



**TRABAJO DE FIN DE MASTER EN**  
**Biología y Tecnología Aplicadas a la**  
**Reproducción Humana Asistida**

**EFECTO DEL TABACO EN LA CALIDAD**  
**FOLICULAR Y VIABILIDAD OVOCITARIA**  
**DE FUTURAS DONANTES**

Autora: Eva Muñoz Ruiz

Tutor: David Agudo Garcillán

Alcobendas, Septiembre 2023

## **TABLA DE CONTENIDOS**

<b>RESUMEN</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>Antecedentes</b> .....	
<b>Reproducción Humana Asistida</b> .....	
<b>Infertilidad Femenina</b> .....	
<b>Pruebas de Fertilidad y causas</b> .....	
<b>Calidad ovocitaria y embrionaria</b> .....	
<b>Donación de ovocitos</b> .....	
<b>Clasificación embrionaria</b> .....	
<b>Time-lapse</b> .....	
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>Tipo de estudio</b> .....	
<b>Diseño de revisión</b> .....	
<b>Base de datos</b> .....	
<b>Criterios de selección</b> .....	
<b>Criterios de inclusión y exclusión</b> .....	
<b>EmbryoScope</b> .....	
<b>Recolección de datos</b> .....	
<b>Estadística</b> .....	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>19</b>
<b>Parámetros</b> .....	
<b>Embriones viables</b> .....	
<b>Tasas de implantación</b> .....	
<b>Tasa de recién nacido vivo</b> .....	
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>33</b>

## RESUMEN

La reproducción humana asistida está teniendo un gran impacto en la sociedad a nivel mundial, ofreciendo opciones de concebir un recién nacido vivo (RNV) y formar una familia a personas que se enfrentan a diferentes tipos de obstáculos, entre ellos la infertilidad femenina. Un tratamiento de reproducción asistida (TRA) tiene como objetivo buscar de la manera más natural posible ayudar a los pacientes que acuden a la clínica a conseguir una gestación positiva, es decir, la posibilidad de formar una familia. Las razones de acudir a una clínica de fertilidad pueden ser por un problema de la mujer o del hombre, por lo que ambos se someten a diferentes pruebas para descubrir cual es la razón por la que no pueden concebir descendencia de manera natural. En base a los resultados obtenidos, el médico decide que tratamiento es mejor para la pareja y se comienza el ciclo. Puede ser que estos tratamientos tengan éxito y permitan a la pareja concebir, pero no siempre se logran resultados positivos y por factores como puede ser la calidad de los ovocitos de la mujer, receptividad endometrial, calidad del esperma, el tratamiento no tiene éxito. Un tratamiento de reproducción asistida es muy complejo y difícil para el cuerpo de la mujer ya que se somete a una estimulación ovárica mediante el uso de hormonas gonadotropinas, resultando en el crecimiento y desarrollo de los folículos de los ovarios de donde se obtienen los ovocitos que después serán inseminados mediante la técnica fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Tras este proceso los embriólogos se encargan de valorar y clasificar los embriones obtenidos con ayuda de unos parámetros fijados. La valoración y clasificación de los embriones puede hacerse mediante el microscopio convencional o mediante los incubadores time-lapse, como pueden ser el Embryoscope. Existen casos que no pueden llegar a blastocisto debido a la calidad de ovocitos, ya sea porque el día de la punción no se obtuvo ninguno o porque los que se recolectaron no eran de buena calidad y tras la inseminación no fecundaron o no se desarrollaron. En estos casos una de las opciones que se les suele ofrecer a los pacientes es recurrir a los ovocitos de donante, los cuales son donados por mujeres jóvenes cuyas reservas ováricas son mayores y su calidad ovocitaria es mejor. Para que estas mujeres estén cualificadas para ser donantes deben cumplir unos requerimientos, entre los cuales es de gran importancia conocer los hábitos de vida como el consumo de alcohol y de tabaco, siendo este el principal foco nuestro estudio.

**Palabras clave:** Reproducción asistida, RNV, infertilidad femenina, estimulación, gonadotropinas, clasificación de embriones, time-lapse, FIV, ICSI, donación, tabaco.

### **LISTA DE ABREVIATURAS**

Tratamiento de Reproducción Asistida (TRA)

Recién Nacido Vivo (RNV)

Fecundación In Vitro (FIV)

Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI)

Hormona Antimülleriana (AMH)

Recuento de Folículos Antrales (RFA)

Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP)

Radioterapia (RT)

Quimioterapia (QT)

Pronúcleos (PN)

Diagnóstico Preimplantacional Genético (DPI)

Corpúsculos Polares (CP)

Día 3 (D3)

Día 5 (D5)

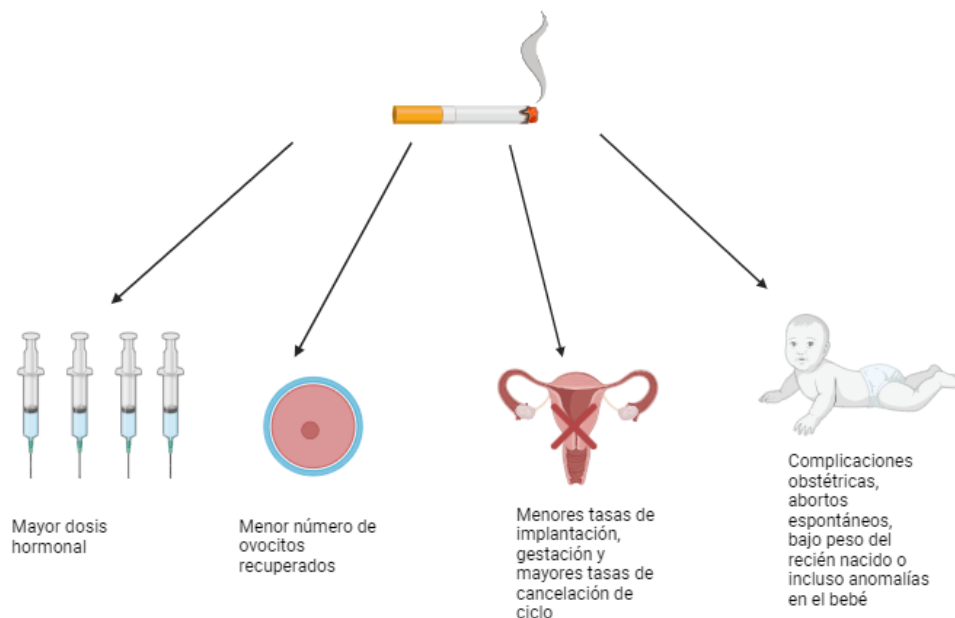
Día 6 (D6)

## INTRODUCCIÓN

### Antecedentes

El tabaquismo es conocido por ser dañino para el ser humano. El hábito de fumar suele estar asociado a enfermedades que puede llegar a ser mortales, como por ejemplo el cáncer. Las enfermedades causadas por las toxinas del tabaco suelen afectar a los diferentes órganos y sistemas del cuerpo humano, entre los cuales se incluyen, el sistema respiratorio y cardiovascular. Estos suelen ser los más comunes y mencionados entre la sociedad, pero existen otros aspectos del cuerpo humano que también se ven afectados, como puede ser el sistema reproductivo. Estos no se suelen mencionar con tanta frecuencia, pero son igual de importantes que el resto. El tabaquismo ha demostrado tener un efecto perjudicial en la salud reproductiva, tanto femenina como masculina.

El tabaco y sus toxinas afectan a una gran cantidad de individuos en nuestra sociedad desde hace mucho tiempo, en la cual se incluyen mujeres jóvenes que tienen deseo de convertirse en madres o que tienen intención de donar sus ovocitos para llevar a cabo tratamiento de reproducción asistida en mujeres que tienen dificultades para concebir. Esto puede ser debido a factores como la edad materna avanzada o por presentar una peor calidad ovocitaria y embrionaria.



Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)

**Figura 1.** Efectos del tabaquismo en la edad reproductiva materna y en el recién nacido vivo.

Está demostrado que en las mujeres en edad reproductiva el hábito de fumar ha ido creciendo poco a poco. Se ha demostrado que el consumo de tabaco disminuye la reserva ovárica y altera la producción de hormonas sexuales, siendo estas de gran importancia para la monitorización del ciclo reproductivo. Las toxinas del tabaco también resultan tener un efecto nocivo en cuanto a los parámetros foliculares, afectando al tamaño de los folículos y así a la obtención de ovocitos maduros y de calidad. Además de tener un efecto nocivo a nivel ovocitario, también lo tiene a nivel ovárico, debido a que la toxicidad acumulada en ambos ovarios resulta ser dañino para los ovocitos y perjudiciales para su desarrollo (Freour, Masson, Mirallie, Jean, Bach, Dejoie & Barriere, 2008). El tabaco puede afectar tanto a la calidad ovocitaria como a la calidad embrionaria, a la vez que, a los resultados clínicos, aumentando así las tasas de alteraciones cromosómicas y cancelación de los ciclos reproductivos. Algunas de las complicaciones que se pueden dar debido al tabaquismo incluyen, complicaciones obstétricas, abortos espontáneos, bajo peso del recién nacido o incluso anomalías en el bebé.

### **Reproducción Humana Asistida**

Hoy en día el estilo de vida no nos permite tener un alto número de hijos/as y las prioridades de las parejas han cambiado. Esto afecta de gran manera a la fertilidad de ambos, ya que hoy en día se tarda más en tener hijos ya sea por las responsabilidades de cada uno, las condiciones salariales, el tiempo libre y la manera en la que las personas deciden utilizarlo en base a sus preferencias y necesidades. La responsabilidad de tener un hijo es de las mayores que existen, ya que cambia la vida de las parejas para siempre.

