y embriones viables poseen un perfil molecular único que puede ser usado para selección de embriones en términos de desarrollo y viabilidad (20).

También dentro del grupo de parámetros no morfológicos se incluye el análisis del estrés oxidativo en el líquido folicular (21), el consumo de aminoácidos en el medio de cultivo, la evaluación de la actividad metabólica embrionaria (consumo/aparición de glucosa, piruvato y lactato), el uso de la luz polarizada para visualización del huso y membranas de la zona pelúcida, el HLA-G como marcador del potencial embrionario (22) y la cuantificación de los niveles del factor de activación plaquetario (PAF) en el medio de cultivo (23).

Desafortunadamente hasta la fecha ninguno de estos métodos ha sido lo suficientemente eficaz para evaluar el potencial de implantación de un ovocito/embrión por lo que nos vemos obligados a seguir trabajando e investigando para desarrollar nuevos procedimientos no invasivos capaces de monitorizar parámetros fisiológicos de los embriones para mejorar la evaluación y posterior selección embrionaria para la transferencia.

Estudio de la respiración celular

Las mediciones de la actividad metabólica de ovocitos y embriones están presentándose como buenos predictores de la calidad y desarrollo embrionario. Algunas de estas medidas se desarrollaron para calcular el consumo o liberación de hormonas, factores de crecimiento, citokinas y otros substratos energéticos como la glucosa, el lactato y el piruvato (24). Dentro del metabolismo embrionario, el consumo de oxígeno ha sido considerado como el mejor indicador de actividad metabólica ya que está directamente relacionado con la capacidad del embrión para producir ATP. Dicho proceso se realiza a través de la fosforilación oxidativa, que representa el 30% del consumo de oxígeno en los embriones en división y entorno a un 60-70% en los blastocistos (25).

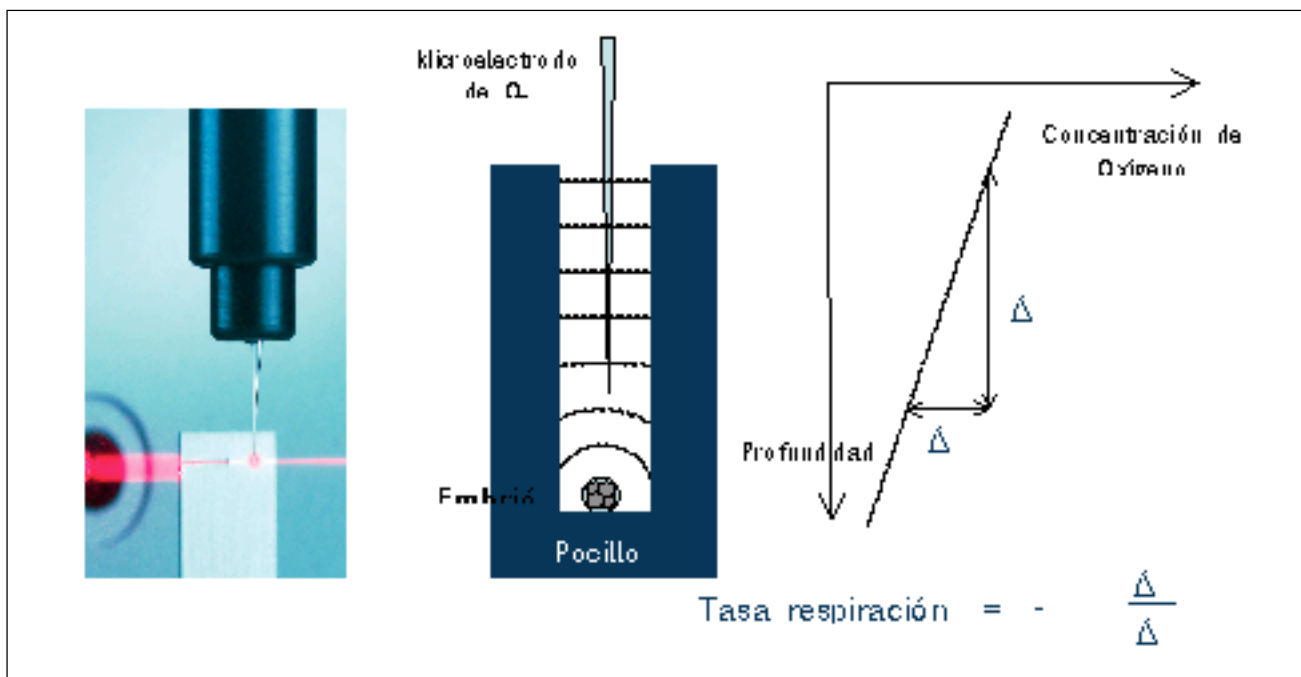
Ya han pasado más de 60 años desde las primeras mediciones de oxígeno en ovocitos y embriones de mamífero (26). Los estudios iniciales demostraron mediante técnicas de buceo cartesiano que los blastocistos consumían más oxígeno que los embriones en división y que el cambio en la concentración de substratos metabólicos en el medio de cultivo alteraba la cantidad de oxígeno consumido por los mismos (27). Los siguientes estudios emplearon técnicas de microespectrofotometría para analizar cambios en la oxihemoglobina extracelular como consecuencia del consumo de oxígeno por los embriones (28,29). Los electrodos estacionarios de oxígeno en estado sólido también han sido empleados tanto para grupos de embriones como para embriones individuales.

