



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CLÍNICA DE REPRODUCCIÓN Y GENÉTICA AGN & ASOC.
HOSPITAL ANGELES DEL PEDREGAL

CALIFICACIÓN DEL CIGOTO COMO FACTOR
PREDICTIVO EN IMPLANTACIÓN

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD EN:
BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

QUE PRESENTA:

DRA. GRACIELA OLIVARES FERNÁNDEZ DE LARA

TUTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO JAVIER GUTIÉRREZ NÁJAR

DR. JACOBO DABBAH MUSSALY



Hospital Angeles

MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. ALFONSO GUTIERREZ NAJAR

Profesor Titular del Curso de Especialización en Biología de la Reproducción
Director General de Clínica de Reproducción y Genética
Hospital Ángeles del Pedregal

DR. JACOBO DABBAH MUSSALY

Asesor de Tesis en Area Clínica
Médico especialista en Biología de la Reproducción
Clínica de Reproducción y Genética
Hospital Ángeles del Pedregal

BIOL. GERARDO VILLEGAS MORENO

Asesor de Tesis en Area de Laboratorio
Jefe del Laboratorio de Fertilización in vitro
Clínica de Reproducción y Genética
Hospital Ángeles del Pedregal

Dedicado a:

Mi pequeño núcleo familiar
Mis Padres, hermanas y Alfredo

Amigos y compañeros
José Medina, Mayí Mayret y Gabriel Cortés

Profesores

Dr. Alfonso Gutiérrez Nájjar, Dr. Jacobo Dabbah Mussaly,
Dr. Héctor S. Godoy Morales, Dra. Socorro Benavides Salazar,
Dra. C. Milagros Pacheco Téllez y Dra. María Elena González Panzzi

Porque gracias a su apoyo incondicional, su paciencia y a un gran
esfuerzo, ha sido posible la realización
De esta tesis.

GRACIAS

Graciela

INDICE

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCION.....	3
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
V. ANTECEDENTES.....	6
A) Meiosis.....	6
B) Ovogénesis.....	8
1. Maduración prenatal de los ovocitos.....	8
2. Maduración postnatal de los ovocitos.....	10
C) Ovocitos.....	12
D) Ovulación.....	14
E) Fertilización.....	16
F) Evaluación del Cigoto.....	19
G) Aplicación de la evaluación del Cigoto	24
H) Implantación.....	25
I) Evaluación de la Calidad del Embrión.....	27
VI. OBJETIVO.....	33
VII. HIPOTESIS.....	33
VIII. JUSTIFICACION.....	33
IX. ALCANCE.....	33
X. MATERIAL Y METODO.....	34
XI. RESULTADOS.....	41
XII. ANALISIS Y DISCUSION.....	53
XIII. CONCLUSIONES.....	56
XIV. ANEXOS.....	58
XV. BIBLIOGRAFIA.....	59

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: De acuerdo al aumento en la frecuencia de embarazos múltiples durante los tratamientos de fertilización in vitro, es necesario un método confiable de selección del cigoto que desarrolle un embrión con máximo potencial de implantación para ser transferido, limitando el número embriones en la transferencia embrionaria sin afectar la tasa de implantación y embarazo.

MATERIAL Y MÉTODOS: En 127 ciclos se aplicó un sistema de clasificación del cigoto en base a los siguientes parámetros: (a) Pronúcleo, (b) Nucleólos, (c) Citoplasma, (d) Cuerpos polares, (e) Espacio Perivitelino, (f) Zona Pelúcida. En base al puntaje obtenido, se calificó al cigoto patrón A, patrón B y patrón C. Se evaluó el patrón de desarrollo de los embriones de acuerdo a los criterios propuestos por Veeck (1999), designando embriones de buena calidad con 1+ y 2+, de calidad intermedia con 3+ y mala calidad con 4+ y 5+. Se utilizó el sistema SPSS versión 11.0 y χ^2 para el análisis estadístico.

RESULTADOS: Se obtuvo una tasa de implantación del 17.7% y un 32.2% de tasa de embarazo en 127 ciclos. De acuerdo al patrón del cigoto del embrión transferido, hay diferencia estadística en el grupo A ($p=0.05$) con respecto al grupo B y C, con una tasa de embarazo del 33.8% y tasa de implantación del 21%.

CONCLUSIONES: Es importante la evaluación y calificación del cigoto para predecir el desarrollo del embrión y su potencial de implantación, con la finalidad de realizar una selección adecuada del embrión a transferir sin afectar la tasa de implantación.

Palabras clave: cigoto, embrión, in vitro, implantación, fertilización, imperfecciones, FIV, ICSI.

II. ABSTRACT

INTRODUCTION: With the increase in the frequency of multiple pregnancies during the treatments of fertilization in vitro, a reliable method of selection of the zygote is necessary that develops an embryo with maximum potential of implantation to be transferred, limiting the number embryos in the embryonic transference, without affecting the rate of implantation and pregnancy.

MATERIAL AND METHODS: In 127 cycles a system of classification of the zygote on the basis of the following parameters was applied: (a) Pronuclear, (b) Nucleoli, (c) Cytoplasmic appearance, (d) Polar Body, (e) Perivitelline Space, (f) Zona Pellucida. On the score was determined as pattern A, pattern B and pattern C were described in zygote. On the embryos we follow the criteria proposed by Veeck evaluated itself (1999), designating embryos of good quality with 1+ and 2+, intermediate quality with 3+ and bad quality with 4+ and 5+. For the statistical analysis it was used system SPSS.

RESULTS: We found a rate of implantation of the 17,7% and 32,2% rate of pregnancy in 127 cycles. According to the pattern of the zygote of the transferred embryo, there is statistical difference in group A ($p=0.05$) besides group B and C, with a rate of pregnancy of the 33,8% and rate of implantation of 21%.

CONCLUSIONS: Evaluation of the best embryos before transfer It is important to predict the potential of implantation and further pregnancy. This evaluation should start with the qualification of the zygote and subsequent development.

Key words: zygote, embryo, in vitro, implantation, fertilization, imperfection, IVF, ICSI.

III. INTRODUCCIÓN

La eficiencia de la fertilización in vitro (FIV) y la transferencia de embriones (TE) en el humano es baja, aproximadamente el 30% de los embriones que se transfieren llegan a un desarrollo completo para lograr su implantación (1). Desde los inicios de la reproducción asistida, se han realizado transferencias embrionarias con múltiples embriones, con la finalidad de aumentar la posibilidad de un embarazo. Esto ha conducido, a un inaceptable aumento en los embarazos de alto orden fetal. Para abordar este problema, algunos países han mantenido un número limitado de embriones a transferir y en algunos casos limitando a un solo embrión en grupos de cierta edad. Aunque, esto reduciría el número de embarazos múltiples, también puede reducir la tasa de embarazo.

Es necesario un método confiable de selección del embrión con mayor potencial de implantación, permitiendo con ello, reducir el número de embriones a transferir sin comprometer a la paciente (1).

Inicialmente, la mayoría de las clínicas de infertilidad transferían embriones en 2° día (estadio de 2-4 células). Dawson demostró un incremento en las tasas de implantación al permitir el desarrollo hasta el 3° día (estadio de 6-8 células), logrando observar mayores datos morfológicos en la división celular. El parámetro más utilizado para asegurar la mayor probabilidad de éxito, se basa en las características morfológicas del embrión en 2° ó 3° día post-inseminación (4). Sin embargo, incluso un buen sistema de calificación en 3° día no puede dar un pronóstico específico de la habilidad del embrión para implantarse. Por ejemplo, dos embriones de 8 células que lucen idénticos, no necesariamente tiene el mismo potencial de implantación, como se evidencia en la tasa baja de implantación de embriones transferidos (5).

Con la introducción de medios de cultivo secuenciales ha sido posible el desarrollo del embrión a blastocisto (5° ó 6° día). Con embriones en estadio de blastocisto se tienen las siguientes ventajas: selección natural del embrión, mejor sincronización embrión-endometrio y mayores tasas de implantación (2) (3). Un aspecto desalentador, solamente el 40-50% de todos los ovocitos fertilizados colocados en medios de cultivo secuenciales llegan a la etapa de blastocisto y de estos solo el 30-50% se implanta. Esto implica que los medios de cultivo adecuados y la transferencia de blastocistos no es tan eficiente en un programa de FIV (1).

La morfología de los ovocitos humanos fertilizados ha sido utilizada exitosamente como un criterio de selección para su transferencia. La calificación del pronúcleo ha permitido el uso de menos embriones, además se le ha relacionado con la integridad cromosomita del embrión, ya que se les ha relacionado con ciertas anomalías en el pronúcleo.

No hay estudios que demuestran una clara relación entre las características morfológicas del ovocito con su potencial de desarrollo, Por este motivo el presente estudio pretende combinar las características morfológicas de un óvulo fertilizado (cigoto) con las características morfológicas propias de un ovocito (citoplasma, cuerpo polar, espacio perivitelino y zona pelúcida) con la finalidad de seleccionar un cigoto que desarrollara un embrión con mayor potencial de implantación.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Establecer parámetros adecuados basados en evidencia para calificar y seleccionar el mejor embrión con potencial de implantación.

La meta es unificar criterios para lograr la transferencia embrionaria de un solo embrión: un óvulo, un espermatozoide, un embrión, un bebé.

Es necesario unificar criterios para determinar un único sistema de calificación morfológico para optimizar resultados, permitiendo disminuir el número de embriones a transferir, manteniendo las tasas de implantación y embarazo, sin poner en riesgo la salud materno-fetal.