La reproducción humana asistida, desde hace unos años está teniendo un mayor impacto en la sociedad y sobre todo en las parejas a las cuales se le presentan obstáculos para poder concebir, entre los factores que determinan tener que recurrir a tratamientos de reproducción asistida (TRA) destacan, infertilidad tanto femenina como masculina de más de un año, madres solteras con deseo de tener un hijo y parejas homosexuales con deseo de gestación. Existen muchas clínicas alrededor del mundo que ofrecen TRA con el fin de ayudar a aquellas parejas que deseen formar una familia mediante la realización de estudios, tanto de la mujer como del hombre, para detectar la razón por la que no llegan a gestar de manera convencional. Tras determinar la causa de la infertilidad, el médico les ofrece un tipo de tratamiento en base a cada caso que se le presente.

### **Infertilidad femenina**

La infertilidad puede ser tanto masculina como femenina, ya que dependiendo del caso van a variar los factores negativos para cada uno. En el caso del hombre, por lo general, suelen ser varios los factores que pueden afectar a la calidad del espermatozoide, es por ello por lo que cuando el varón va a la clínica se le realiza un análisis hormonal y de su semen. Entre los factores que afectan a la fertilidad del hombre, se encuentran: la edad, el estilo de vida y sus hábitos, las temperaturas elevadas testicular, enfermedades, tratamientos y exposición a sustancias tóxicas (Balawender & Orkisz, 2020). La calidad de los espermatozoides se clasifica en base a la cantidad, movilidad y morfología. En el caso de la edad avanzada del hombre, resulta en un efecto negativo sobre la cantidad y la movilidad de los espermatozoides. En cuanto al estilo de vida y sus hábitos se incluyen el consumo de alcohol, tabaco y otras sustancias, la alimentación y la falta de ejercicio. La presencia de enfermedades de gravedad también van a ser factor de importancia en la fertilidad del hombre, ya que requieren tratamientos agresivos que pueden afectar de manera nociva a la calidad del espermatozoide y su morfología. Por último, la temperatura de la zona testicular y la exposición a sustancias tóxicas puede dar lugar a alteraciones genéticas tanto del espermatozoide como de las células hijas obtenidas tras la fecundación.

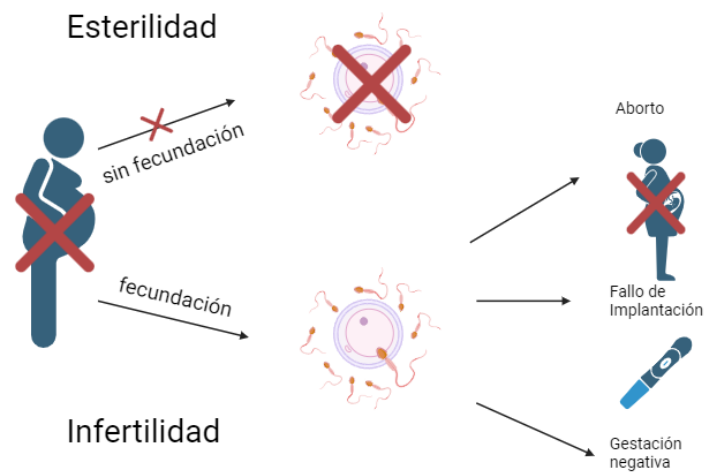
En cuanto a la mujer, entran en juego un gran número de aspectos que afectan a la fertilidad. Son varias las pruebas de fertilidad a las que se somete la mujer con el fin de examinar la salud reproductiva y la capacidad de gestar, consiguiendo finalmente un recién nacido vivo. Es muy importante comprobar que los ciclos de las pacientes estén regulados, es decir, asegurarse de que la ovulación se da de manera regular y adecuadamente. Además de la detección de la ovulación se deben de comprobar los niveles hormonales, tanto los de la hormona folículo estimulante (FSH) como los de la luteinizante (LH), la progesterona (P4) y el estradiol (E2) (Holesh, Bass & Lord, 2023). Todas estas hormonas desempeñan un papel fundamental durante el ciclo ya que son la base del éxito de los tratamientos que se lleven a cabo y aportan información crucial para entender problemas o situaciones que se dan durante un tratamiento. En un TRA es fundamental la estimulación del crecimiento y desarrollo de los folículos de los ovarios mediante el monitoreo de las hormonas, mediante un análisis de sangre o de orina, y así detectar el momento óptimo para la obtención de ovocitos, incrementando así el éxito del tratamiento elegido para cada ciclo. Otra prueba de gran importancia son las serologías,

las cuales son necesarias para descartar cualquier tipo de enfermedad infecciosas. Además, se realizan controles del crecimiento folicular y endometrial mediante ecografía, ya que hay estructuras del cuerpo de la mujer que son fundamentales de evaluar para detectar posibles problemas estructurales que puedan perjudicar al éxito del tratamiento. El tracto reproductor femenino está formado por diferentes estructuras, entre las cuales se encuentran las trompas de Falopio, el cuello uterino y el útero. En primer lugar, las trompas de Falopio son las responsables de que los ovocitos lleguen al útero desde los ovarios. Para comprobar que no hay ningún tipo de obstrucción o anomalía que puede perjudicar al transporte de los ovocitos, se puede realizar un a histerosalpinogografía (Grigovich, Kacharia, Bharwani, Hemingway, Mijatovic & Rodgers, 2021). En el caso del cuello uterino, es la estructura por la que tienen que pasar los espermatozoides. En el caso de que se encuentre, mediante un examen ginecológico, algún tipo de anomalía en el moco cervical esto puede dificultar al trayecto que tienen que realizar los espermatozoides para llegar hasta fecundar al ovocito (Jokiniemi, Magris, Ritari, Kuusipalo, Lundgren, Partanen & Kekäläinen, 2020). Por último, el útero es el órgano donde se va a implantar el ovocito fecundado y donde se desarrollará el bebé. Por ello, es de gran importancia evaluar el útero mediante ecografía o histeroscopia para descartar cualquier tipo de anomalías o alteraciones morfológicas como pueden ser los miomas, septos, los pólipos o la hiperplasia. Esta últimas, puede dificultar la implantación por el desajuste de los niveles de estrógenos y progesterona, los cuales son de gran relevancia en el momento de la implantación y la gestación (Jayaprakasan & Ojha, 2022).

Existen dos tipos de infertilidad, la infertilidad primar y la secundaria. La infertilidad primaria se da cuando la fecundación tiene lugar, pero no hay gestación positiva por lo que no se llega a término. La infertilidad secundaria es aquella que se da cuando no se logre un recién nacido vivo tras haber concebido un hijo/a previamente. La causa más frecuente en los casos de parejas que van a la clínica es por edad materna avanzada, es decir, mujeres que presenta una edad en la cual la reserva ovárica, la calidad ovocitaria y receptividad endometrial disminuye, resultando así en una disminución en las tasas de fecundación, implantación y gestación positiva (Deatsman, Vasilopoulos & Rhoton-Vlasak, 2016). La reserva ovárica se mide en base al valor de la hormona antimülleriana (AMH) y el recuento de folículos antrales (RFA), dos factores que disminuyen a medida que aumenta la edad de la mujer. Existen numerosos factores que afectan a la fertilidad femenina además de la edad, entre ellos anomalías uterinas,



endometriosis, síndrome de ovario poliquístico (SOP), y anovulaciones (Bedenk, Vrtačnik-Bokal & Virant-Klun, 2020). Por último, en el caso de que una mujer tenga algún tipo de enfermedad que la obligue a estar sometidas a radioterapia (RT) o quimioterapia (QT), también afectará a la reserva ovárica ya que además de afectar a las células cancerígenas atacan a las células sanas incluidas las del ovario, resultando en alteración del DNA de los ovocitos e incluso la apoptosis de estos (Bedeschi, Navarro & Oktay, 2016). En estos casos, el equipo médico ofrece la posibilidad de preservar los ovocitos mediante técnicas de vitrificación antes de empezar con el tratamiento, para así asegurarse de que los ovocitos recolectados sean de buena calidad y no hayan sido afectados por el tratamiento.



Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)

**Figura 2.** Esterilidad e infertilidad femenina

Además de los factores que afectan a la fertilidad mencionados previamente, deben de incluirse los hábitos de vida, como pueden ser el consumo de alcohol y el consumo de tabaco. Es cierto que alguno de los efectos del alcohol y del tabaco son reversible, por lo que lo indicado sería dejar de fumar y beber, ya que estos hábitos pueden tener efectos negativos tanto en la calidad ovocitaria y embrionaria, como en las tasas de implantación, gestación y las tasas de complicaciones durante el embarazo, como por ejemplo que él bebe nazca prematuro o incluso que se produzcan abortos.

El tabaco ha sido demostrado ser tóxico para la función reproductiva femenina, ya que puede afectar tanto a nivel ovocitario y ambiente folicular, como a nivel ovárico. Algunas de las observaciones que se han dado a lo largo del tiempo mediante la realización de estudios, incluyen: adelanto de la menopausia, disminución de la reserva

ovárica y alteración en la producción de hormonas sexuales (Freour et al., 2008). Es importante mencionar que el tabaco consta de un gran número de sustancias tóxicas para la función reproductiva de la mujer, las cuales van a afectar a diferentes niveles. Entre estas se encuentran sustancias como la nicotina, el cadmio, la cotinina y el Benzo(a)pireno (BaP).