Magnusson et al. publicaron en humanos mediante métodos espectrofotométricos (28) que los embriones que consumían más oxígeno se desarrollaban a blastocisto y tenían mayores tasas de supervivencia que aquellos que consumían menos oxígeno, aunque estos resultados no han sido posteriormente confirmados. Usando también electrodos de oxígeno, Benos y Balaban (30) determinaron que la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS, de sus siglas en inglés) representa entre el 50 y el 70% del oxígeno consumido por los blastocistos para generar ATP por la ATPasa Na/K de membrana plasmática. Manes y Lai (31) demostraron que una porción del oxígeno total consumido por los embriones no fue invertido en OXPHOS sino en otras oxigenasas. Posteriormente, Houghton et al. (32) desarrollaron una técnica ultrafluorescente para medir el consumo de oxígeno planteando la relación entre los metabolitos del medio y el consumo de oxígeno por los embriones (25).

James R. Trimarchi et al midieron tasas de consumo de oxígeno con electrodos en embriones de ratón. Observaron que los blastocistos consumían $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$ de oxígeno, mientras que los embriones en estadios tempranos sólo $0.3 \pm 0.1 \mu\text{M}$, lo que supone un incremento de dos veces en el consumo de oxígeno durante el estadio de blastocisto. Demostraron que el oxígeno consumido por embriones en estadio de una célula podía modularse por la ausencia de piruvato del medio de cultivo y que el tratamiento con diamida, un agente inductor de muerte celular, resultó en una reducción del consumo de oxígeno. De este modo el gradiente de oxígeno que rodeaba a los embriones muertos no variaba a diferencia del que rodeaba a los embriones control (no tratados) (623 Trimarchi, J.R. 2000; } }.

El grupo de Lopes fueron los primeros que validaron un sistema de medición de respiración embrionaria (Nanorespirometer system) (Figura 1) con el que midieron las tasas de respiración de embriones bovinos en diferentes tiempos, sin verse afectado su desarrollo embrionario (33).

A su vez, basado en la misma tecnología, también validaron el Embryo Respirometer, que mide la tasa de respiración embrionaria de forma individual e incorpora un sistema de análisis de imagen. El objetivo era usar la respiración embrionaria como una posible herramienta para mejorar la selección, y para ello buscaron posibles correlaciones entre tasas de respi-



Figural

Estudio de la respiración embrionaria mediante microsensors de oxígeno. A la izquierda, fotografía de un microsensor de oxígeno. El embrión es situado en pocillos con medio de cultivo estándar. El oxígeno llega al embrión por difusión por el propio medio de las capas superiores en contacto con el aceite mineral. A medida que el embrión consume oxígeno la concentración se reduce desde la base (donde está el embrión) hacia la superficie y este gradiente lineal es valorado por el microsensor. Las mediciones de oxígeno se tomarán en intervalos de 30 minutos durante el periodo de cultivo obteniendo una información puntual que se expresa en nanolitros/hora.

ración y calidad morfológica, sexo, estadio de desarrollo cinético, diámetro del embrión y la expresión de ciertos genes (33).

Los datos obtenidos mostraban que las tasas de respiración de los embriones producidos in vivo aumentaron de forma directamente proporcional a la calidad morfológica y estadio de desarrollo ($p < 0.05$). La tasa media de respiración no varió significativamente entre los embriones que dieron lugar a embarazo y los que no, pero la transferencia de embriones con tasas de respiración menor de 0.78 nl/h, entre 0.78 y 1.10 nl/h y mayor de 1.10 nl/h resultó en un 48, 100 y 25 % de tasa de embarazo, respectivamente. La tasa media de respiración de embriones producidos in vitro fue mayor que la de los producidos in vivo asociado a diferencias en la calidad morfológica y el estado de desarrollo (33).