V. ANTECEDENTES

La gametogenia (formación de gametos) es el proceso de formación y desarrollo de las células germinativas especializadas. Los gametos mediante la meiosis, con la reducción del número de diploide a haploide aseguran la constancia del número de cromosomas de generación en generación, permitiendo la distribución aleatoria de cromosomas maternos y paternos en los gametos y recolocando segmentos a través del entrecruzamiento cromosómico, lo que mezcla los genes y produce la recombinación del material genético.

El desarrollo humano comienza con la fecundación cuando un gameto masculino o espermatozoide se une con un gameto femenino u ovocito (óvulo) para formar una única célula: el cigoto, célula totipotencial de gran especialización que nos constituye como individuos únicos. El cigoto, contiene cromosomas y genes (unidades de información genética) que proceden de la madre y el padre. El cigoto unicelular se divide numerosas veces y se transforma progresivamente en un ser humano multicelular mediante división, migración, crecimiento y diferenciación celular.

A) MEIOSIS

División celular que tiene lugar únicamente en células germinativas. La primera división meiótica reduce el número de cromosomas mediante la formación de pares de cromosomas homólogos en la profase y su separación en la anafase (**Fig.1**). Los cromosomas homólogos (uno de cada progenitor), migran a cada polo del huso meiótico. Al finalizar la primera división meiótica, cada nueva célula formada (espermatozocito secundario u ovocito secundario) tienen un número cromosómico haploide, la mitad del número de la célula progenitora (espermatozocito primario u ovocito primario). La segunda división meiótica se produce sin una etapa de replicación del ADN. Cada cromosoma se divide y cada mitad, o cromátida, se acerca a un polo distinto, y el número haploide de cromosomas se mantiene y cada célula hija formada cuenta con el número cromosómico haploide (**Fig.2**).

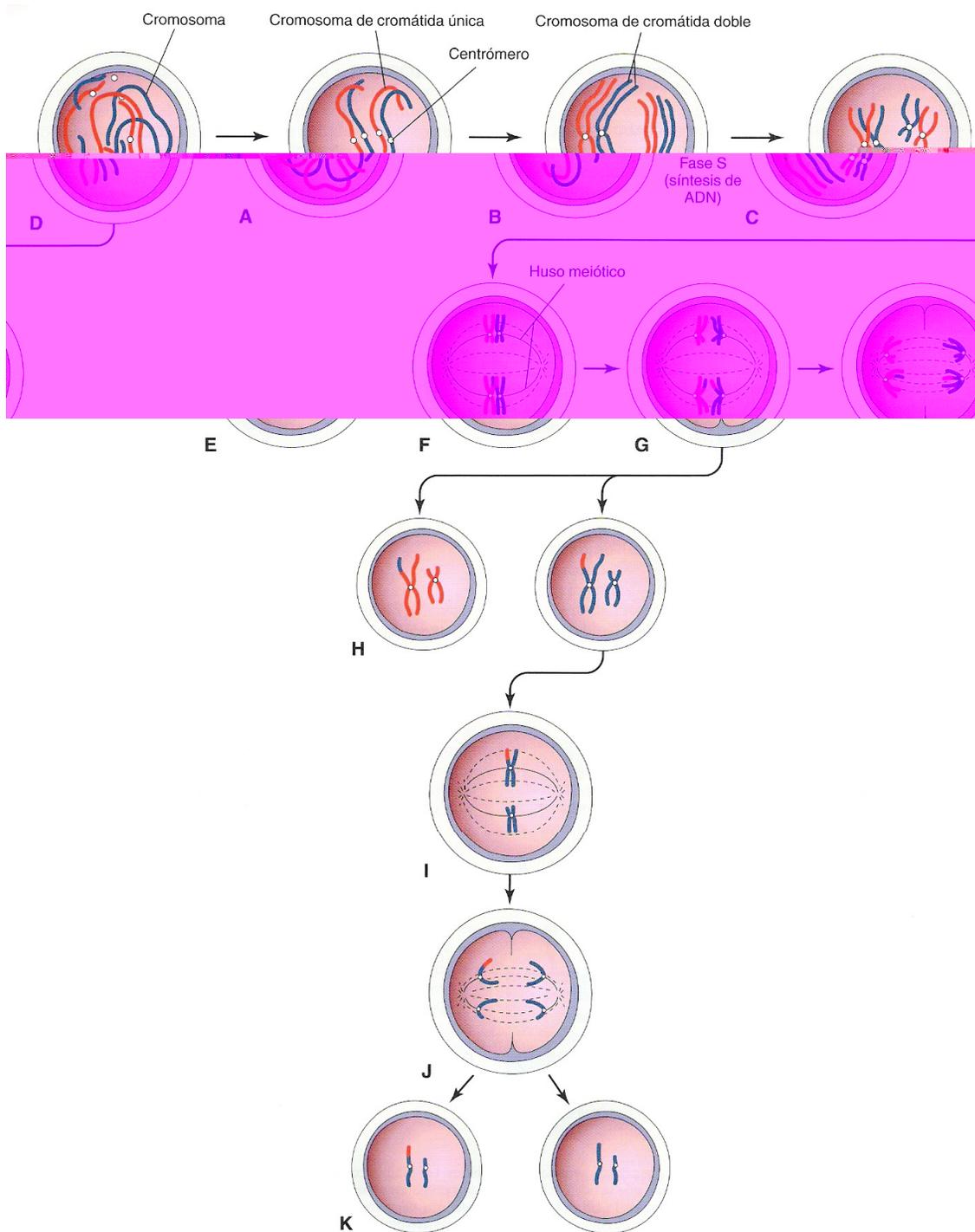


Fig. 1 Diagrama de la Meiosis. Se muestran dos pares de cromosomas. A - D, etapas de la profase de la primera división meiótica. Los cromosomas homólogos se acercan entre sí y forman parejas; cada miembro del par está formado por dos cromátidas. Entrecruzamiento único entre un par de cromosomas que comparta el intercambio se segmentos de cromátidas. E, Metafase. Los dos componentes de cada par se orientan en el huso meiótico. F, Anafase. G, Telofase. Los cromosomas migran a polos opuestos. H, distribución de los cromosomas de los padres al final de la primera división meiótica. I - K, segunda división meiótica. Es semejante a la mitosis excepto que las células son haploides.

B) OVOGÉNESIS

Es la secuencia de acontecimientos por medio de los cuales las ovogonias se transforman en ovocitos maduros. Este proceso de maduración se inicia antes del nacimiento, finaliza después de la pubertad (12-15 años) y continúa hasta la menopausia.

1. Maduración Prenatal de los Ovocitos

Durante la vida fetal, las ovogonias proliferan por división mitótica. El tamaño de las ovogonias aumenta para formar ovocitos primarios antes del nacimiento.

A medida que se forma un ovocito primario, es rodeado por una monocapa de células epiteliales foliculares aplanadas, constituyendo un folículo primordial. Mientras el ovocito primario aumenta de tamaño durante la pubertad, las células epiteliales adquieren forma de cubo y, posteriormente, cilíndrica, constituyendo un folículo primario.

El ovocito primario es rodeado rápidamente por una cubierta de material glicoproteico, acelular, amorfo, llamado zona pelúcida. Cuando el folículo primario cuenta con más de una capa de células foliculares se denomina folículo secundario. El ovocito primario comienza la primera división meiótica antes del nacimiento, sin embargo, la profase no finaliza hasta la adolescencia (entre 11 y 19 años). Se cree que las células foliculares que rodean el ovocito primario secretan una sustancia, el inhibidor de la maduración del ovocito (IMO) que mantiene detenido el proceso meiótico (**Fig. 2**).