En cuanto al efecto del tabaco a nivel folicular y ovocitario, se ha demostrado que la presencia de compuestos como el cadmio, la cotinina y la nicotina afectan negativamente al crecimiento folicular, por lo que sugiere un posible fallo a nivel complejo cumulo ovocitario. La nicotina es uno de los componentes principales de tabaco, la cual no afecta tanto a la vascularización, pero sí al incremento de apoptosis celular, en este caso de los ovocitos (Bordel, Laschke, Menger, Vollmar, 2006). También ha sido demostrado a nivel ovocitario en estudios con animales un efecto negativo de la nicotina en las células del cumulo y en el desarrollo y crecimiento ovocitario (Liu, Li, Rickords, White, Sessions, Aston, Bunch, 2008). El tabaco ha demostrado tener efectos perjudiciales a nivel ovocitario, lo cual podría afectar tanto a las tasas de implantación y gestación e incluso al desarrollo de anomalías genéticas en las células hijas. Esto puede sugerir una peor calidad y competencia tanto ovocitaria como embrionaria, lo cual se traduce en efectos negativos en el desarrollo de la zona pelúcida, trofoectodermo, masa celular interna.

El consumo de tabaco puede afectar a nivel ovárico, ya que las toxinas de este se acumulan en los compartimentos provocando un ambiente tóxico para los ovocitos. Una de las sustancias tóxicas del tabaco que destaca por su efecto negativo es la cotinina, la cual es un componente que interactúa directamente con los ovocitos debido a su presencia en los ovarios. La cotinina ha sido detectada en el núcleo y citoplasma de las células de la granulosa en mujeres fumadoras (Zenzes, Puy, Bielecki, 1997). Otra de las sustancias que han sido destacadas por su efecto a nivel ovárico es el cadmio, compuesto que inhibe la producción y liberación de progesterona y estradiol sugiriendo un fallo en el sistema endocrino (Zhang, Pang, Huang, Yan, Lin, 2008). Por último, mediante estudios con roedores se obtuvieron resultados en relación con la exposición al BaP, compuesto detectado en el tabaco, cuya exposición resultó en una reducción de los niveles de estrógeno y una menopausia adelantada de al menos 2 años causada posiblemente por un declive acelerado de la producción de ovocitos (Hughes & Brennan, 1996). Un fallo o alteración del sistema endocrino a nivel hormonas reproductoras puede significar un

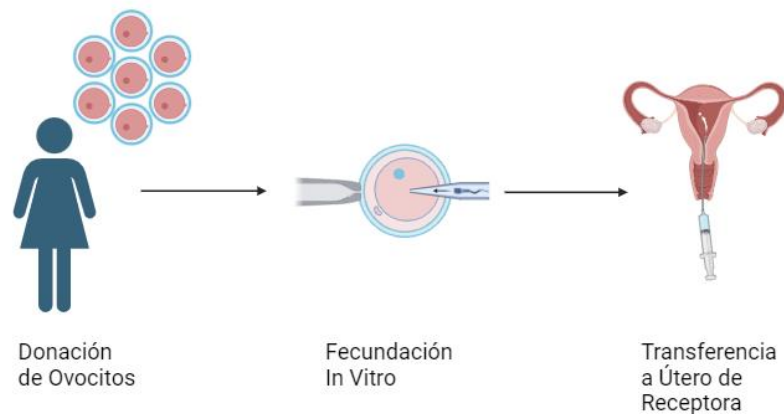
descenso en la producción de estas (Hughes & Brennan, 1996). Una alteración en la liberación de hormonas puede resultar perjudicial para la producción de ovocitos o en la liberación de estos durante la ovulación. Un mal funcionamiento en la producción de hormonas puede traducirse en infertilidad de la mujer o una peor receptividad endometrial, resultandos perjudiciales en el embarazo provocando así abortos espontáneos o recién nacidos prematuros.

La competencia ovocitaria es la capacidad que tienen los ovocitos para ser fecundados por el espermatozoide y evolucionar hasta estadio embrionario óptimo para implantar y desarrollarse en el útero de la mujer, obteniendo así un alto porcentaje de éxito de los diferentes ciclos. Es por ello por lo que los médicos recomiendan acudir a clínicas de fertilidad cuando se es más joven, ya que la edad es un factor muy importante debido a que a medida que aumenta la edad disminuye la calidad de los ovocitos. Además, es de gran importancia mantener una vida saludable ya que existen muchos factores perjudiciales como los mencionados anteriormente, que pueden afectar a la viabilidad y por tanto a las tasas de fecundación de los ovocitos y de llegada a blastocisto. En cuanto a la calidad embrionaria, es de gran importancia monitorizar el desarrollo de los diferentes estadios embrionarios, los cuales dependiendo de los parámetros fijados serán clasificados me mejor a peor calidad. Estos parámetros incluyen: aparición y desaparición de los pronúcleos (PN), tiempos de división, número de células, simetría, fragmentación, aparición y aspecto de la masa celular interna y aspecto del trofoectodermo (Bori, Paya, Alegre, Viloría, Remohi, Naranjo & Meseguer, 2020). Es de gran relevancia realizar una evaluación de cada estadio embrionario, con el fin de obtener las mejores tasas posibles en un ciclo reproductivo.

Los embriólogos son los encargados de realizar todas las técnicas de laboratorio necesarias para que un laboratorio de reproducción asistida tenga éxito, siendo una de sus responsabilidades evaluar y comprobar la calidad ovocitaria y embrionaria mediante microscopía e incluso mediante diagnóstico genético preimplantacional (DGP). Estos dos tipos de evaluación permiten seleccionar los embriones con mejor calidad que posteriormente serán transferidos al útero de la madre.

No siempre un tratamiento de reproducción asistida se realiza con éxito, su fallo puede ser tanto por factor femenino como masculino. Son muchas los pacientes que acuden a una clínica queriendo utilizar sus gametos, pero hay veces que por ciertos factores la calidad no es la óptima para conseguir un RNV, por lo que se da la opción de

llevar a cabo un ciclo con ovocitos de donante, en caso de que el factor femenino sea el afectado. La asignación de donantes se da cuando la mujer no produce ovocitos de calidad o no puede producir ovocitos en general. Los ovocitos de donante provienen de una mujer fértil, joven, que en su momento decidió donar con el fin de ser utilizados en los casos que se presente una mujer con problemas de fertilidad. El tratamiento de reproducción asistida es un proceso muy delicado, por lo que si se da el caso de que los pacientes necesiten recurrir a una donación de gametos, las implicaciones emocionales aumentan considerablemente, por lo que hay que ser pacientes con ellos y darles el tiempo necesario para tomar una decisión, además de añadirle la carga extra de los aspectos éticos y legales del proceso en cada país. En el caso de que la pareja decida empezar un ciclo con ovocitos de donante, se tiene que seguir un proceso de selección muy complejo, ya que no todo el mundo es elegible para ser donante. Antes de asignar una donante a una receptora, las primeras han tenido que pasar una criba que incluye: entrevista informativa, entrevista psicológica, evaluación médica, un análisis de portador de enfermedades genéticas, serologías, y un tratamiento de estimulación ovárica (Ministerio de Sanidad, 2021). Esta evaluación médica es esencial para asegurar que la donante esta sana y que es elegible para donar, la misma consta de evaluación hormonal, evaluación psicológica, física y ginecológica. También es de gran importancia para el momento de selección que el medico se informe de los antecedentes familiares. Es necesario asegurarse de que tanto la receptora como la donante están informadas correctamente sobre el proceso, sus riesgos e implicaciones. Tras el proceso de información de la receptora y la donante y la selección de la donante, esta última se somete a un tratamiento de estimulación ovárica controlada y será monitorizada con el fin de programarla en el momento óptimo para la punción folicular y extracción de ovocitos. Esta parte del proceso es muy semejante al de una paciente con ovocitos propios, la diferencia entre ambos es que los ovocitos de la donante tras ser fecundados y cultivados hasta a blastocisto, el embrión elegido con la mejor calidad será transferido al útero de la receptora de ovocitos, la cual también tendrá que ser sometida a un tratamiento específico para asegurarse de que el día de la transferencia las condiciones sean óptimas para que el embrión llegue a implantar.



Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)

**Figura 3.** Donación de ovocitos para un tratamiento de reproducción asistida.

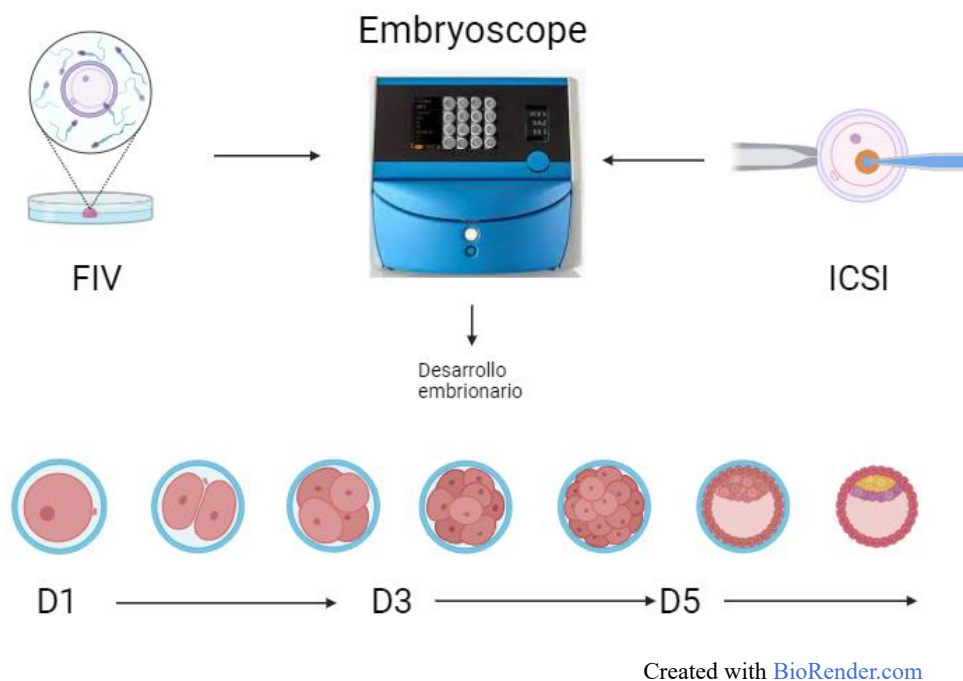
### Clasificación embrionaria

En un proceso de reproducción asistida uno de los pasos a realizar es la valoración y clasificación de los embriones, la cual puede hacerse mediante el microscopio convencional o mediante los incubadores time-lapse, como pueden ser el Embryoscope. La clasificación embrionaria es necesaria para saber la calidad y la viabilidad de los embriones, además de las posibilidades de éxito de cada uno a la hora de implantar y continuar su desarrollo una vez hayan sido transferidos al útero de la madre.