En bovinos este mismo grupo investigó la posible relación entre el consumo de oxígeno y la expresión de ciertos genes. En el estadio de blastocisto, el ATP se produce por glicolisis y fosforilación oxidativa, procesos que requieren consumo de oxígeno y gluco-

sa, regulado por la expresión de GLUT1 y G6PD. Los niveles de expresión de GLUT1 y G6PD se vieron afectados por la calidad morfológica y el estadio de desarrollo. La expresión de mRNAs de GLUT1 y G6PD se correlacionó con las tasas de respiración, indicando que en blastocistos metabólicamente activos, los consumos de oxígeno y glucosa están aumentados (34).

Tasas de división como parámetro de calidad embrionaria

Un indicador de calidad embrionaria que puede ser fácilmente determinado es la tasa de división embrionaria, estando el número de células existentes en días 2 y 3 de evolución correlacionado con las tasas de implantación y embarazo (35).

Las razones por las que existen variaciones en el momento de la primera división embrionaria no están claras, podría estar relacionado con condiciones de cultivo y algunos factores intrínsecos del ovocito y/o espermatozoide tales como la maduración citoplas-

mática, la capacidad de cada espermatozoide para provocar la entrada Ca^{+2} , el efecto paterno sobre la duración de la fase S o anomalías cromosómicas.

La división temprana embrionaria ha sido definida como aquella que se produce a las 25-27 horas post-ICSI dando lugar a un embrión de dos células (35). El fenómeno de la división temprana y su impacto en la tasa de gestación en humanos fue publicado por primera vez en 1984 por el grupo de Edwards (36).

Diversos autores afirman que la transferencia de embriones con división temprana aumenta las tasas de implantación y embarazo pero en la mayoría de los casos no se realizaron transferencias puras de embriones con este patrón de división, por lo que los resultados no son concluyentes (1,35).

Algunos estudios han mostrado diferencias significativas en el número de células y la morfología embrionaria el día de la transferencia entre embriones con división temprana y división tardía (1,35).

El grupo de Van Montfort et al. realizó un estudio en el que analizó 253 transferencias dobles y 165 transferencias únicas, comparando transferencias puras de embriones con división temprana con transferencias puras de embriones con división tardía. Observaron que existían significativamente mayores tasas de gestación en el grupo de división temprana tanto en transferencias únicas como en dobles. La tasa de formación de blastocisto para los embriones con este perfil de división también aumentó y por el con-

trario, la de aborto se redujo comparado con el grupo control (37).

Estos resultados coinciden en parte con los observados por Salumets et al. que también encontraron mayores tasas de gestación en las transferencias únicas de embriones de división temprana comparado con los de división tardía. La mayoría de embriones con división temprana tuvieron 4 ó más blastómeras en día 2, y presentaban menor fragmentación que el grupo de división tardía. Además los embriones de división temprana tenían significativamente blastómeras más simétricas que los de división tardía. Independientemente de la simetría, el grupo de división temprana siempre generaba mayor tasa de gestación, ya que embriones asimétricos tempranos tenían mayor tasa de embarazo que los asimétricos con división tardía (17).

Cronología de la división embrionaria mediante captura de imágenes seriadas

Con el objetivo de monitorizar la división embrionaria, la tecnología del time-lapse permite la captura de imágenes digitales en intervalos de tiempo preprogramados (Figura 2). Las imágenes son sometidas a un análisis cuantitativo basado en algoritmos, de esta manera se consiguen detectar el tiempo y la duración de las divisiones embrionarias.