GAMETOGENIA NORMAL

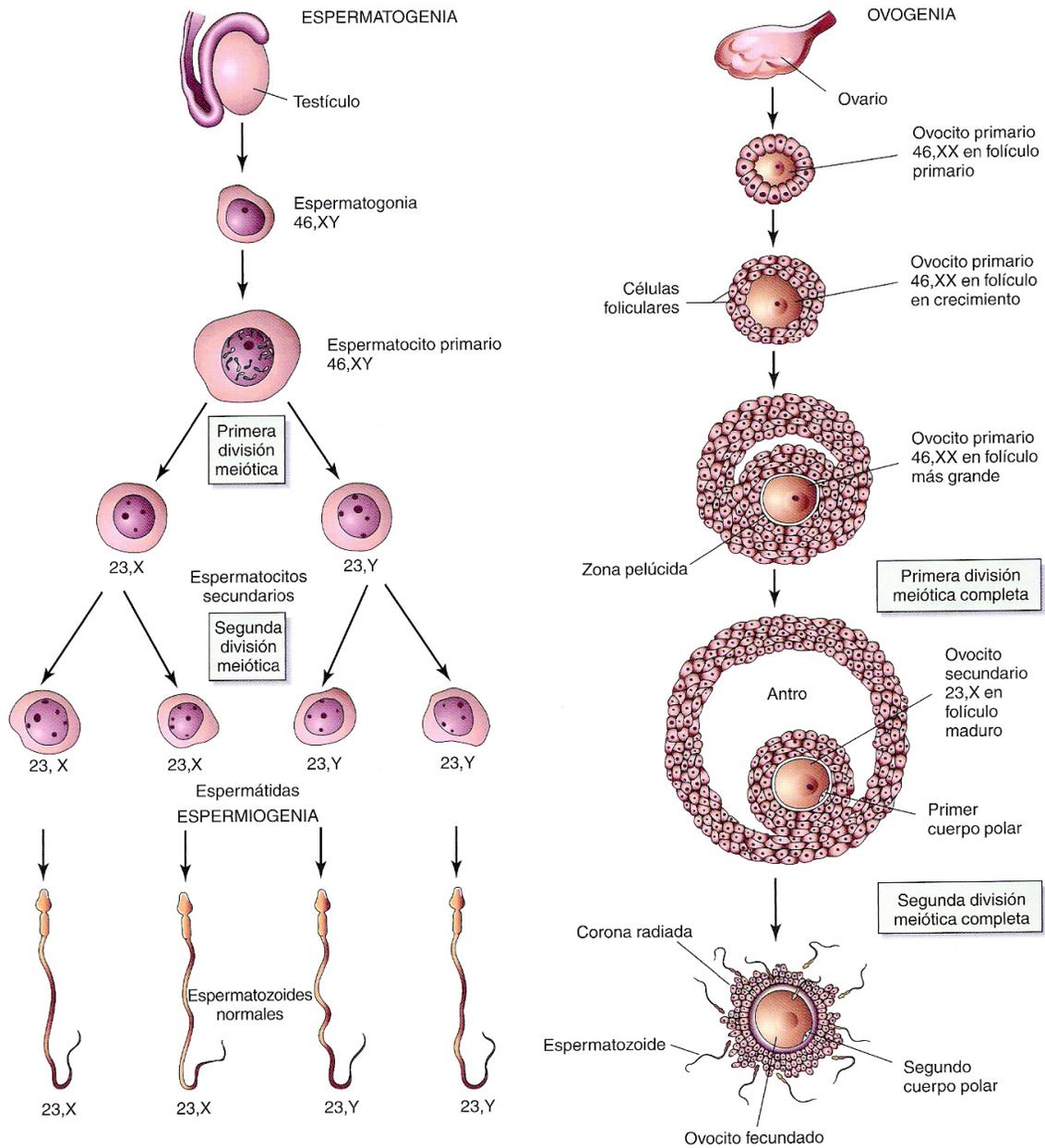


Fig. 2 Gametogenia normal: conversión de células germinales en gametos. Se compara la espermatogenia y la ovogenia. Las ovogonias no aparecen en esta figura debido a que se diferencian en ovocitos primarios antes del nacimiento. En cada etapa se muestra el complemento cromosómico de las células germinales. Después de las dos divisiones meióticas, el número de 46 cromosomas, se reduce al número haploide de 23 cromosomas. A partir de un espermatocito primario se forman 4 espermatozoides, mientras que la maduración de un ovocito primario origina solamente un ovocito maduro (6).

2. Maduración Postnatal de los Ovocitos

Al inicio de la pubertad, habitualmente un folículo madura cada mes y se produce la ovulación. La prolongada duración de la primera división meiótica podría explicar en parte la frecuencia relativamente alta de errores meióticos, como la no disyunción (falta de separación de las cromátidas), que suceden al aumentar la edad de la madre.

Los ovocitos primarios en profase I interrumpida (dictiotena) son susceptibles frente a agentes ambientales como la radiación. Después del nacimiento no se forman ovocitos primarios en las mujeres, a diferencia de la producción continua de espermatozoides primarios en varones. Los ovocitos primarios se mantienen en estado de latencia en los folículos ováricos hasta la pubertad.

A medida que madura el folículo, el tamaño del ovocito primario aumenta y, poco después de la ovulación, termina la primera división meiótica. Sin embargo, contrario de lo que sucede en la etapa correspondiente de la espermatogénesis, la división del citoplasma es desigual.

El ovocito secundario recibe la mayor parte del citoplasma y el primer cuerpo polar no recibe prácticamente nada de éste. Este cuerpo polar es una célula pequeña que degenera rápidamente. Durante la ovulación, el núcleo del ovocito secundario comienza la segunda división meiótica, pero avanza solamente hasta la metafase, momento en que se interrumpe la división.

Si un espermatozoide penetra en el ovocito secundario, concluye la segunda división meiótica y la mayor parte del citoplasma es retenido de nuevo por una célula, el ovocito fecundado. La otra célula, el segundo cuerpo polar, degenera pronto. La maduración del ovocito se completa en cuanto el cuerpo polar se elimina (**Fig. 2**)(6).

Entre la 6° a 8° semana de gestación, el primer signo de diferenciación ovárica se refleja en la rápida división mitótica de las células germinales, alcanzando las ovogonias un total de 6-7 millones hacia la semana 20° de gestación (**Fig.3**), esto representa la cifra máxima de ovogonias contenidas en la gónada.

Existen unos 2 millones de ovocitos primarios en los ovarios de una mujer recién nacida, Esta desaparición masiva de células germinales (cerca de 4-5 millones) ocurre en un período de tan solo 20 semanas, esto representa el 80% de los ovocitos, en ningún otro momento de la vida de una mujer se produce una depleción tan elevada de células germinales, muchos involucionan durante la infancia.

Al llegar a la pubertad, la masa de células germinales se ha reducido a 300,000 unidades. De ellos, únicamente alrededor de 400-500 se convierten en ovocitos secundarios y son expulsados durante la ovulación en el período reproductivo (por 35-40 años) (7).

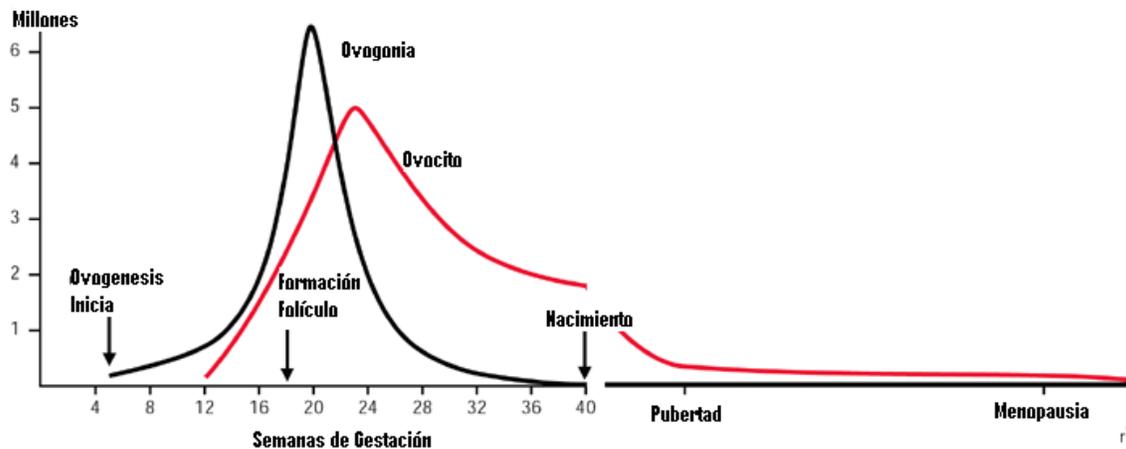


Fig. 3 Multiplicación de Ovogonias y ovocitos primarios durante el ciclo de vida de una mujer. Ovogénesis inicia en la 6°-8° semana de gestación, en la 16°- 20° semana existen entre 6-7 millones de ovogonias. Desde este punto en el tiempo las células germinativas disminuyen irreversiblemente hasta que aproximadamente 50 años después la reserva ovárica se agota (7).

C) OVOCITOS

El desarrollo folicular se caracteriza por: crecimiento y diferenciación del ovocito primario, proliferación de células foliculares, formación de la zona pelúcida y desarrollo de la teca folicular. A medida que el folículo primario aumenta de tamaño, el tejido adyacente se organiza para formar una cápsula (teca folicular), que se diferencia en dos capas, una capa interna vascular y glandular (teca interna) y una capa semejante a una cápsula (teca externa). Las células foliculares se dividen de forma activa para producir una capa estratificada alrededor del ovocito. El folículo ovárico pronto adquiere forma ovalada y el ovocito se sitúa en posición excéntrica. Posteriormente aparecen espacios llenos de líquido alrededor de las células foliculares, que se unen para formar una única cavidad de gran tamaño, antro, que contiene líquido folicular, en este momento se denomina folículo secundario o vesicular.

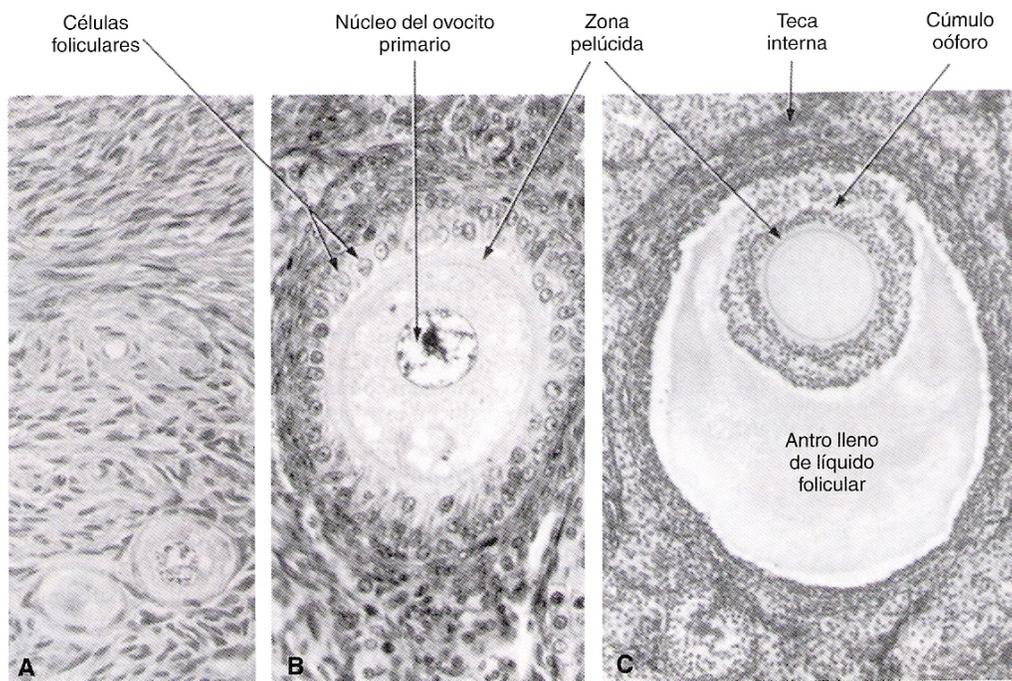


Fig. 4 Microfotografía de cortes de ovarios adultos humanos. A, corteza ovárica que muestra dos folículos primordiales que contienen ovocitos primarios (x250). B, Folículos en crecimiento que contiene un ovocito primario rodeado de la zona pelúcida y una capa estratificada de células foliculares (x250). C, Folículo casi maduro con un antro de gran tamaño. El ovocito, incluido en el cúmulo oóforo, no tiene núcleo debido a que se ha cortado de forma tangencial (x100) (6).