Existen varios parámetros que se tienen en cuenta en el momento de valorar las fecundaciones y los distintos estadios embrionarios. En el caso de las fecundaciones se va a comprobar si el espermatozoide ha completado la fecundación del ovocito, la cual se caracteriza por la aparición de los corpúsculos polares (CP), el halo de fecundación y sobre todo la aparición de los dos pronúcleos. Una vez realizada la valoración de las fecundaciones el día después de la inseminación, se valoran los diferentes estadios embrionarios los cuales son: día 3 (D3), día 5 (D5) y día 6 (D6).

Como se mencionó anteriormente, la valoración de los estadios de desarrollo embrionario se puede realizar mediante los sistemas time-lapse. Esta tecnología, como bien define el propio nombre, son sistemas que capturan lapsos de tiempo en forma de imágenes. Contienen softwares que capturan y analizan las imágenes microscópicas obtenidas en intervalos regulares que después serán observadas en el ordenador por un embriólogo/a, permitiendo la valoración de los embriones desde el momento en que se microinyectaron los ovocitos hasta llegar a blastocisto (Gardner & Sakkas, 2022). El uso de sistemas time-lapse ha supuesto un gran desarrollo tecnológico para la reproducción

asistida ya que facilita una información más detallada sobre los parámetros mencionados anteriormente, como, la aparición de los PN y su desaparición, los tiempos de división, la aparición de células del trofooctodermo y de la masa celular interna, el grado de expansión y morfología. Los incubadores time-lapse tienen sus ventajas en cuanto a favorecer el desarrollo embrionario, ya que mejora su monitorización y reducen el número de veces que se sacan los embriones del incubador y evitando ser manipulados, por lo que hay menores probabilidades de que las condiciones de cultivo se vean afectadas resultando así en un cultivo embrionario y desarrollo más óptimo. Existen diferentes marcas que fabrican los sistemas time-lapse, entre los cuales destacan el Embryoscope y GERI (Chéles et al., 2022). Ambos son incubadores con un software time-lapse instalado y con una cámara que captura imágenes microscópicas de los embriones, permitiendo así un conjunto de imágenes que dan lugar a un video con información detallada del desarrollo embrionario completo. Estos sistemas se utilizan con el fin de hacer una selección más precisa de los embriones en base a los diferentes parámetros registrados por el software, mejorando así las tasas de éxito de los ciclos reproductivos realizados en la clínica.



**Figura 4.** Embryoscope y desarrollo embrionario.

Además de los beneficios de los sistemas time-lapse utilizados en los laboratorios de embriología, también pueden ser utilizados como método informativo para las pacientes al mismo tiempo que el médico les explica todo el proceso, permitiéndoles

entender como un embrión evoluciona desde el día de la inseminación hasta D5 o D6 de desarrollo dependiendo del caso. Otro beneficio de time-lapse puede ser su uso como método diagnóstico, pudiendo explicar los motivos del porqué los embriones no llegan a blastocisto, o en el caso de que lleguen, hipotetizar los motivos por los que no son capaces de implantar.

### **Hipótesis y Objetivos**

Como hemos comentado anteriormente, existe un número variado de factores que pueden afectar a la fertilidad femenina, como pueden ser los hábitos de vida que tiene las mujeres. Entre estos destaca el consumo de tabaco, el cual no se debe de consumir ni previamente al tratamiento de estimulación, ni durante este y sobre todo no debe de ser un hábito de vida durante el embarazo ya que puede tener repercusiones muy graves en la madre y en el feto.

En el estudio se analizarán los diferentes parámetros morfocinéticos de los embriones de un grupo de donantes de ovocitos clasificados según su consumo de tabaco. Este consta de tres grupos diferentes, un grupo control compuesto por no fumadoras (grupo I), mientras que los dos grupos experimentales son fumadoras moderadas, que no superan los 10 cigarrillos al día (grupo II) y fumadoras con un elevado consumo de tabaco de más de 10 cigarrillos diarios (grupo III), aunque para el presente trabajo se decidió fusionar los dos grupos de fumadoras ya que no se observaron diferencias significativas al analizar los grupos por separado. Los datos de los diferentes grupos serán comparados para alcanzar el objetivo del estudio.

Nuestra hipótesis es que podría existir una relación entre el consumo de tabaco y la disminución de la calidad de los ovocitos que se refleje en el desarrollo embrionario en comparación con las pacientes no fumadoras. En este estudio se espera encontrar diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a parámetros morfocinéticos y clínicos seleccionados, que nos permitan elegir de una manera más segura las donantes aptas para donación.

### **Objetivos primarios**

Determinar si hay diferencias morfocinéticas entre los grupos de estudio y el grupo control que puedan implicar una afectación biológica mediante tecnología time lapse.

### **Objetivos secundarios**

Determinar si hay diferencias en los tiempos principales de desarrollo embrionario y división celular entre los grupos de estudio.

Determinar si la duración de los ciclos celulares presenta diferencias entre los grupos de estudio.

Determinar si existen diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a la tasa de embriones útiles conseguidos.

Determinar si la tasa de implantación, y gestación es diferente entre los distintos grupos de estudio

Determinar si la tasa de recién nacido vivo es diferente entre los diferentes grupos de estudio

Determinar si hay diferencias entre consumidoras moderadas de tabaco (menos de 10 cigarrillos al día) y grandes consumidoras de tabaco (más de 10 cigarrillos al día).

### **Métodos**

#### **Tipo de estudio**

Se realizó un estudio de investigación retrospectivo de la base de datos del estudio prospectivo titulado “Efecto del tabaco en la calidad y desarrollo folicular, potenciales marcadores moleculares”. Este estudio tuvo como objetivo principal la determinación de las roturas del ADN en las células de la granulosa por efecto de estrés oxidativo, junto con un número de objetivos secundarios, entre ellos la determinación de niveles de nicotina y cotinina, factores angiogénicos, comparación de parámetros morfológicos entre los tres grupos de estudio, los tiempos de división celular y los resultados clínicos tras usar ovocitos de donante. La población objeto del estudio fueron donante de ovocitos que cumplieron con los requisitos establecidos de la clínica en aquel momento, siendo clasificadas en tres grupos: grupo control compuesto por no fumadoras, un grupo experimental compuesto por fumadoras moderadas (que no superan los 10 cigarrillos al día) y un grupo experimental formado por donantes con un alto consumo de tabaco (más de 10 cigarrillos diarios).



### Criterios de selección

Todas las donantes incluidas en el estudio fueron sometidas a un proceso de estimulación e inducción de la ovulación. En el día trece, se realizó la punción folicular y se procedió a la microinyección de los ovocitos y posterior cultivo en incubador time lapse.

En la siguiente tabla se pueden observar los diferentes criterios de inclusión y exclusión utilizados en el estudio:

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Número de folículos antrales entre 8 y 25.	Baja respuesta folicular
Rango de edad 18-34 años	IMC fuera de límites normales
Rango de índice de masa corporal (IMC) entre 17 y 29 kg/m <sup>2</sup>	Como medida de control de las receptoras de ovocitos excluyeron a aquellas que presentasen algún factor que pudiese afectar a la implantación embrionaria, aquellas que tuviesen más de 47 años de edad.
Entrevista psicológica apta	
Rango del número de folículos antrales 8-25	
Número de donaciones en territorio nacional ≤6	
Estado ovocitos donados: en fresco	
Exploración ginecológica y revisión normales.	
Serologías de VHB VHC RPR Y VIH negativos.	
Cariotipo normal.	
Hemograma y coagulación normales.	
Haber leído, comprendido y firmado el consentimiento informado	

**Figura 1.** Criterios de inclusión y exclusión para la selección de donantes.

### Embryoscope

La tecnología time-lapse se utilizó como método de detección de diferencias morfocinéticos y clasificación embrionaria entre los diferentes grupos, prestando gran atención a los tiempos de las divisiones celulares de los diferentes estadios, tasa de embriones viables, tasa de gestación e implantación y tasas de recién nacido vivo.

Se recogieron los datos de un total de 1512 embriones con ayuda del EmbryoViewer, software que permitió la monitorización de información recogida de los incubadores Embryoscope conectados a este. Este software consta de una función, llamada “Annotations”, que facilito la recolección de información de los diferentes parámetros del desarrollo embrionario de cada embrión.