El grupo de Lemen validó esta técnica de imagen

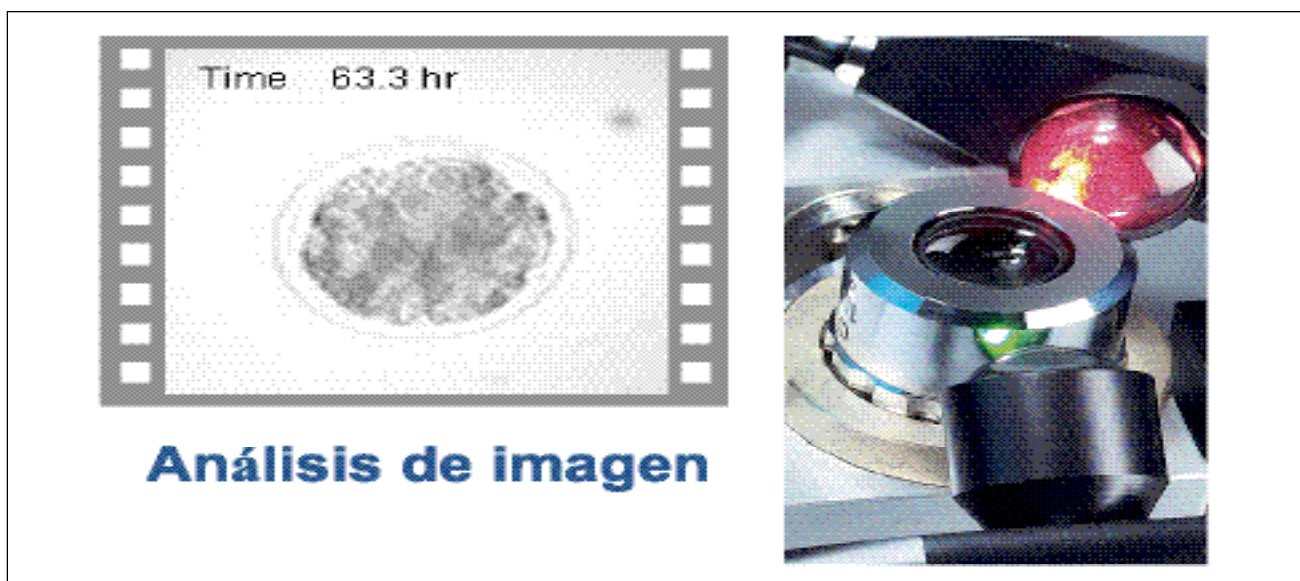


Figura2

Se pueden realizar capturas digitales de imágenes a embriones individuales en intervalos de tiempo preprogramados. Las imágenes son capturadas con una cámara monocromática. De esta manera se consiguen detectar los tiempos de las divisiones embrionarias.

para estudiar el tiempo y la coordinación de los eventos durante el desarrollo de cigoto (día 1) a embrión en día 2 e identificar marcadores de calidad embrionaria e implantación. Los parámetros analizados fueron la aparición-desaparición de los pronúcleos y el momento y sincronía de la primera división celular. Observaron que los embriones provenientes de ICSI permanecían en el estadio de 2 células menos tiempo que los fecundados por FIV, aunque esto podría explicarse por la incertidumbre sobre el momento exacto de la fecundación en la FIV convencional. Por otro lado, encontraron una correlación positiva entre la desaparición temprana de los pronúcleos e inicio de la primera división y el número de blastómeras en día 2. Además, la sincronía en la aparición de los núcleos tras la primera división fue asociada con una mayor tasa de embarazo (38).

El grupo de K.Lundin (35) realizó un estudio prospectivo en 10798 embriones para analizar si el momento de la primera división tenía influencia sobre la calidad embrionaria y las tasas de embarazo, implantación y/o RNV (recién nacido vivo), excluyendo del estudio las transferencias mixtas (embriones de división temprana junto con embriones de división tardía). Analizaron la correlación morfología embrionaria-división temprana y vieron que había un alto porcentaje de embriones de buena calidad comparado con los de división tardía. El grupo con división temprana tenía una mayor proporción de embriones de buena calidad en día 2. También obtuvieron mayores tasas de embarazo por transfer, implantación y nacimiento por embarazo en curso. Cuando analizaron todas las transferencias, la calidad embrionaria y la edad de las pacientes fueron factores predictivos por sí solos de embarazo, mientras que la división temprana o tardía no. Curiosamente, analizando por separado los embriones provenientes de ICSI vieron que la división temprana sí tenía valor predictivo por sí sólo de gestación a término. También midieron el tiempo de división temprana en función del estado pronuclear del cigoto, viendo que sólo el 12% de los cigotos anormales (polispermia) se dividieron tempranamente frente a los 26,9% de los correctamente fecundados. Coincidiendo con estos resultados, el grupo de Hardarson analizó la relación entre asimetría de las blastómeras y aneuploidía de embriones. Vieron que los embriones aneuploides tienen blastómeras más asimétricas y menores tasas de división temprana y embarazo. La mayoría de los embriones con división temprana presentaban mayor simetría embrionaria. Además embriones con mayor asimetría tenían significativamente mayor porcentaje de aneu-

ploidías (para los cromosomas 13,18,21,X,Y) comparado con aquellos más simétricos (39).

Otros autores han observado en bovinos que la probabilidad de que un embrión procedente de división temprana alcance el estadio de blastocisto duplica a la de un embrión de división tardía. Si bien es cierto que el hecho de tener división temprana no implica un posterior patrón de división óptimo en todos los casos, todos los embriones con un patrón completo de división óptima sí que procedían de cigotos con división temprana (40).

La Tecnología del Embryoscope

El Embryoscope (®) es una nueva tecnología basada en los incubadores convencionales que se utilizan en el laboratorio de embriología clínica mejorado con un sistema de captura de imágenes (Figuras 3 y 4) y un sensor del consumo de oxígeno en el medio de cultivo de los embriones por lo que no es una técnica invasiva. Así, sin alterar la rutina del laboratorio se obtiene información adicional de los embriones mientras estos están en cultivo para la posterior selección de los embriones a transferir en 48, 72, 120 ó 144 horas después de la fecundación in vitro.