El ovocito primario es desplazado a un lado del folículo, donde es rodeado por un montículo de células foliculares, el *cúmulo oóforo*, que se proyecta hacia el antro (**Fig. 4**). El tamaño del folículo sigue creciendo hasta alcanzar la madurez, se evidencia por producir un abultamiento en la superficie del ovario, aproximadamente alrededor de 14° día en un ciclo menstrual de 28 días (6).

El desarrollo de un ovocito maduro dentro de un folículo es una compleja y coordinada serie de eventos que terminan con la ovulación, cuando el ovocito se encuentra rodeado por las células de la granulosa, entra a la trompa de falopio en espera de ser fertilizado. Su maduración nuclear, citoplasmática y el crecimiento y diferenciación de las células somáticas en el folículo juegan un papel crucial en su formación. Los eventos relacionados con la maduración nuclear son la primera división meiótica y su progresión a metafase II. La maduración citoplasmática incluye todos los eventos que preparan al ovocito para una fertilización exitosa, incluyendo la adquisición de la zona pelúcida, formación de gránulos corticales y la habilidad de liberarlos a ellos y al calcio, los cambios mitocondriales, síntesis de proteínas relacionadas con el crecimiento del ovocito y cambios del citoesqueleto. Si esto no es sistemático, las etapas finales del desarrollo y maduración del ovocito no ocurrirán correctamente.



Fig. 5 Cigoto con cuerpo polar.

Ha sido reportado, que la morfología de el primer cuerpo polar esta relacionada con la calidad del ovocito. Esta estructura empieza a dividirse y se desintegra con el tiempo. Es un evento natural y controlado, se completa en aproximadamente 20 horas después de su extrusión. Cuando se realiza el método de inyección intracitoplasmática del esperma (ICSI), el primer cuerpo polar puede ser fácilmente visualizado y evaluado. Esto no ocurre en la fertilización normal de los ovocitos, ya que el cuerpo polar únicamente se puede visualizar después de la fertilización (**Fig. 5**). Los ovocitos con cuerpo polar redondo u ovalado sin fragmentación han demostrado tener relación con aumento de la tasa de implantación, un cuerpo polar anormal pueden indicar alteraciones a nivel celular o molecular. Las anomalías del cuerpo polar incluyen: fragmentación, tamaño anormal y degeneración de su membrana celular (1).

D) OVULACIÓN

En la especie humana, la ovulación se produce en cada ciclo reproductor y se desencadena por un pico luteinizante (LH) producida por la hipófisis. Es un requisito para la fecundación y posteriormente el desarrollo embrionario. El pico de LH estimula en los folículos preovulatorios una cascada de enzimas proteolíticas, entre ellas el activador del plasminógeno (PA), la plasmita y las metaloproteinasas matriciales (MMP). Estas enzimas producen la degradación del estroma perifolicular y la descomposición del entramado de fibras de colágeno que proporciona la fuerza de la pared folicular. El bloqueo farmacológico de alguna de estas enzimas provoca una reducción de la tasa de ovulación. El incremento de la actividad proteolítica ovárica asociada con la ovulación es controlado por inhibidores específicos locales, como el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) y el inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP). El incremento de la síntesis de estos dos inhibidores de las proteinasas en la teca de los folículos en crecimiento asegura su desarrollo, protegiéndolos de las enzimas que difunden desde los folículos ovulatorios.

La estimulación de la ovulación por las gonadotropinas provoca un incremento del flujo folicular sanguíneo e hiperemia, aumentando la permeabilidad vascular, y un incremento marcado del volumen folicular. Estos mediadores permiten una estrecha coordinación entre las dos cascadas, que culmina con la ruptura de la pared del folículo.

El pico ovulatorio de la LH induce en los folículos preovulatorios una multitud de cambios bioquímicos y biofísicos. En términos de respuesta biológica, se pueden distinguir cuatro procesos distintos: 1) continuación de la maduración ovocitaria, 2) luteinización del folículo y de su secreción de estrógenos al cuerpo lúteo, con predominio de la secreción de progesterona, 3) maduración del cúmulo y 4) ruptura de la pared folicular y liberación del óvulo maduro potencialmente fecundable. La ruptura de la pared folicular durante la ovulación es sólo una de las múltiples respuestas foliculares iniciadas tras el pico de gonadotropinas (7).

El cuerpo lúteo humano es una glándula endocrina transitoria que se origina en las células del folículo preovulatorio. Su génesis comienza con la ovulación y persiste funcionalmente activo durante 14-16 días en ciclos no conceptionales. Durante la vida del cuerpo lúteo se producen diversos acontecimientos biológicos para el proceso reproductor, que son regulados, en parte, por sus secreciones hormonales. La fase inicial de su actividad, el transporte de los gametos, la fertilización, las primeras divisiones celulares del embrión preimplantatorio, y su transporte a través de la trompa de Falopio constituyen los sucesos biológicos reproductivos más importantes. Si se produce la implantación en la fase lútea intermedia, el cuerpo lúteo es "rescatado" por la hormona gonadotropina coriónica (hCG), manteniéndose hormonalmente activo durante las 12 primeras semanas de gestación. En caso contrario, su actividad funcional decrece, iniciándose un proceso denominado luteólisis o regresión lútea. La luteólisis es un proceso necesario para la normalidad del ciclo reproductivo en los primates, constituyendo un suceso determinante en la finalización de un ciclo menstrual no conceptional, permitiendo la iniciación de un nuevo ciclo potencialmente fértil (8).

E) FERTILIZACIÓN

Constituye una secuencia compleja de sucesos moleculares combinados que se inicia con el contacto entre un espermatozoide y un ovocito, termina con la mezcla de los cromosomas maternos y paternos (**Fig. 6**). El ovocito es activado por la entrada del espermatozoide, ya sea por una fertilización natural o artificial (FIV/ICSI).

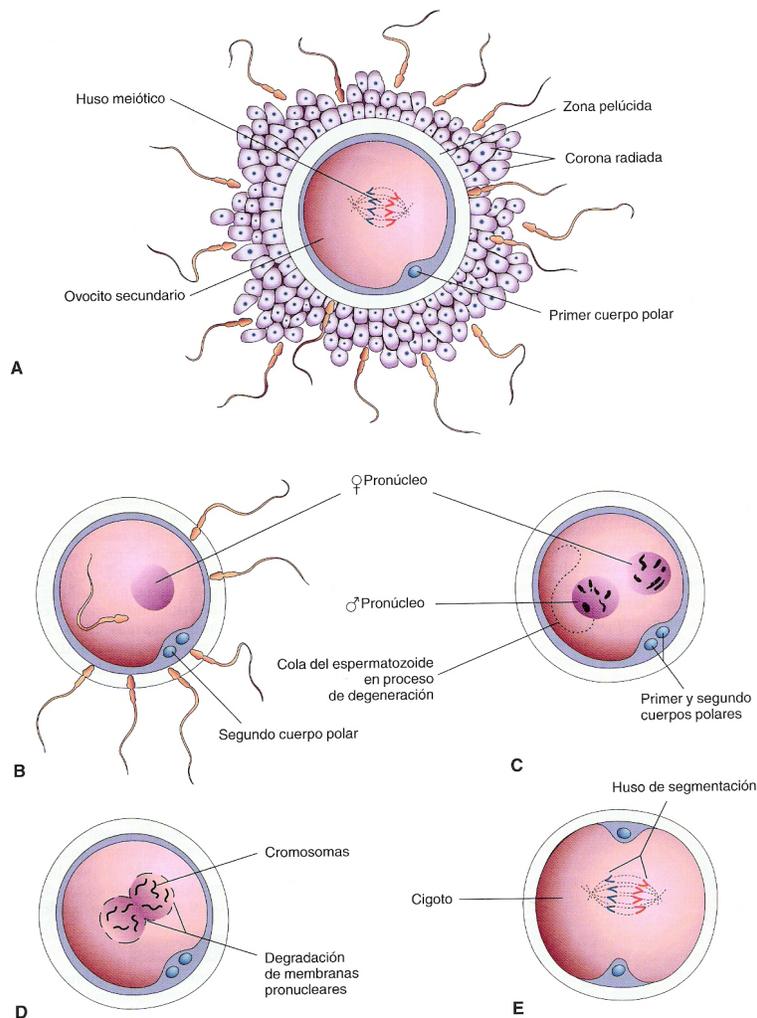


Fig. 6 Fecundación: **A**, ovocito secundario rodeado de espermatozoides, dos de los cuales han penetrado en la corona radiada. **B**, la corona radiada ha desaparecido, un espermatozoide ha penetrado en el ovocito y ha tenido lugar una segunda división meiótica, formando un ovocito maduro. El núcleo del ovocito es el pronúcleo femenino. **C**, la cabeza del espermatozoide ha aumentado de tamaño para originar el pronúcleo masculino, esta célula contiene los pronúcleos masculino y femenino. **D**, fusión de los pronúcleos. **E**, se ha formado el cigoto, contiene 46 cromosomas, el núcleo diploide (6).