En la siguiente tabla se pueden observar los diferentes parámetros que se utilizaron para comparar los diferentes grupos de estudio y demostrar los efectos del tabaco en el desarrollo embrionario y tasas embrionarias:

Parámetros	¿Cunado se marca cada parámetro?
PN appeared	Aparición de los pronúcleos
PN faded	Desaparición de los pronúcleos
Multinucleated	Solo en estadio de 4 células
Irregular division	Fusión de células división de 1 a 3 células
tSB	Aparición de las células del trofoectodermo, forma de semiluna
tB	Cuando se diferencia la masa celular interna, cuando se observan los tabiques
ICM	Calidad (A, B, C, NA)
TE	Calidad (A,B,C, NA)

**Figura 2.** Parámetros del desarrollo embrionario recogidos por el EmbryoViewer.

La anotación de los parámetros en el EmbryoViewer de los diferentes tiempos de división fue realizada por una persona, factor de gran importancia, ya que dos personas podrían haber tenido criterios afectando así a los resultados obtenidos. El factor de más relevancia fue la anotación de los tiempos, ya que en base a ellos se realizó el estudio estadístico.

Para el estudio estadístico se utilizó la técnica estadística ANOVA de un factor, tecina que permite estudiar la relación que existe entre un variable dependiente y una independendiente. En el análisis estadístico se incluyeron aquellos parámetros obtenidos en el EmbryoViewer y los tiempos en los que cada uno tenía lugar. Además, se realizó el análisis de los diferentes grupos de estudio con relación a las tasas de implantación, RNV y embriones viables según la cantidad de cigarrillos fumados al día.

Primero se realizó una tabla de descriptivos para tener una visión general de las medias de los grupos de estudio “No fumadoras” y “Fumadoras”, incluyendo también información sobre la desviación típica, error típico y el intervalo de confianza para la media al 95%. En el estudio estadístico también se incluyó el estadístico de F con el cual se calcula el cociente entre las variables “inter-groups” e “intragroups”, el factor F y la significación. En cuanto al valor F, cuanto más difieran las medias de la variable dependiente entre los grupos de estudio de la variable independiente, más alto será el valor de F. Por lo que cuanto mayor valor de F, mayor relación entre las variables. En el caso de la significación, si es menor de 0,05 significaría que las dos variables estudiadas están relacionadas y muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio.

En cuanto a las tasas de implantación, embriones viables y recién nacido vivo se realizaron diferentes estudios estadísticos. Para el análisis de las tasas de implantación se realizó un estadístico descriptivo y un estadístico de F. En el caso de las tasas de embriones viables se realizó una tabla de contingencia para estudiar el porcentaje de embriones viables y no viables entre los grupos estadísticos de no fumadoras y fumadoras, en la cual se incluyeron un total de 1512 embriones. En el estudio de la tasa de recién nacido vivo también se incluyó la prueba de chi-cuadrado como método de asociación entre las variables. Por el último, para el estudio de las tasas de recién nacido vivo se realizó un estudio del del tratamiento de reproducción de los casos con el fin de obtener el porcentaje de embriones que fueron transferidos y llegaron a recién nacido vivo. Además, se incluyó una tabla de contingencia y las pruebas de chi-cuadrado para obtener más información sobre la relación entre variables.

### **Resultados y Discusión**

El tabaco es una sustancia tóxica para el cuerpo humano, por lo tanto, perjudicial para su funcionamiento pudiendo afectar las funciones y aspectos reproductivos, en este caso de la mujer. Podría existir una relación entre el consumo de tabaco y la disminución de parámetros foliculares y la calidad de los ovocitos en comparación con las pacientes no fumadoras. En este estudio se espera encontrar diferencias entre los grupos de estudio en cuanto a parámetros morfocinéticos y clínicos seleccionados, que nos permitan elegir de una manera más segura las donantes aptas para donación

### **Tiempos del Desarrollo Embrionario**

Como se ha mencionado anteriormente uno de los aspectos a estudiar fueron los parámetros morfocinéticos. Los grupos de estudios fueron divididos entre no fumadoras y fumadoras, esperando ver algún tipo de diferencia que demuestre el efecto del tabaco en la mujer y su calidad embrionaria. Se espera que el tabaco tenga un impacto en los aspectos morfocinéticos y en los tiempos del desarrollo embrionario. Las mujeres embarazadas o mujeres con deseo de gestación durante su vida deben de evitar el contacto, tanto indirecto como directo, con el tabaco ya que este es perjudicial.

A través de un estudio estadístico de la información recogida de la base de datos se ha demostrado que algunos aspectos morfocinéticos y tiempos de desarrollo se vieron afectados en las mujeres fumadoras en comparación a las mujeres no fumadoras. Una variación de los tiempos de las diferentes fases del desarrollo embrionario puede significar que los embriones no llegaran a tener una calidad óptima para poder implantar y así resultar en un recién nacido vivo. A continuación, se hará un análisis en profundidad de los resultados obtenidos tras la realización del estudio estadístico.

		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Limite superioro		
PB2	No fumadoras	504	3,03	2,261	,101	2,83	3,23	0	16
	Fumadoras	750	3,46	3,737	,136	3,19	3,73	0	28
	Total	1254	3,29	3,232	,091	3,11	3,47	0	28
PNa	No fumadoras	505	7,56	2,778	,124	7,32	7,80	3	20
	Fumadoras	734	8,02	3,961	,146	7,73	8,30	3	46
	Total	1239	7,83	3,533	,100	7,63	8,03	3	46
Singamia	No fumadoras	512	4,14	6,945	,307	3,53	4,74	1	47
	Fumadoras	736	3,47	4,019	,148	3,18	3,76	0	72
	Total	1248	3,74	5,421	,153	3,44	4,04	0	72
CC1	No fumadoras	512	19,44	6,046	,267	18,92	19,97	8	47
	Fumadoras	736	18,66	4,837	,178	18,31	19,01	1	46
	Total	1248	18,98	5,378	,152	18,68	19,28	1	47
CC1cp-ext-T2	No fumadoras	512	23,91	5,449	,241	23,44	24,39	16	50
	Fumadoras	736	23,11	5,111	,188	22,74	23,48	1	72
	Total	1248	23,44	5,265	,149	23,15	23,73	1	72
tPNf	No fumadoras	502	23,35	4,336	,194	22,97	23,73	9	61
	Fumadoras	741	23,30	5,352	,197	22,92	23,69	14	79
	Total	1243	23,32	4,965	,141	23,05	23,60	9	79
t2	No fumadoras	512	26,77	5,441	,240	26,30	27,24	19	54
	Fumadoras	736	26,47	5,614	,207	26,06	26,87	17	72
	Total	1248	26,59	5,543	,157	26,28	26,90	17	72
CC2	No fumadoras	510	10,19	5,608	,248	9,70	10,68	0	71
	Fumadoras	727	10,42	3,909	,145	10,14	10,71	0	35
	Total	1237	10,33	4,684	,133	10,07	10,59	0	71
t3	No fumadoras	510	36,89	6,922	,306	36,29	37,49	22	93
	Fumadoras	727	36,74	6,907	,256	36,23	37,24	22	107
	Total	1237	36,80	6,911	,196	36,41	37,19	22	107
S2	No fumadoras	507	2,67	4,776	,212	2,26	3,09	0	49
	Fumadoras	720	2,52	4,795	,179	2,17	2,87	0	50

	Total	1227	2,58	4,786	,137	2,32	2,85	0	50
t4	No fumadoras	507	39,35	8,015	,356	38,65	40,05	22	102
	Fumadoras	719	38,98	7,938	,296	38,40	39,56	23	99
	Total	1226	39,13	7,969	,228	38,69	39,58	22	102
CC3	No fumadoras	493	10,76	6,109	,275	10,22	11,30	0	62
	Fumadoras	714	11,06	6,524	,244	10,58	11,54	0	58
	Total	1207	10,94	6,357	,183	10,58	11,29	0	62
t5	No fumadoras	493	49,39	8,729	,393	48,61	50,16	23	110
	Fumadoras	714	49,80	10,284	,385	49,05	50,56	28	114
	Total	1207	49,63	9,678	,279	49,09	50,18	23	114
t6	No fumadoras	487	52,68	9,135	,414	51,87	53,49	31	98
	Fumadoras	693	53,13	10,828	,411	52,32	53,93	30	104
	Total	1180	52,94	10,162	,296	52,36	53,52	30	104
t7	No fumadoras	484	56,23	11,229	,510	55,23	57,24	31	115
	Fumadoras	681	56,63	12,083	,463	55,72	57,54	34	118
	Total	1165	56,47	11,733	,344	55,79	57,14	31	118
t8	No fumadoras	471	60,64	12,128	,559	59,54	61,74	31	115
	Fumadoras	653	60,53	12,708	,497	59,55	61,50	39	110
	Total	1124	60,57	12,463	,372	59,84	61,30	31	115
CC4	No fumadoras	466	10,99	7,382	,342	10,32	11,66	0	49
	Fumadoras	623	12,31	9,133	,366	11,59	13,03	0	90
	Total	1089	11,74	8,450	,256	11,24	12,25	0	90
S3	No fumadoras	471	11,66	9,556	,440	10,80	12,53	0	56
	Fumadoras	653	11,81	9,582	,375	11,08	12,55	0	63
	Total	1124	11,75	9,567	,285	11,19	12,31	0	63
t9+	No fumadoras	466	71,32	12,212	,566	70,21	72,43	45	117
	Fumadoras	623	72,01	12,089	,484	71,06	72,96	39	117
	Total	1089	71,71	12,141	,368	70,99	72,44	39	117
tSC	No fumadoras	443	82,08	11,205	,532	81,04	83,13	49	118
	Fumadoras	468	83,76	11,215	,518	82,75	84,78	52	122
	Total	911	82,95	11,235	,372	82,22	83,68	49	122
tM	No fumadoras	429	88,34	10,743	,519	87,32	89,36	56	119
	Fumadoras	562	90,52	10,306	,435	89,67	91,38	57	124
	Total	991	89,58	10,548	,335	88,92	90,23	56	124
tSB	No fumadoras	393	98,89	8,496	,429	98,05	99,74	77	124
	Fumadoras	517	99,25	8,791	,387	98,49	100,01	77	139
	Total	910	99,10	8,662	,287	98,53	99,66	77	139
tB	No fumadoras	354	104,14	8,168	,434	103,29	105,00	86	130
	Fumadoras	456	104,51	8,477	,397	103,73	105,29	82	140
	Total	810	104,35	8,340	,293	103,77	104,92	82	140
tEB	No fumadoras	262	106,74	7,048	,435	105,88	107,59	89	130
	Fumadoras	314	108,61	6,391	,361	107,91	109,32	92	138
	Total	576	107,76	6,757	,282	107,21	108,31	89	138
tHB	No fumadoras	47	111,04	5,521	,805	109,42	112,66	97	119
	Fumadoras	50	112,36	4,919	,696	110,96	113,76	101	130
	Total	97	111,72	5,234	,531	110,67	112,78	97	130

**Tabla 1.** Estadístico descriptivo para ordenar, resumir y analizar los diferentes aspectos de importancia para el estudio.