La nueva tecnología desarrollada se basa en la utilización de microsensores de oxígeno que calculan su consumo durante el desarrollo embrionario. A cada embrión le rodea un gradiente de oxígeno disuelto en el medio generado por el consumo del mismo y éste puede ser detectado a 50µm del embrión. El electrodo mide estos y puede caracterizar los cambios y las tasas de consumo durante el desarrollo. Complementando estas mediciones adquiere y analiza imágenes en tiempo real para registrar puntos importantes del desarrollo embrionario como pueden ser la aparición y desaparición de pronúcleos o las divisiones embrionarias.

Pero, ¿por qué analizar un parámetro metabólico como la respiración mitocondrial? La función mitocondrial es la clave para la fecundación y desarrollo, dado que son las generadoras de energía, y también contribuyen en aspectos como la homeostasis del calcio, esencial para el desarrollo y el suministro de metabolitos durante la generación de energía (41). La activación de estas mitocondrias en la fecundación es fundamental para todo el desarrollo posterior, y probablemente también contribuye a la calidad embrionaria y todos sus parámetros cuantificables (13).

Hasta la fecha, no se han usado parámetros de calidad ovocitarios en la selección embrionaria ya que la mayoría de las técnicas probadas no han mostrado correlaciones de peso entre ovocitos y embriones ge-