La activación son eventos que resultan en la liberación de los gránulos corticales, activación de la membrana por ATP, la terminación de la meiosis, la formación del pronúcleo femenino y masculino con la salida del segundo cuerpo polar y finalmente la primera división mitótica que da como resultado un embrión de 2 células. En fertilización humana, el centriolo es derivado del espermatozoide, esta estructura es responsable de unir a los pronúcleos femenino y masculino (1).

Esta activación es necesaria para que el espermatozoide penetre en la zona pelúcida y se fusione con la membrana plasmática ovocitaria. En el momento en que se realiza el contacto directo se activa el gameto femenino.

El elemento regulador clave en el proceso es el ion calcio, de forma que un aumento masivo de la concentración de calcio intracelular libre, producido mediante factores específicos en ambos gametos, pueden iniciar una serie de reacciones bioquímicas en cadena, que conducen a los respectivos efectos biológicos.

La naturaleza ha elaborado numerosos y eficaces mecanismos que aseguran que cada uno de los dos gametos puedan ser activados en un momento adecuado. Estos dependen de la función de los receptores de membrana, que están acoplados a los correspondientes efectores mediante vías de señalización intracelular.

La activación del ovocito se realiza mediante el conjunto de reacciones en cadena, iniciadas por el espermatozoide durante el proceso de fecundación, que asegura el bloqueo contra la poliespermia y pone en marcha el ciclo celular del futuro embrión. La fusión del espermatozoide con el ovocito provoca un rápido aumento de la concentración de calcio libre. Las elevaciones del calcio producen un incremento de la conductancia de la membrana plasmática para el ion K^+ , lo que provoca la hiperpolarización de la membrana plasmática.

En consecuencia, la fecundación en los mamíferos induce una larga serie de hiperpolarizaciones repetitivas de la membrana plasmática y cada hiperpolarización coincide con un pico de calcio intracelular. Al realizar el método de ICSI se produce una oscilación del calcio libre intracelular, típica de la activación, sin que exista contacto directo entre las membranas plasmáticas de ambos gametos.

Estas observaciones apuntan hacia la existencia de otro mecanismo de activación del ovocito humano, mediado por un factor soluble que se libera del espermatozoide en el ovoplasma, este factor aún no se ha identificado, aunque existen datos que sugieren que se trata de una proteína con un peso molecular de más de 100 kDa (10).

Las causas más frecuentes de los fallos en la fecundación después de ICSI son los posibles problemas en la activación ovocitaria. Además de causar problemas en la fecundación, algunas anomalías de la activación ovocitaria pueden manifestarse posteriormente durante el desarrollo embrionario.

Es posible que el ligero aumento de las anomalías cromosómicas tras la ICSI esté relacionado con una forma atípica de activación ovocitaria, propia de dicha técnica de reproducción asistida (10).

El ovocito fecundado avanza durante sus 3 días de vida por la trompa, mientras se producen sucesivas divisiones celulares. En el estadio de mórula alcanza el útero, y allí continúa su desarrollo hasta el estadio de blastocisto, implantándose entre el 5° y 6° día de su desarrollo.

F) EVALUACIÓN DEL CIGOTO

La evaluación incluye un cuidadoso análisis del pronúcleo y los nucleolos dentro del núcleo en una sola observación entre 16-18 horas posterior a la inseminación. Si es posible seguir el proceso desde la formación del pronúcleo hasta la primera división embrionaria, se podrá obtener más información.

El pronúcleo es el primer signo detectado de fertilización. Los dos pronúcleos deben aparecer al mismo tiempo y estar juntos, la ausencia de lo anterior, indica alguna disrupción en la formación de los microtúbulos dentro del citoesqueleto, lo cual lleva a un desarrollo anormal del cigoto, estos embriones difícilmente tienen un desarrollo adecuado.

Cada pronúcleo debe tener aproximadamente el mismo tamaño y su posición dentro del ovocito fertilizado es importante para su evaluación (**Fig.7**). Los ovocitos fertilizados con pronúcleos de diferentes tamaños tienen una incidencia del 87% de presentar anomalías cromosómicas.



Fig. 7 Cigoto con pronúcleos alineados y simétricos con igual número de nucleolos alineados.

Conforme se va dando el proceso de fertilización los microtúbulos van empujando el pronúcleo femenino hacia el pronúcleo masculino. El pronúcleo masculino se mueve hacia una posición central dentro del ovocito, dentro de las 16-18 horas posterior a la inseminación por ICSI. Los ovocitos fertilizados con pronúcleos no alineados tienen una alta probabilidad de ser anormales (1).

Dentro del núcleo se encuentran los nucleolos. Todas las células mitóticamente activas tienen nucleolos, el sitio donde se realiza la transcripción de los genes ribosomales. Generalmente hay entre 3-7 nucleolos en cada núcleo y en igual número en las dos células hijas en cada división mitótica. Durante la mitosis los nucleolos se fusionan, con una sincronía en el número y en la forma en que lo realizan, cuando hay una falla en la sincronización indica una aberración en la fusión de los cromosomas. Otro aspecto de una anomalía morfológica en los nucleolos es la presencia de fragmentación, resultando en un aumento de cuerpos densos en la célula (**Fig. 8**).

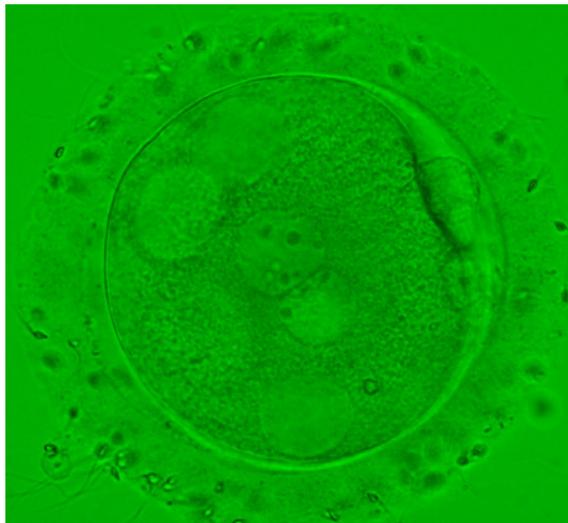


Fig. 8 Cigoto con pronúcleos no alineados de tamaños diferentes, con un número desigual de nucleolos asimétricos

El nucleolo está involucrado en el control del ciclo celular, ya que, se localizan dentro de ellos proteínas reguladoras del crecimiento. El desarrollo completo y activación del nucleolo ocurre durante los primeros ciclos de división mitótica del embrión. El nucleolo está completamente funcional en cuanto se da la activación del genoma embrionario (1).



Fig. 9 Cigoto con 2 pronúcleos centrales con nucleolos alineados

El tamaño, número y distribución de los nucleolos dentro del núcleo del ovocito fertilizado, en una sola observación entre las 16-18 horas posterior a la inseminación/ICSI, forman el aspecto central de la evaluación del pronúcleo (**Fig. 9**).

Existen sistemas de evaluación ya establecidos. Scott y colaboradores (2003) clasifican al ovocito fertilizado en Z1, Z2, Z3 ó Z4 dependiendo de sus características (**Fig 10**).

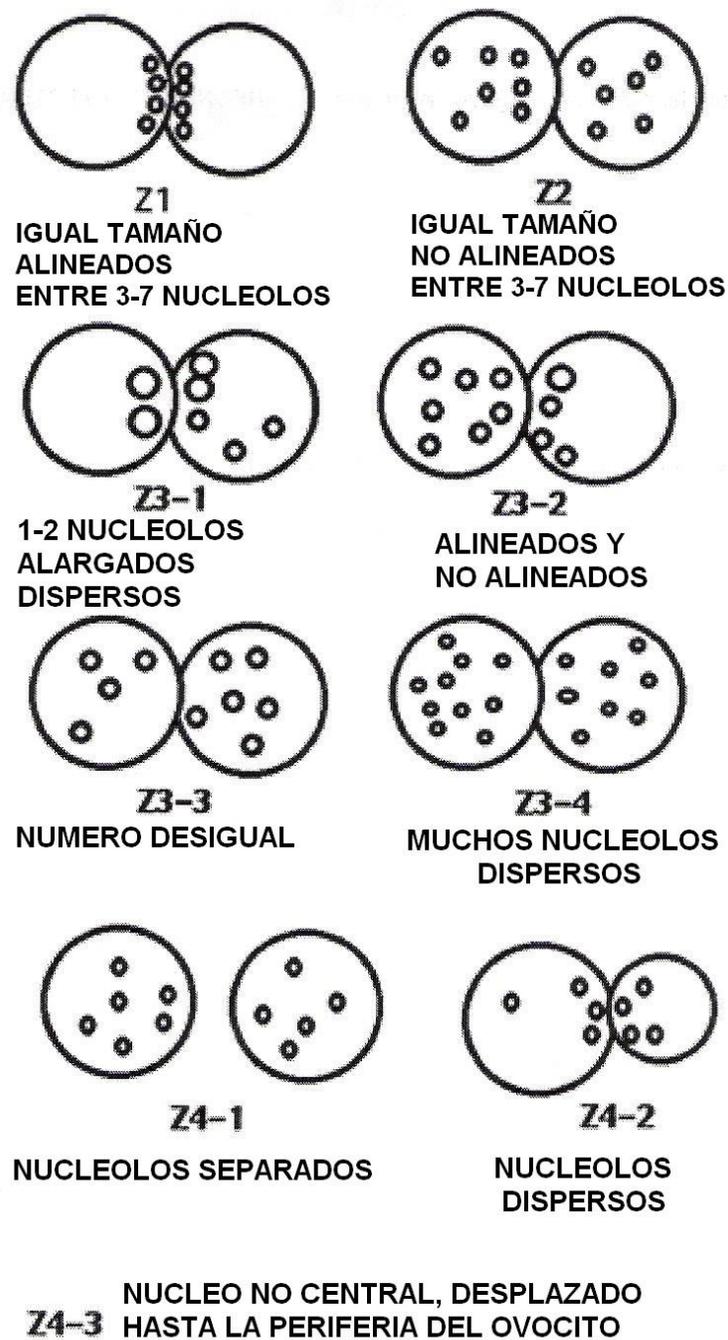


Fig. 10 Representación esquemática de clasificación Z (Z-scoring) de L. Scott, considerando el número, tamaños y alineación de los nucleolos dentro de los pronúcleos (14).