Esta primera tabla, muestra una primera vista general de las medias ordenadas y resumidas de las fases del desarrollo embrionario de los embriones estudiados, realizando una comparación general entre las no fumadoras y las fumadoras. Esta tabla es solo informativa, la cual va a servir de ayuda para realizar el resto de los análisis estadísticos que servir de apoyo para demostrar la hipótesis del estudio.

	Suma de Cuadrados	gl	Media Cuadratica	F	Sig.
--	-------------------	----	------------------	---	------

tPB2	Inter-grupos	56,144	1	56,144	5,394	,020
	Intra-grupos	13030,932	1252	10,408		
	Total	13087,076	1253			
tPNa	Inter-grupos	62,567	1	62,567	5,029	,025
	Intra-grupos	15391,178	1237	12,442		
	Total	15453,745	1238			
Singamia	Inter-grupos	134,724	1	134,724	4,597	,032
	Intra-grupos	36517,711	1246	29,308		
	Total	36652,435	1247			
CC1	Inter-grupos	186,142	1	186,142	6,464	,011
	Intra-grupos	35880,273	1246	28,796		
	Total	36066,416	1247			
CC1cp-ext-T2	Inter-grupos	195,560	1	195,560	7,088	,008
	Intra-grupos	34377,565	1246	27,590		
	Total	34573,125	1247			
tPNf	Inter-grupos	,717	1	,717	,029	,865
	Intra-grupos	30611,272	1241	24,667		
	Total	30611,989	1242			
T2	Inter-grupos	27,564	1	27,564	,897	,344
	Intra-grupos	38288,022	1246	30,729		
	Total	38315,587	1247			
CC2	Inter-grupos	16,064	1	16,064	,732	,392
	Intra-grupos	27104,682	1235	21,947		
	Total	27120,745	1236			
T3	Inter-grupos	7,009	1	7,009	,147	,702
	Intra-grupos	59020,671	1235	47,790		
	Total	59027,680	1236			
S2	Inter-grupos	6,726	1	6,726	,294	,588
	Intra-grupos	28073,293	1225	22,917		
	Total	28080,020	1226			
T4	Inter-grupos	40,090	1	40,090	,631	,427
	Intra-grupos	77749,972	1224	63,521		
	Total	77790,062	1225			
CC3	Inter-grupos	25,444	1	25,444	,629	,428
	Intra-grupos	48715,516	1205	40,428		
	Total	48740,959	1206			
T5	Inter-grupos	51,084	1	51,084	,545	,457
	Intra-grupos	112901,324	1205	93,694		
	Total	112952,408	1206			
T6	Inter-grupos	57,227	1	57,227	,554	,457
	Intra-grupos	121696,854	1178	103,308		
	Total	121754,081	1179			
t7	Inter-grupos	44,805	1	44,805	,325	,569

	Intra-grupos	160183,105	1163	137,733		
	Total	160227,911	1164			
t8	Inter-grupos	3,228	1	3,228	,021	,885
	Intra-grupos	174421,643	1122	155,456		
	Total	174424,871	1123			
CC4	Inter-grupos	466,388	1	466,388	6,565	,011
	Intra-grupos	77217,133	1087	71,037		
	Total	77683,521	1088			
S3	Inter-grupos	6,395	1	6,395	,070	,792
	Intra-grupos	102776,854	1122	91,601		
	Total	102783,249	1123			
t9+	Inter-grupos	126,883	1	126,883	,861	,354
	Intra-grupos	160249,301	1087	147,423		
	Total	160376,184	1088			
tSC	Inter-grupos	643,416	1	643,416	5,120	,024
	Intra-grupos	114226,055	909	125,661		
	Total	114869,471	910			
tM	Inter-grupos	1161,655	1	1161,655	10,542	,001
	Intra-grupos	108984,190	989	110,196		
	Total	110145,845	990			
tSB	Inter-grupos	28,978	1	28,978	,386	,535
	Intra-grupos	68177,318	908	75,085		
	Total	68206,296	909			
tB	Inter-grupos	27,242	1	27,242	,391	,532
	Intra-grupos	56246,883	808	69,612		
	Total	56274,125	809			
tEB	Inter-grupos	503,737	1	503,737	11,229	,001
	Intra-grupos	25749,201	574	44,859		
	Total	26252,937	575			
tHB	Inter-grupos	42,050	1	42,050	1,544	,217
	Intra-grupos	2587,435	95	27,236		
	Total	2629,485	96			

**Tabla 2.** ANOVA de un factor. Tiempos de desarrollo embrionario. Aspectos de importancia, suma de cuadrados, los valores de F y de significación.

En el análisis estadístico de esta tabla es importante fijarse en los valores de F y de significación, los cuales demuestran la relación positiva o nula entre las diferentes variables. En este caso van a ser significativas aquellas variables que tenga un valor de F más alto y un valor de significación menor de 0,05. En el caso del valor de F, cuanto mayor sea esta mayor relación existe entre las variables. Por otro lado, si el valor de significación es menor de 0,05 las dos variables estudiadas están relacionadas y se muestran diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Las variables que muestran diferencias estadísticamente significativas con aquellas con mayores valores de F o valores de significación menores de 0,05. Entre ellas se incluyen: tPB2, tPNa, singamia, CC1cp-extT2, tSC, TM, y tEB.

En la tabla 2 se muestran los resultados estadísticos de las fumadoras por un lado y las no fumadoras en conjunto por otro. La primera variable que se muestra ser estadísticamente significativa son los tiempos de tPB2 y tPNa, los cuales están relacionados con el reinicio de la meiosis y cuyos valores de significación obtenidos fueron 0,020 y 0,025, respectivamente. Estos dos valores son los tiempos de aparición del primer pronúcleo y de confirmación de la presencia de los 2 pronúcleos, lo cual demuestra que existe fecundación del ovocito. En este caso, en el análisis estadístico se muestran unos tiempos significativamente más rápidos en no fumadora que en fumadoras, lo cual se relaciona con el reinicio de la meiosis mencionado anteriormente, esto puede significar una mejor maquinaria celular para realizar la meiosis en el caso de los ovocitos procedentes de mujeres no fumadoras. Este aspecto del desarrollo embrionario puede verse como muestra de una mayor calidad ovocitaria.

En el caso de la singamia o fusión de pronúcleos, se observa un valor de significación menor a 0,05. En este caso se observa un tiempo de singamia mayor en las no fumadoras en comparación a las fumadoras, siendo este un aspecto relevante del desarrollo embrionario ya que, cuanto mayor tiempo de singamia mayor replicación de DNA. Por lo que, una singamia más rápida puede traducirse en una replicación de DNA incompleta o errónea, pudiendo causar cambios o alteración genéticos en las células hijas, que podrían observarse en embriones procedentes de ovocitos de donantes fumadoras.

Las fases previas a la primera división son de gran importancia para que el desarrollo embrionario sea el adecuado y el embrión evolucione de manera progresiva. En el caso de la variable CC1cp-extT2, la cual indica la fase específica del desarrollo temprano del embrión desde que aparece el primer corpúsculo polar hasta la primera división celular, se observa que es significativa. El tiempo que se observa en la tabla resulta ser más largo en las no fumadoras que en el grupo de fumadoras. Este tiempo es dependiente de la calidad ovocitaria, siendo los procesos que se dan previos a la primera división celular complejos y vitales para la correcta formación y desarrollo del embrión. Por lo que es de gran importancia que los procesos celulares se lleven a cabo de manera que se tomen el tiempo necesario para que estos se completen adecuadamente, lo que se traduce como una mejor calidad ovocitaria y desarrollo embrionario. Esto es relevante



cuando se considera el impacto del tabaquismo sobre la fisiología humana, ya que las sustancias tóxicas pueden tener efectos deletéreos en los procesos del desarrollo embrionario. Los resultados obtenidos sugieren que los eventos que se dan en el desarrollo embrionario hasta la primera división celular llevan más tiempo en completarse en el grupo de las no fumadoras que las fumadoras. Esto se traduce en que, la ausencia de los efectos nocivos del tabaco resulta en un mayor tiempo para el embrión para completar los procesos cuidadosamente.

A partir de la primera división celular los tiempos obtenidos de ambos grupos, tanto no fumadoras como fumadores, son muy similares desde T2 hasta T8, sin mostrar significancia estadística. Es cierto, que durante estas fases del desarrollo embrionario los tiempos se estabilizan, pero hay aspectos que se pueden interpretar en base a los datos obtenidos en cuanto a ambos grupos. Aunque no se presentan diferencias muy notables entre los tiempos de división de ambos grupos, se puede ver una evidencia sutil de que los embriones de las no fumadoras pueden ser de mejor calidad. Es importante mencionar que además del tiempo que lleva cada evento del desarrollo embrionario, es importante que estos se lleven a cabo correctamente ya que son complejos.