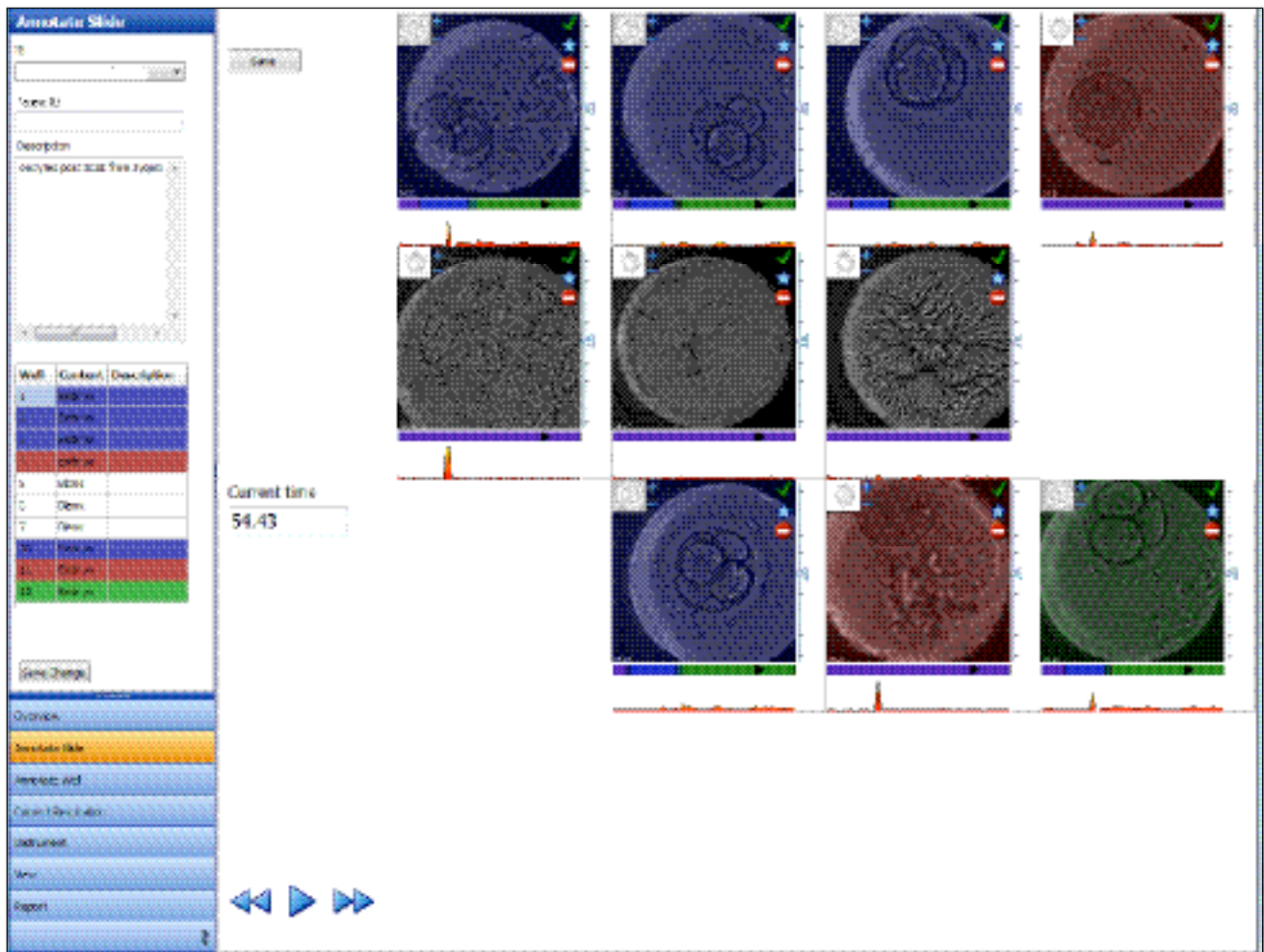


Figura3

Fotografía del visor del Embryoscope (r) con el que se puede visualizar a la vez a todos los embriones en tiempo real. El sistema permite clasificar una vez acabado el ciclo de la paciente a los embriones en transferidos (color verde), congelados (color azul) y no viables (color rojo) para facilitar posteriores análisis. Los pocillos en la línea central están vacíos y actúan como blancos.

nerados a partir de éstos. El uso de alguna forma de marcador ovocitario, morfológico o metabólico, requerirá estudios prospectivos estrictamente controlados en los que la contribución del gameto masculino no interfiera en el análisis. Por otro lado, se requerirá un elevado número de ovocitos para su validación (13).

Considerando el vital papel de la mitocondria en la competencia ovocitaria y su posterior desarrollo, medir un aspecto de la función mitocondrial, la respiración (fosforilación oxidativa), puede ser indicativo del número y la activación de estos orgánulos, lo que podría traducirse en una manera de seleccionar ovocitos con mayor potencial de desarrollo embrionario.

La selección ovocitaria, además, tiene la ventaja de

minimizar el número de embriones generados por ciclo, una fuente de dilemas morales en muchas partes del mundo. También podría ser de gran ayuda en la criopreservación de ovocitos, y podría usarse en países con fuertes restricciones en el número de ovocitos que se permite fecundar, cultivar o transferir. También puede llegar a ser un método de investigación del potencial desarrollo de ovocitos madurados in vitro, y mejorar los sistemas y protocolos de maduración.

L.Scott publicó un trabajo donde hizo la primera aproximación con material humano usando el Embryoscope. Usó ovocitos inmaduros (VG o MI) y maduros (MII) que provenían de fallos de fecundación. Encontraron diferencias en las tasas de respira-