Aquellos que cuentan con nucleolos de igual tamaño y alineados son designados (entre 3-7 nucleolos) Z1, en los que aún no se han alineado los nucleolos se designan Z2, en los que tienen un desigual número de nucleolos de diferentes tamaños son designados Z3. Los designados como Z4 presentan nucleolos separados, desiguales y los pronúcleos se encuentran en la periferia del cigoto, estos se consideran altamente anormales.

El número de nucleolos debe ser idealmente entre 3-7 por núcleo, los que presentan puntilleo están retrasados en los eventos nucleares y en la formación del centro de organización nucleolar. Estos son lentos en su desarrollo y dan como resultado un embrión subóptimo y sólo un 10-15% llegan a blastocisto. Esto también ocurre cuando tienen un número desigual de nucleolos cada núcleo. Aquellos con un inadecuado número o tamaño de nucleolos probablemente mostrarán una falta de sincronización entre el desarrollo del pronúcleo masculino con el femenino.

El alineamiento o la polarización de la cromatina y por lo tanto del nucleolo, esta relacionada con el estado metabólico del embrión y la habilidad del núcleo de fusionarse y formar el genoma embrionario único. Hay un gradiente de pH entre los nucleolos, el cual es más bajo que en cualquier otra parte del ovocito fertilizado, es un factor importante para la fusión de los nucleolos.

Por lo tanto, el ovocito fertilizado óptimo es el que tiene igual número de nucleolos, del mismo tamaño (de 3-7 por núcleo), que se han alineado en la unión de los pronúcleos. Estas características en los cigotos han demostrado un adecuado desarrollo e implantación.

En la clasificación Z3 se ha demostrado que son embriones de mala calidad en un 3° día de desarrollo, y algunos llegan a la etapa de blastocisto con una tasa de implantación baja con aumento en las tasas de aborto. Los designados como Z4, han mostrado un alto grado de aneuploidia, por lo tanto, no son candidatos para ser transferidos o criopreservados.

Un segundo nivel de evaluación que puede ser usado es la apariencia del citoplasma. La presencia de un “halo” esta asociada con el desarrollo de embriones en 3° y 5° día de buena calidad, el “halo” no ha sido asociado con alguna característica morfológica específica del ovocito fertilizado, pero se ha relacionado con cohortes de ovocitos fertilizados que desarrollan blastocistos de buena calidad (1).

G) APLICACIÓN DE LA EVALUACIÓN DEL CIGOTO

Una vez que los ovocitos fertilizados se clasifican, se documenta su desarrollo en los días 2, 3 y 5 con el uso de un sistema secundario de evaluación para los embriones, basado en su morfología. La mayoría de los embriones de buena calidad (poca fragmentación y adecuado número de células) proceden de ovocitos fertilizados Z1 y Z2. Estos se demostró en una gran cohorte de embriones, donde el rango de desarrollo y el patrón de fragmentación fueron tomados como referencia para su clasificación (11). El concepto de la calificación del pronúcleo seguido de la evaluación tradicional al 3° ó 5° día se realiza para seleccionar embriones con potencial de desarrollo que pueden llevar su división celular hasta 8 células o blastocisto, con la finalidad de tener un embriones de mejor calidad y, así disminuir el número de embriones a transferir.

Existe un gran número de blastocisto de buena calidad procedentes de un cigoto con baja calificación (Z3-Z4) y cuando estos son transferidos se ha demostrado que tiene poco potencial de implantación (12).

Cuando se evalúa un embrión tomando en cuenta la calificación previa del cigoto, las tasas de implantación y embarazo para los embriones en 3° y 5° día se han aumentado significativamente, únicamente con la transferencia de 1 a 2 embriones. Esto es importante para limitar el número de embriones utilizados logrando altas tasas de embarazo, disminuir la frecuencia de embarazos de alto orden fetal. (13).

La evaluación puede ser utilizada principalmente como la primera línea de selección para embriones a transferir, ya sea que se encuentren en 2°, 3° ó 5° día de su desarrollo, como un sistema secundario, la morfología de los embriones en 3° y 5° día. Esto también puede ser aplicado para seleccionar a los embriones que no serán transferidos y van a criopreservación. Esta evaluación puede ser utilizada para seleccionar pacientes que pueden ser beneficiadas con transferencia de un embrión en 3° día contra un embrión de 5° día, basando el criterio en el número de cigotos de buena calidad.

Para países que cuentan con leyes estrictas en lo que respecta al cultivo y congelación de embriones, la aplicación de esta evaluación puede reducir el número de embriones utilizados para transferir y criopreservar.

H) IMPLANTACIÓN

El ovocito fecundado avanza durante sus 3 días de vida por la trompa de falopio, mientras se producen sucesivas divisiones celulares. En el estadio de mórula alcanza el útero, y allí continúa su desarrollo hasta el estadio de blastocisto, implantándose entre el 5° y 6° día de su desarrollo.

La implantación embrionaria es el proceso por el cual el embrión en fase de blastocisto se fija al endometrio materno para continuar su desarrollo. Por ello, el correcto funcionamiento de esta fase depende en gran parte la continuidad de la especie humana.

La implantación embrionaria humana se produce generalmente en el tercio medio y superior de la pared posterior del útero, y tiene lugar en un momento específico dentro del ciclo menstrual, denominado ventana de implantación. Este período comprende del día 6 al 10 después de la ovulación, debe coincidir con el desarrollo embrionario en estadio de blastocisto.

La implantación transcurre en cuatro fases distintas, relacionadas y consecutivas, denominadas: aposición, adhesión, rotura de la barrera epitelial e invasión.

Durante la *aposición*, el blastocisto humano “busca” su lugar de implantación, orientándose de forma específica con su masa celular interna en el polo en el que el trofoectodermo se va a adherir al epitelio endometrial superficial. En la fase de *adhesión*, se produce el contacto directo entre el epitelio endometrial y el trofoectodermo del blastocisto, con lo que el embrión queda inicialmente “pegado” al útero. Ambas fases se producen entre el sexto y séptimo día después de la fertilización. La *rotura de la barrera epitelial* (epitelio y membrana basal) es fundamental para permitir la progresión del blastocisto hacia el estroma endometrial. Finalmente, durante la *invasión*, el trofoblasto embrionario penetra en el estroma e invade los vasos endometriales-miometriales, reemplazando en parte a las células endoteliales.

Todo este proceso está regulado por multitud de factores que actúan de forma sistémica (endocrina) o local (paracrina y autocrina), tanto a nivel endometrial como embrionario. El papel de los esteroides ováricos en la preparación del endometrio en la fase de receptividad está fuera de toda duda; sin embargo, no son estas hormonas los efectores finales, sino que desencadenan una cascada de sucesos moleculares paracrinos intermedios, como las quimiocinas, las citocinas, los factores de crecimiento, las moléculas de adhesión y antiadhesión, y las proteinasas, que son las que actúan íntimamente e nivel local entre el endometrio y el embrión.

La comunicación entre el endometrio y el embrión implica a tres compartimientos diferentes: a) la comunicación entre el epitelio y el estroma durante la adquisición de la receptividad y de la decidualización, b) las interacciones entre el embrión y el epitelio endometrial en las fases de aposición y adhesión; y c) el “diálogo” entre el estroma endometrial y el embrión durante la fase de invasión (14).

I) EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL EMBRIÓN

Los riesgos que involucran un embarazo múltiple son altos, en un cierto número de países estos peligros han sido controlados legalmente, restringiendo el número de embriones para transferir. Por ejemplo, en el Reino Unido la autoridad en fertilización humana y embriología (HFEA) propusieron que 2 embriones sería el mayor número de embriones a transferir. En varios países escandinavos la transferencia de un solo embrión (*single embryo transfer: SET*) se ha vuelto la norma (16). En otros países no hay restricciones legales al respecto, y esta en manos de las clínicas de infertilidad disminuir el número de embriones utilizados en las transferencias y bajar la incidencia de embarazos múltiples. Por lo anterior, es necesario seleccionar uno o dos embriones por transferencia. Será necesario considerar un esquema de estimulación ovárica menos agresivo, con la finalidad, de tener un menor número de ovocitos capturados para fertilizar y determinar un proceso de selección riguroso para definir la calidad individual de cada embrión, con la finalidad de transferir los que tengan un mayor potencial de implantación.