El hecho de que los tiempos de división sean similares entre las etapas T2 y T8 se puede traducir en que la capacidad ovocitaria en estas etapas no parece estar significativamente afectada por el tabaquismo y las sustancias tóxicas que su consumo conlleva. Por lo que sugiere que, el tabaquismo tiene un mayor efecto sobre las etapas tempranas o tardías del desarrollo embrionario, o que durante las fases del desarrollo que tienen lugar entre T2 y T8 el embrión es más resistente a factores externos como los efectos del tabaco, o los procesos son más automáticos y/o menos complejos. Es cierto que, tras observar T5 de ambos grupos se ve una leve diferencia en cuanto a los tiempos, siendo ligeramente más lentos en las no fumadoras lo cual sugiere que se emplea más tiempo en la división celular para garantizar la calidad de esta. Por último, se observan unos tiempos de división más rápidos en T6, T7 y T8, en el grupo de no fumadoras. Esto se puede traducir en que los embriones de las no fumadoras poseen una maquinaria celular más eficiente por lo que les permite realizar las divisiones celulares en un menor tiempo sin necesidad de afectar a la calidad del desarrollo embrionario, debemos recordar que estas etapas de división celular son la antesala de la formación de la mórula, momento a partir del cual los ciclos celulares se aceleran consumiendo mucho menos tiempo que en estadios anteriores, por lo que este acortamiento de los ciclos celulares en embriones

procedentes de donantes no fumadoras podría tener una cierta significancia biológica, aunque no podemos asegurarlo con los datos de los que disponemos.

En los resultados obtenidos se muestra una significación estadística en los tiempos del cuarto ciclo celular, CC4. Es de relevancia mencionar que, a medida que el desarrollo embrionario avanza, las divisiones celulares se aceleran. En este caso, se observa un menor tiempo de CC4 en las no fumadoras, siendo buena señal en cuanto al funcionamiento de los embriones de este grupo.

Por último, es importante mencionar las siguientes variables, las cuales son estadísticamente significativas tras la recogida de datos, las cuales incluyen: el inicio de compactación, la formación de mórula y la velocidad de expansión del blastocisto. En el caso del inicio de compactación (tSC) y formación de mórula (tM), se observan unos tiempos menores hacia el grupo de las no fumadoras siendo mucho más rápidos que los embriones del grupo de las fumadoras. La compactación se relaciona con la activación genómica embrionaria, momento en el cual el embrión comienza a ser autónomo y utiliza su propio genoma en vez de depender exclusivamente del RNA mensajero acumulado en el ovocito durante la foliculogénesis, es decir, empiezan a expresar mayoritariamente sus propios genes y a producir sus propias proteínas. Comenzar los procesos de compactación y formación de mórula antes, sugiere una mayor eficiencia del desarrollo de los embriones del grupo de las no fumadoras. Al mismo tiempo, esto se traduce en que una exposición a sustancias tóxicas como el tabaco pueden resultar en un retraso de los eventos críticos del desarrollo como son la compactación y la activación genómica embrionaria debido a un efecto deletéreo en la maquinaria celular. En el caso de las tasas de expansión en el desarrollo embrionario, fase en la cual el blastocisto se expande permitiendo la eclosión embrionaria y facilitando así a la implantación del embrión en el útero materno, se observan tiempos significativamente más rápidos en el grupo de no fumadoras. Es importante que para que esta expansión se lleve a cabo, los embriones deben de tener la capacidad de consumir aminoácidos no esenciales y glutamina, nutrientes necesarios para la producción de proteínas. Estas proteínas son las encargadas de la formación de canales y estructuras que facilitan la acumulación de líquido en el interior provocando la expansión del blastocisto. Un tiempo de expansión más rápido obtenido del grupo de no fumadoras, sugiere que los embriones procedentes de este grupo están más capacitados para realizar funciones metabólicas. Es importante mencionar que, cuanto más expandido este el blastocisto, mayor capacidad implantatoria por lo que potencialmente, los

embriones procedentes de las no fumadoras presentarán mejor capacidad de implantación. En el caso de los embriones procedentes del grupo de las fumadoras los tiempos son más lentos, sugiriendo que las toxinas del tabaco afectan de alguna manera a la capacidad del embrión a consumir nutrientes y producir sus propias proteínas necesarias para estos procesos del desarrollo embrionario.

**Tasas de Implantación, Viabilidad Embrionaria y Recién Nacido Vivo**

A continuación, se muestran los resultados clínicos obtenidos en el presente estudio:

En cuanto a la tasa de implantación observada en ambos grupos, podemos afirmar que en el caso del grupo de no fumadoras esta tasa de implantación fue del 60%, mientras que, en el caso de las donantes fumadoras, la tasa de implantación apenas alcanzaba el 51%, sin embargo, al realizar es análisis estadístico, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

**ANOVA de un factor**

Tasas de Implantación	Suma de Cuadrados		gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos		,661	1	,661	2,670	,103
Intra-grupos		84,181	340	,248		
Total		84,842	341			

**Tabla 3.** ANOVA de un factor de las tasas de implantación. Aspectos de importancia, el valor de F y de significación

En cuanto a los datos de viabilidad embrionaria, la diferencia es de 10 puntos a favor de los embriones procedentes de donantes no fumadoras, resultando en este caso ser estadísticamente significativa la diferencia encontrada.

			Viable		Total
			Viabiles	No viabiles	
Grupos_2	No fumadoras	Recuento	348	247	595
		% dentro de Grupos_2	58,5%	41,5%	100,0%
	Fumadoras	Recuento	447	470	917
		% dentro de Grupos_2	48,7%	51,3%	100,0%
Total	Recuento		795	717	1512
	% dentro de Grupos_2		52,6%	47,4%	100,0%

**Tabla 4.** Tabla de contingencia de los grupos de estudio en la cual se muestran los porcentajes de embriones viables y no viables.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	13,734 <sup>a</sup>	1	,000		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	13,346	1	,000		
Razón de verosimilitudes	13,779	1	,000		
Estadístico exacto de Fisher				,000	,000
N de casos válidos	1512				

a. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 282,15.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**Tabla 5.** Prueba de Chi-cuadrado para el estudio de las tasas de embriones viables.

Finalmente, cuando analizamos la tasa de recién nacido vivo y comparamos la de ambos grupos entre sí, podemos observar una TRN en el caso de las no fumadoras del 45,4% que cae hasta el 39,2% en el caso de las fumadoras, sin embargo esta diferencia no fue lo suficientemente importante como para que fuese estadísticamente significativa.

			Tasa RNV		Total
			0	1	
Grupos_2	No fumadoras	Recuento	71	59	130
		% dentro de Grupos_2	54,6%	45,4%	100,0%
	Fumadoras	Recuento	129	83	212
		% dentro de Grupos_2	60,8%	39,2%	100,0%
Total	Recuento		200	142	342
	% dentro de Grupos_2		58,5%	41,5%	100,0%

**Tabla 6.** Tabla de contingencia del grupo 2 de estudio en la cual se muestran los porcentajes de recién nacido vivo.

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)	Sig. exacta (bilateral)	Sig. exacta (unilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	1,290 <sup>a</sup>	1	,256		
Corrección por continuidad <sup>b</sup>	1,046	1	,306		
Razón de verosimilitudes	1,286	1	,257		
Estadístico exacto de Fisher				,261	,153
Asociación lineal por lineal	1,286	1	,257		
N de casos válidos	342				

a. 0 casillas (0,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es 53,98.

b. Calculado sólo para una tabla de 2x2.

**Tabla 7.** Prueba de Chi-cuadrado para el estudio de las tasas de recién nacido vivo

En el análisis realizado, a pesar de que no se encontró una significación estadística clara en cuanto a las tasas de implantación y las tasas de recién nacido vivo, es posible observar una tendencia favorable hacia las pacientes no fumadoras en comparación al grupo de las pacientes fumadoras.

Una de las observaciones fue que, en las pacientes no fumadoras, las tasas de blastocisto viable eran superiores a las del grupo de pacientes fumadoras. Esto sugiere que un mayor número de embriones viables resultaría en un efecto positivo para las tasas de las pacientes no fumadoras.

### **Conclusión**

El estudio realizado evidencia el impacto perjudicial del consumo de tabaco, en los parámetros morfocinéticos y fisiología de los aspectos reproductivos de la mujer. A través del estudio de los distintos parámetros obtenidos gracias a las tecnologías time-lapse, se observaron diferencias notables entre las mujeres fumadora y no fumadoras. Se demostró que las etapas tempranas y tardías del desarrollo embrionario eran potencialmente más afectadas por las toxinas del tabaco, siendo significativas aquellas relacionadas con el reinicio de la meiosis, la singamia, la aparición de los corpúsculos polares, la duración de determinados ciclos celulares, el inicio de la compactación celular, la formación de la mórula y la expansión de blastocisto, las cuales mostraron mayores alteraciones en el grupo de los pacientes fumadores. Estas observaciones se traducen en posibles efectos perjudiciales del tabaco en la calidad ovocitaria y la viabilidad embrionaria, afectado al mismo tiempo a las tasas de implantación, gestación y recién nacido vivo.