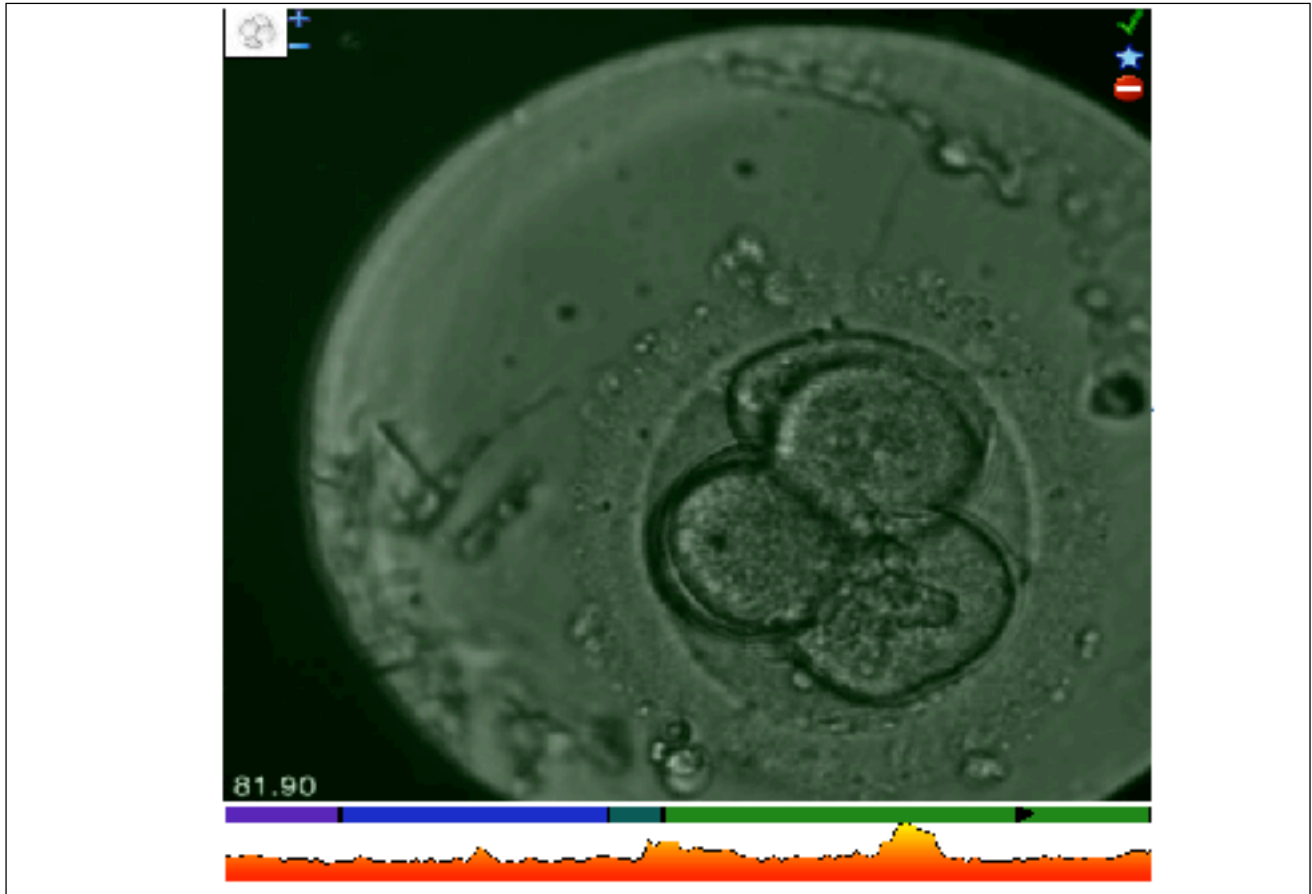


Figura 4

Imagen ampliada de un embrión en su pocillo correspondiente. La consecución de todas las imágenes seriadas capturadas permite visualizar el desarrollo del embrión en forma de video. La gráfica inferior representa los momentos de división del embrión calculada en función de los movimientos del mismo.

ción entre los diferentes estadios de la meiosis y de diferentes patologías asociadas a la infertilidad femenina. Estos estudios son la única aportación en humanos y evidencian importantes diferencias en los patrones de respiración asociadas a la edad y niveles de hormona foliculo estimulante (FSH), es decir, asociados a situaciones clínicas claramente relacionadas con mala calidad ovocitaria (13).

El conjunto de estos dos sistemas reunidos en un mismo aparato genera unas determinaciones únicas que combinan la actividad metabólica con el tiempo y la duración de las divisiones embrionarias.

CONCLUSIONES

A la vista de los estudios descritos parece claro que el uso de marcadores del metabolismo ovocitario/embrionario, tales como la respiración, en combi-

nación con otros marcadores clásicos como la morfología, podría ofrecernos información precisa y objetiva a la hora de elegir el embrión óptimo para la transferencia.

Las nuevas tecnologías, basadas en mediciones de tasas de respiración y análisis de imagen no afectan al desarrollo embrionario.

Existe correlación entre el consumo de oxígeno y el estadio de desarrollo, siendo éste mayor en embriones más desarrollados. A su vez, la respiración también puede estar relacionada con otros parámetros embrionarios asociados a calidad embrionaria.

La división temprana es un fuerte indicador biológico de potencial embrionario, observando que los embriones con este patrón de división presentan mejor calidad embrionaria, tasa de implantación y gestación a término.

El análisis de la calidad ovocitaria mediante las

técnicas citadas se presenta como un método alentador en la selección embrionaria