Se han sugerido muchos métodos para evaluar la viabilidad del embrión, en base a su morfología y el grado de desarrollo, con una primera revisión entre las 16 a 18 horas post-inseminación para evaluar pronúcleos. El criterio de selección utilizado tiene 3 puntos determinantes: 1) evaluación de la etapa en pronúcleo, 2) grado de división celular y 3) desarrollo del embrión a la etapa de blastocisto.

En la etapa de pronúcleo, la característica del cigoto que tiene una mejor tasa de implantación es el que tiene nucleolos en igual número en los dos pronúcleos, con una diferencia no mayor a 3 nucleolos. Cigotos que no cumplen este criterio, tienden a presentar un desarrollo inadecuado.

El criterio ampliamente utilizado para seleccionar el mejor embrión para transferir se basa en la morfología y el número de células. Este óptimo embrión tiene las siguientes características: 4 ó 5 blastómeros en 2° día de desarrollo y por lo menos 7 blastómeros en 3° día posterior a la fertilización, no hay blastómeros multinucleadas, con menos del 20% de fragmentación en 2° y 3° día de su desarrollo.

El criterio anterior fue utilizado por Van Royen y colaboradores (1999) en un estudio clínico prospectivo, randomizado, comparando la transferencia de un embrión (SET) con la de dos embriones, encontrando que en 26 pacientes se utilizó SET con un embrión óptimo, logrando una tasa de implantación del 42.3% y una tasa de embarazo del 38.5%, y en 27 pacientes con transferencia de 2 embriones se obtuvo una tasa de implantación del 48.1% y una tasa de embarazo del 74% (17).

El desarrollo del embrión en etapa de blastocisto, se ha visto favorecido por el uso de medios de cultivo secuenciales. Una parte importante para seleccionar un blastocisto es, como ya se había mencionado, la evaluación del embrión durante sus etapas de división y su morfología. Veeck (1999) establece un sistema con asignación de grados dependiendo de la morfología durante la división embrionaria, los que obtienen el puntaje más alto son los seleccionados a transferir (15).

Asignando un grado 1+ a un preembrión con blastómeros de igual tamaño, no fragmentos (**Fig. 11**); un grado 2+ a un preembrión con blastómeros de igual tamaño y pocos fragmentos citoplasmáticos que cubren $\leq 10\%$ de la superficie del preembrión citoplasmáticos (**Fig. 12**); con un grado 3+ a los preembrión con blastómeros de tamaño desigual y fragmentación citoplasmática variable (**Fig. 13**).



Fig. 11 EMBRIÓN GRADO 1+



Fig. 12 EMBRIÓN GRADO 2+



Fig. 13 EMBRIÓN GRADO 3+

Y por último, asigna un grado 4+ a los preembrión con blastomeras de igual o desigual tamaño y de moderada a significativa fragmentación citoplasmática cubriendo $> 10\%$ de la superficie del preembrión (**Fig. 14**) y grado 5+ a un preembrión con algunas blastomeras de cualquier tamaño y una severa fragmentación cubriendo $\geq 50\%$ de la superficie del preembrión (**Fig. 15**).



Fig. 14 EMBRIÓN GRADO 4+



Fig. 15 EMBRIÓN GRADO 5+

Determinando que una buena calidad es 1+, 2+, una calidad intermedia es 3+ y un 4+, 5+ es una mala calidad. El grado 1 (1+) representando al embrión óptimo a transferir (15).

Los sistemas de evaluación secuencial se utilizan ampliamente en la actualidad y ha demostrado ser benéfico para alcanzar la meta deseada (selección de un embrión con potencial de implantación), se ha propuesto para llevar a cabo esta evaluación, una secuencia horaria para su realización, con la finalidad de exponer el menor tiempo posible al embrión, fuera de su ambiente controlado en la incubadora (18).

En las horas posteriores a inseminación/ICSI, se realizan las siguientes revisiones, encontrando:

- a) 16-18 horas: los pronúcleos son examinados por su simetría, la presencia de igual número de nucleolos y la posición de cuerpos polares.
- b) 25-26 horas: embriones con 2 células y cigotos que presentan ruptura de la membrana nuclear.

- c) 42-44 horas: número de blastomeras debe ser igual o mayor a 4, fragmentación menor al 20% y sin presencia de blastomeras multinucleadas.
- d) 66-68 horas: número de blastomeras debe ser igual o mayor a 8 células, con una fragmentación menor a 20%, sin blastomeras multinucleadas.
- e) 106-108 horas: cavidad del blastocisto bien expandida, las células de la masa interna deberán ser numerosas y compactadas y las células del trofoectodermo deben ser numerosas y con una buena cohesión.

Adoptando adecuadamente las clasificaciones establecidas, con el uso de medio de cultivo secuencial y la apropiada revisión sistemática de los embriones, seremos capaces de obtener un embrión de buena calidad con potencial de implantación, para mantener altas tasas de implantación y embarazo, por consiguiente, disminuir el riesgo materno-fetal de nuestras pacientes.

VI. OBJETIVOS

Evaluar si la calificación del cigoto (pronúcleo) contribuye a la selección de un embrión viable con mayor potencial de implantación, aumentando la tasa de embarazo reduciendo el número de embriones a transferidos para evitar las gestaciones múltiples.

VII. HIPÓTESIS

Una clasificación estandarizada del cigoto y del embrión, aumentara el valor predictivo de implantación, disminuyendo así, el número de embriones a transferir.

VIII. JUSTIFICACIÓN

La necesidad creciente de encontrar una clasificación estándar del cigoto que permita tener un pronóstico certero de su potencial de implantación, lograra limitar el número de embriones utilizados en las transferencias embrionarias, disminuir la incidencia de embarazos de alto orden fetal y mejorar el pronóstico obstétrico-neonatal de nuestras pacientes.

IX. ALCANCE

El estudio se realizó con la finalidad de seleccionar un cigoto y un embrión de buena calidad que nos elevara nuestras tasas de implantación y embarazo con la finalidad de transferir el menor número de embriones al útero, evitando de esta manera los embarazos múltiples y disminuyendo el riesgo materno-neonatal.

X. MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio retrospectivo, se incluyeron 127 mujeres, sometidas a un ciclo de fertilización in Vitro con transferencia de embriones en fresco de enero a diciembre del 2006. Se tomaron en cuenta la edad materna, diagnóstico de infertilidad, número de folículos detectados por ultrasonido, ovocitos capturados, ovocitos en metafase II, la técnica de inseminación, número de ovocitos fertilizados, calificación del cigoto, calidad del embrión, número de sacos gestacionales implantados, número de embarazos (únicos o múltiples), tasa de implantación y de embarazo.

Todas las pacientes recibieron manejo para supresión hipofisiaria utilizando agonistas de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en 40 pacientes, antagonistas de GnRH en 87 pacientes, utilizando para la estimulación ovárica, hormona folículo estimulante recombinante (FSH r) y menotropinas (HMG) con una dosis promedio de 2381.4 ± 149.8 unidades, un promedio de 10.3 ± 0.25 días de estimulación, la aspiración folicular se realizó 36 horas después de la aplicación de 10,000 UI hormona gonadotropina coriónica (hCG) con la presencia de 4 folículos de 18-20 mm de diámetro determinada por ultrasonido con nivel de 200-250 pg/ml de estradiol por folículo, con una media de estradiol de disparo en 3346.8 ± 590 pg/ml.

Los procedimientos de fertilización utilizados fueron FIV e ICSI los cuales fueron realizados por un solo grupo de biólogos de acuerdo a las técnicas convencionales. Los ovocitos capturados fueron colocados en medio de cultivo "*Human Tubal Fluid*" (HTF), enriquecido con Suero Sintético Substituto (Irving Scientific, Santa Anna, CA, USA) e incubados a 37°C y 5.0% CO₂. Para realizar el FIV convencional, se utilizó una dosis de 100,000 espermatozoides móviles (progresión tipo A y B) por cada mililitro de medio de cultivo.

La obtención de muestra de semen se analizó con base en los parámetros descritos en el Manual de análisis de semen publicados por Organización Mundial de la Salud (OMS,1999), la separación de los espermatozoides móviles fue por medio de gradientes discontinuos, usando kit de “*Sperm Grad*” (Sydney IVF Cook). La preparación de los ovocitos para el ICSI se realizó de acuerdo a lo publicado por Palermo (Palermo G, et al., 1992) microinyectándose sólo los ovocitos en estadio de metafase II. Todos los ovocitos fertilizados se colocaron en medio de cultivo secuencial G1.3+G2.3 (Vitrolife Fertility Systems, South Inca Street Englewood, Colorado, USA) suplementado con suero sintético substituto.

Entre 16-18 horas post-inseminación se evaluó la fertilización de los ovocitos. La tasa de fertilización se baso en número de ovocitos con dos pronúcleos (2PN) dividido entre el número de ovocitos metafase II inseminados. Los ovocitos con fertilización anormal (1PN ó 3 PN) se excluyeron del presente estudio.

El sistema de calificación de los cigotos utilizado en el laboratorio de FIV de nuestra clínica, se basa en la suma de dos sistemas. El primero de ellos, es el criterio propuesto por Scott y colaboradores (2003), el cual asigna los valores de Z1, Z2 y Z3 de acuerdo a los siguientes puntos de referencia:

Z1:

- a) Pronúcleos simétricos con nucleólos alineados en la región donde se unen ambos pronúcleos,
- b) Número entre 3-7 entre ambos pronúcleos,

Z2:

- a) Pronúcleos simétricos con nucleólos **NO** alineados,
- b) Número entre 3-7 entre ambos pronúcleos,

Z3:

- a) Los pronúcleos pueden ser o no simétricos, existe una diferencia de más de 3 nucleólos entre ambos pronúcleos,
- b) El tamaño de los nucleólos puede ser igual o desigual entre ambos pronucleos.