Las tasas relacionadas con la viabilidad embrionaria, tasas de implantación y recién nacido vivo no fueron tan claras, pero en base al análisis realizado de los diferentes datos obtenidos, sugieren una reducción de las tasas en las mujeres fumadoras en comparación a las no fumadoras. Por lo que, se incentiva la hipótesis de que el tabaco afecta perjudicialmente a los aspectos reproductivos de la mujer, tanto la calidad ovocitaria como posibilidades de implantar y obtener un recién nacido vivo, aunque sería necesario aumentar el número de embriones analizados para comprobar que estas tendencias se confirman de manera estadísticamente significativa.

Es de gran importancia resaltar los efectos negativos del tabaco, ya se tenga contacto directo o indirecto en el día a día. Este es perjudicial para todo ser humano,

incluyendo a mujeres en edad reproductiva. Es importante comprender el impacto que pueden tener las toxinas del tabaco en los tratamientos de reproducción asistida, por ello es de gran importancia que los pacientes estén informados de los efectos perjudiciales que esto pueden llegar a tener potencialmente tanto en la salud general, como en los factores reproductivos como puede ser la calidad embrionaria. Es importante educar tanto a las pacientes que van a utilizar sus propios ovocitos para realizarse un TRA, como aquellas que van a recurrir a ovocitos de donante y por tanto también a las donantes de ovocitos sobre los diferentes riesgos del tabaco y de los beneficios de dejar de fumar previo a un tratamiento de reproducción asistida y para llevar una vida más sana.

En conclusión, tras la realización del estudio, el tabaquismo resulta ser perjudicial para la salud reproductiva de la mujer. Es por ello por lo que la recomendación por parte del personal médico deberá ser aconsejar a las pacientes dejar de fumar, para así reducir riesgos tanto para la vida de la mujer gestante como para la del bebe. Tras el análisis estadístico llevado a cabo, las tasas obtenidas tanto a nivel ovocitario y embrionario como a nivel de resultados clínicos, indican que lo mejor para un desarrollo embrionario optimo es evitar el consumo de tabaco, esto incluye a las mujeres jóvenes que deciden donar sus ovocitos a otras mujeres. En base a los resultados obtenidos en el estudio, sea cual sea la cantidad de cigarrillos consumidos diariamente, el tabaco muestra tener efectos perjudiciales durante los ciclos reproductivos llevados a cabo con ovocitos de donantes fumadoras, en comparación a aquellos procedentes de ovocitos de donantes no fumadoras.

Para una comprensión más directa y breve del trabajo realizado, a continuación, se presentan las principales conclusiones obtenidas del estudio:

- Los primeros eventos del desarrollo embrionario presentan tiempos más largos en donantes no fumadoras, lo que puede significar un mayor tiempo de replicación.
- Los tiempos de singamia resultaron ser más largos en las donantes no fumadoras, traduciéndose en un mayor tiempo de replicación de DNA, disminuyendo las probabilidades de una replicación errónea o incompleta.
- Los tiempos obtenidos de las fases específicas del desarrollo embrionaria desde la aparición del primer corpúsculo polar hasta la primera división celular resultaron ser más largos en las donantes no fumadoras, lo cual podría ser beneficioso para realizar la primera división embrionaria que además conlleva la singamia nuclear.

- Los tiempos de división entre las etapas T2 y T8 no mostraron una diferencia significativa, sugiriendo un mayor efecto del tabaquismo sobre las etapas temprana del desarrollo que los procesos entre T2 y T8 que se muestran más resistentes a factores tóxicos, como en este caso los del tabaco.
- Se observó un menor tiempo de CC4 en las no fumadoras, lo cual podría traducirse en una mejor competencia embrionaria.
- La exposición a sustancias tóxicas como el tabaco pueden provocar un retraso de los eventos críticos del desarrollo como son la compactación y la activación genómica embrionaria debido a un efecto deletéreo en la maquinaria celular.
- Un tiempo de expansión más rápido obtenido del grupo de no fumadoras, sugiere que los embriones procedentes de este grupo están más capacitados para realizar funciones metabólicas.
- En cuanto a las tasas de implantación, tasa de embriones viables y las tasas de recién nacido vivo, presentaban una tendencia favorable hacia las pacientes no fumadoras en comparación al grupo de las pacientes fumadoras, aunque no en todos los casos las diferencias son significativas, necesitando ampliar el estudio para poder verificar esta tendencia.

### **Agradecimiento**

Me gustaría agradecer a mi tutor de mi trabajo de fin de master David Agudo Garcillán por su disponibilidad y atención durante este periodo del año. También quiero agradecer a Mónica Martínez, Jessica Alonso y al resto del equipo de la clínica IVI Madrid por el buen trato y por dedicarme el tiempo para poder formarme como embrióloga. Además, agradecer a mi familia por darme la oportunidad de haber estudiado lo que he querido y haber estado a mi lado durante todo este tiempo. Por último, agradecer al resto de mis familiares y mis amigos por apoyarme en todas las decisiones tomadas en mi día a día y hacer este periodo de mi vida más ligero.



### Bibliografía

- Balawender, K., & Orkisz, S. (2020). The impact of selected modifiable lifestyle factors on male fertility in the modern world. *Central European journal of urology*, 73(4), 563–568. <https://doi.org/10.5173/cej.2020.1975>
- Bedenk, J., Vrtačnik-Bokal, E., & Virant-Klun, I. (2020). The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37(1), 89–100. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01622-7>
- Bedoschi, G., Navarro, P. A., & Oktay, K. (2016). Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. *Future oncology (London, England)*, 12(20), 2333–2344. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0176>
- Bordel, R., Laschke, M. W., Menger, M. D., & Vollmar, B. (2006). Nicotine does not affect vascularization but inhibits growth of freely transplanted ovarian follicles by inducing granulosa cell apoptosis. *Human reproduction (Oxford, England)*, 21(3), 610–617. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei393>
- Bori, L., Paya, E., Alegre, L., Vilorio, T. A., Remohi, J. A., Naranjo, V., & Meseguer, M. (2020). Novel and conventional embryo parameters as input data for artificial neural networks: an artificial intelligence model applied for prediction of the implantation potential. *Fertility and sterility*, 114(6), 1232–1241. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.023>
- Chéles, D. S., Ferreira, A. S., de Jesus, I. S., Fernandez, E. I., Pinheiro, G. M., Dal Molin, E. A., Alves, W., de Souza, R. C. M., Bori, L., Meseguer, M., Rocha, J. C., & Nogueira, M. F. G. (2022). An Image Processing Protocol to Extract Variables Predictive of Human Embryo Fitness for Assisted Reproduction. *Applied Sciences*, 12(7), 3531. <https://doi.org/10.3390/app12073531>
- Deatsman, S., Vasilopoulos, T., & Rhoton-Vlasak, A. (2016). Age and Fertility: A Study on Patient Awareness. *JBRA assisted reproduction*, 20(3), 99–106. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20160024>
- Freour, T., Masson, D., Mirallie, S., Jean, M., Bach, K., Dejoie, T., & Barriere, P. (2008). Active smoking compromises IVF outcome and affects ovarian reserve. *Reproductive biomedicine online*, 16(1), 96–102. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60561-5](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60561-5)

- Gardner, D. K., & Sakkas, D. (2023). Making and selecting the best embryo in the laboratory. *Fertility and sterility*, *120*(3 Pt 1), 457–466. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.11.007>
- Grigovich, M., Kacharia, V. S., Bharwani, N., Hemingway, A., Mijatovic, V., & Rodgers, S. K. (2021). Evaluating Fallopian Tube Patency: What the Radiologist Needs to Know. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*, *41*(6), 1876–18961. <https://doi.org/10.1148/rg.2021210033>
- Holesh, J. E., Bass, A. N., & Lord, M. (2023). Physiology, Ovulation. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Hughes, E. G., & Brennan, B. G. (1996). Does cigarette smoking impair natural or assisted fecundity?. *Fertility and sterility*, *66*(5), 679–689. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)58618-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)58618-x)
- Jayaprakasan, K., & Ojha, K. (2022). Diagnosis of Congenital Uterine Abnormalities: Practical Considerations. *Journal of clinical medicine*, *11*(5), 1251. <https://doi.org/10.3390/jcm11051251>
- Jokiniemi, A., Magris, M., Ritari, J., Kuusipalo, L., Lundgren, T., Partanen, J., & Kekäläinen, J. (2020). Post-copulatory genetic matchmaking: HLA-dependent effects of cervical mucus on human sperm function. *Proceedings. Biological sciences*, *287*(1933), 20201682. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.1682>
- Liu, Y., Li, G. P., Rickords, L. F., White, K. L., Sessions, B. R., Aston, K. I., & Bunch, T. D. (2008). Effect of nicotine on in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal reproduction science*, *103*(1-2), 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.11.013>
- Ministerio de Sanidad. (2021). Estudio básico de donantes de gametos (femeninos y masculinos). *Comisión Nacional de Reproducción Humana Asistida*. [https://cnrha.sanidad.gob.es/documentacion/comision/pdf/Estudio\\_Donantes\\_de\\_Gametos.pdf](https://cnrha.sanidad.gob.es/documentacion/comision/pdf/Estudio_Donantes_de_Gametos.pdf)
- Reus Crespo, R., Basile, N., & Mesenguer Escriva, M. (2017). ¿Los Parámetros Morfocinéticos permiten predecir Las aneuploidías embrionarias? *Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana*. <http://www.revistafertilidad.org>

- Zenzes, M. T., Puy, L. A., & Bielecki, R. (1997). Immunodetection of cotinine protein in granulosa-lutein cells of women exposed to cigarette smoke. *Fertility and sterility*, 68(1), 76–82. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(97\)81479-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(97)81479-3)
- Zhang, W., Pang, F., Huang, Y., Yan, P., & Lin, W. (2008). Cadmium exerts toxic effects on ovarian steroid hormone release in rats. *Toxicology letters*, 182(1-3), 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.07.016>