Harán falta más estudios prospectivos con un tamaño muestral adecuado y en material humano no descartado para validar estos métodos como predictivos de calidad/viabilidad embrionaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Sakkas D, Gardner DK.**: Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr.Opin.Obstet.Gynecol.* 2005 Jun;17(3):283-288.
2. **Pinborg A.**: IVF/ICSI twin pregnancies: risks and prevention. *Hum.Reprod.Update* 2005 Nov-Dec;11(6):575-593.
3. **Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S.**: Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil.Steril.* 2009 Jul;92(1):157-162.
4. **Staessen C, Verpoest W, Donoso P, Haentjens P, Van der Elst J, Liebaers I, et al.**: Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum.Reprod.* 2008 Dec;23(12):2818-2825.
5. **Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, et al.**: Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil.Steril.* 2009 Feb 25.
6. **Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al.**: In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N.Engl.J.Med.* 2007 Jul 5;357(1):9-17.
7. **Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjo T, Nilsson L, Stevic J, et al.**: Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum.Reprod.* 2008 Dec;23(12):2806-2812.
8. **Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, et al.**: The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum.Reprod.* 2001 Nov;16(11):2357-2361.
9. **Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G.**: Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil.Steril.* 1999 Oct;72(4):599-603.
10. **Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, et al.**: Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? *Reprod. Biomed. Online* 2003 Oct;7(3):336-341.
11. **Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, et al.**: Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum.Reprod.* 2004 Mar;19(3):649-654.
12. **Konc J, Kanyo K, Cseh S.**: Visualization and examination of the meiotic spindle in human oocytes with polscope. *J.Assist.Reprod.Genet.* 2004 Oct;21(10):349-353.
13. **Scott L.**: The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum.Reprod.Update* 2003 May-Jun;9(3):237-249.
14. **Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simon C, Remohi J, et al.**: The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum.Reprod.* 2003 Nov;18(11):2413-2419.
15. **Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, et al.**: Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in-vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Hum.Reprod.* 1999 Oct;14(10):2588-2595.
16. **Kattera S, Chen C.**: Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum.Reprod.* 2004 Feb;19(2):294-299.
17. **Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T.**: The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum.Reprod.* 2001 Oct;16(10):2177-2181.
18. **Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J.**: Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. *Hum.Reprod.* 2000 Dec;15(12):2634-2643.
19. **Munne S, Cohen J.**: Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum.Reprod.Update* 1998 Nov-Dec;4(6):842-855.
20. **Katz-Jaffe MG, McReynolds S, Gardner DK, Schoolcraft WB.**: The role of proteomics in defining the human embryonic secretome. *Mol.Hum.Reprod.* 2009 May;15(5):271-277.
21. **Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, et al.**: The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *Int.J.Fertil.Womens Med.* 2000 Sep-Oct;45(5):314-320.
22. **Noci I, Fuzzi B, Rizzo R, Melchiorri L, Criscuoli L, Dabizzi S, et al.**: Embryonic soluble HLA-G as a marker of developmental potential in embryos. *Hum.Reprod.* 2005 Jan;20(1):138-146.
23. **Roudebush WE.**: Role of platelet-activating factor in

- reproduction: sperm function. *Asian J.Androl.* 2001 Jun;3(2):81-85.
24. **Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, et al.:** Non-invasive amino acid turn over predicts human embryo developmental capacity. *Hum.Reprod.* 2002 Apr;17(4):999-1005.
 25. **Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL.:** Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol.Reprod.* 2000 Jun;62(6):1866-1874.
 26. **Boell EJ, Nicholas JS.:** Respiratory metabolism of the mammalian egg. *J.Exp.Zool.* 1948 Nov;109(2):267-281.
 27. **Fridhandler L, Hafez ES, Pincus G.:** Developmental changes in the respiratory activity of rabbit ova. *Exp.Cell Res.* 1957 Aug;13(1):132-139.
 28. **Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L, Nilsson L.:** Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum.Reprod.* 1986 Apr;1(3):183-184.
 29. **Nilsson BO, Magnusson C, Widehn S, Hillensjo T.:** Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocysts. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1982 Oct;71:75-82.
 30. **Benos DJ, Balaban RS.:** Energy requirements of the developing mammalian blastocyst for active ion transport. *Biol.Reprod.* 1980 Dec;23(5):941-947.
 31. **Manes C, Lai NC.:** Nonmitochondrial oxygen utilization by rabbit blastocysts and surface production of superoxide radicals. *J.Reprod.Fertil.* 1995 May; 104(1):69-75.
 32. **Houghton FD, Thompson JG, Kennedy CJ, Leese HJ.:** Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Mol.Reprod.Dev.* 1996 Aug;44(4):476-485.
 33. **Lopes AS, Madsen SE, Ramsing NB, Lovendahl P, Greve T, Callesen H.:** Investigation of respiration of individual bovine embryos produced in vivo and in vitro and correlation with viability following transfer. *Hum.Reprod.* 2007 Feb;22(2):558-566.
 34. **Lopes AS, Wrenzycki C, Ramsing NB, Herrmann D, Niemann H, Lovendahl P, et al.:** Respiration rates correlate with mRNA expression of G6PD and GLUT1 genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. *Theriogenology* 2007 Jul 15;68(2):223-236.
 35. **Lundin K, Bergh C, Hardarson T.:** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum.Reprod.* 2001 Dec;16(12):2652-2657.
 36. **Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al.:** Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J.In.Vitro.Fert.Embryo.Transf.* 1984 Mar;1(1):3-23.
 37. **Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL.:** Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum.Reprod.* 2004 Sep;19(9):2103-2108.
 38. **Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S.:** Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod.Biomed.Online* 2008 Sep;17(3):385-391.
 39. **Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K.:** Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum.Reprod.* 2001 Feb;16(2):313-318.
 40. **van Soom A, Ysebaert MT, de Kruif A.:** Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol.Reprod.Dev.* 1997 May;47(1):47-56.
 41. **Van Blerkom J.:** Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction* 2004 Sep;128(3):269-280.