Además de la calificación anterior designada como Z1, Z2 y Z3, el segundo criterio asigna valores numéricos (0 y 1) de acuerdo a la presencia de los siguientes parámetros:

c) Citoplasma:

- a. presencia de halo = 1
- b. ausencia del halo = 0
- c. presencia de granulación= 0
- d. ausencia de granulación= 1
- e. presencia de vacuolas= 0
- f. ausencia de vacuolas= 1

d) Cuerpos polares:

- a. menor que 2= 0
- b. igual a 2= 1
- c. fracturados= 0
- d. no fracturados= 1
- e. ángulo de separación $\leq 90^\circ$ entre ambos cuerpos= 1
- f. ángulo de separación $> 90^\circ$ entre ambos cuerpos= 0

e) Espacio Perivitelino:

- a. presencia de detritos celulares= 0
- b. ausencia de detritos celulares= 1
- c. tamaño normal= 1
- d. tamaño anormal= 0

f) Zona Pelúcida:

- a. grosor normal= 1
- b. grosor anormal= 0
- c. apariencia normal= 1
- d. apariencia anormal= 0

Para determinar la calificación final al cigoto, se realizó una suma del primer criterio (Z-score) con el puntaje obtenido de los parámetros restantes. Del análisis del total de parámetros observados se obtuvo la siguiente tabla:

Patrón A	Z1, Z2	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Patrón A	Z1, Z2	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	
Patrón A	Z1, Z2	8	7	6	5	4	3	2	1	0		
Patrón B	Z1, Z2, Z3	7	6	5	4	3	2	1	0			
Patrón B	Z1, Z2, Z3	6	5	4	3	2	1	0				
Patrón B	Z1, Z2, Z3	5	4	3	2	1	0					
Patrón C	Z1, Z2, Z3	4	3	2	1	0						
Patrón C	Z1, Z2, Z3	3	2	1	0							
Patrón C	Z1, Z2, Z3	2	1	0								
Patrón C	Z1, Z2, Z3	1	0									
Patrón C	Z1, Z2, Z3	0										

Tabla 1. Clasificación del cigoto basada en características morfológicas. Valorando al pronúcleo y nucleolo con la calificación "Z score" de Scott y col. (2003) y un puntaje acumulativo de los parámetros: citoplasma, cuerpo polar, espacio perivitelino y zona pelúcida. Determinando Patrón A) Z1-Z2 + 10 a 8 puntos; Patrón B) Z1, Z2, Z3 + 7 a 5 puntos y Patrón C) Z1, Z2, Z3 + 4 a 0 puntos.

Se calificó como cigoto con Patrón A cuando presentaba calificación Z1 ó Z2 más un puntaje de máximo 10 y mínimo de 8. Como cigoto Patrón B, cuando era calificado como Z1, Z2 ó Z3 más un puntaje de máximo 7 y mínimo de 5 y, por último; como cigoto Patrón C cuando era cigoto Z1, Z2 o Z3 más un puntaje igual o menor de 4 (**Tabla 1**).

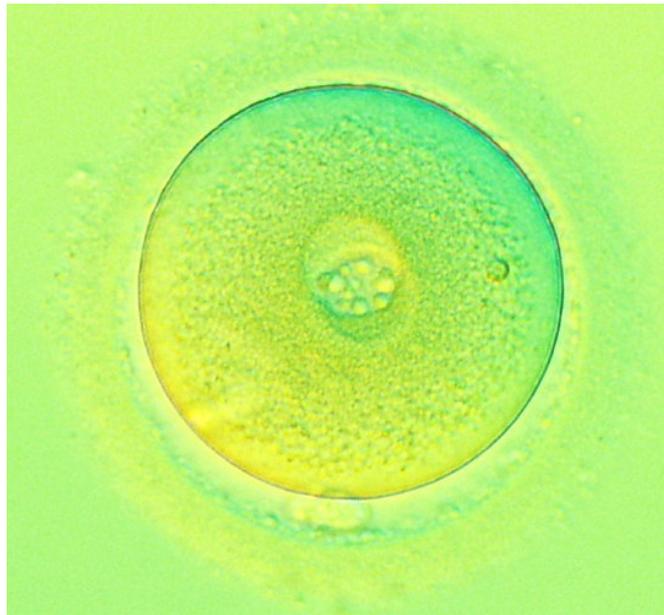


Fig. 16 CIGOTO CON PATRÓN A

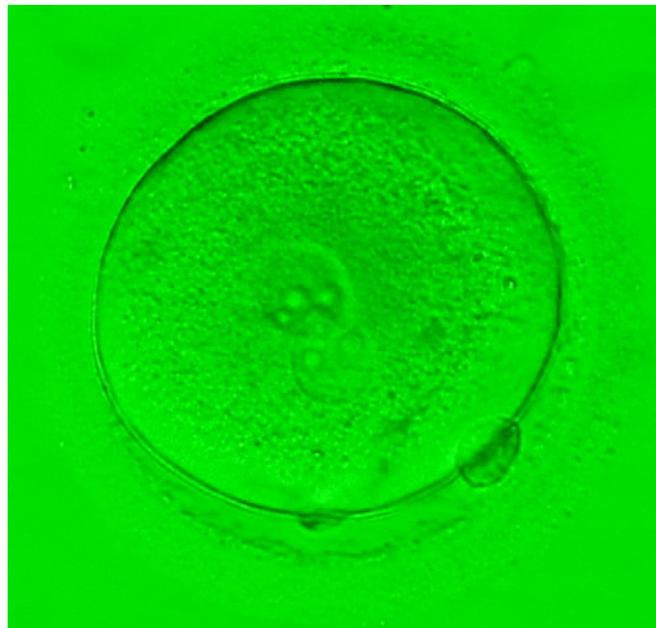


Fig. 17 CIGOTO CON PATRÓN B

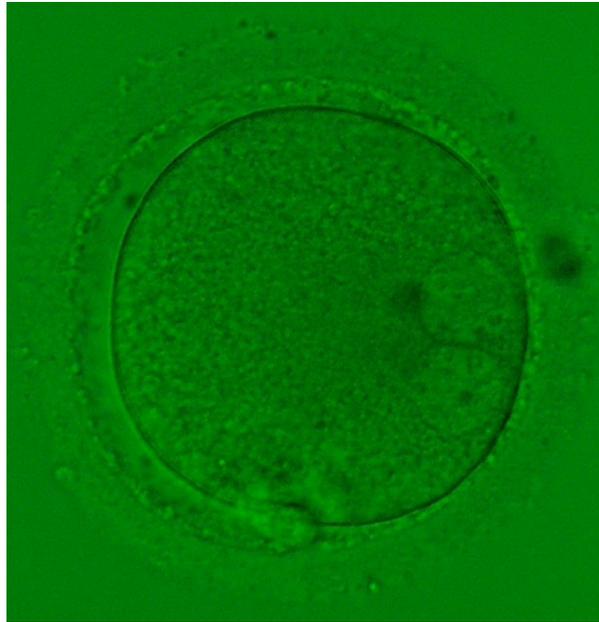


Fig. 18 CIGOTO CON PATRÓN C

Durante los días subsecuentes se evaluó el patrón de desarrollo de los embriones de acuerdo a los criterios propuestos por Veeck (Veeck, L., 1999) (**Tabla 2**).

EVALUACIÓN	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS
GRADO 1+	Preembrión con blastómeros de igual tamaño, no fragmentos citoplasmáticos.
GRADO 2+	Preembrión con blastómeros de igual tamaño y pocos fragmentos citoplasmáticos que cubren $\leq 10\%$ de la superficie del preembrión.
GRADO 3+	Preembrión con blastómeros de tamaño desigual y fragmentación citoplasmática variable.
GRADO 4+	Preembrión con blastómeros de igual o desigual tamaño y de moderada a significativa fragmentación citoplasmática cubriendo $> 10\%$ de la superficie del preembrión.
GRADO 5+	Preembrión con algunas blastómeros de cualquier tamaño y una severa fragmentación cubriendo $\geq 50\%$ de la superficie del preembrión.

Tabla 2. Sistema de calificación del embrión por grados, dependiendo de sus características morfológicas, en donde el grado 1+ se considera una morfología perfecta, propuesto por Lucinda Veeck en 1999 (14).

Determinando que una buena calidad es 1+, 2+ y una calidad intermedia es 3+ y una mala calidad es 4+ y 5+ (**Tabla 2**). Este es un sistema con asignación de grados dependiendo de la morfología de la división de los embriones, los que obtienen el puntaje más alto son los seleccionados a transferir, con el grado 1 (1+) representando a la morfología perfecta (15).

Se realizaron transferencias de embriones en 2°, 3° y 5° día del desarrollo embrionario, previa clasificación del cigoto, correlacionando calificación del cigoto con calidad del embrión el día de la transferencia. Todas las pacientes recibieron soporte de fase lútea fue con progesterona vía vaginal 400-600mg/día, comenzando el día de la aspiración folicular hasta la determinación de fracción β hormona gonadotropina coriónica (β -hCG) sérica.

Los resultados son presentados con promedios (\pm desviación estándar, SD) y porcentajes. Se utilizó la prueba Z, para comparación de proporciones en dos grupos independientes, ya que los tamaños de muestra fueron lo suficientemente grandes para poder aplicarla. La estadística de la prueba Z es la diferencia entre las dos proporciones observadas, divididas entre el error estándar de la diferencia, y la prueba de χ^2 para el análisis estadístico, estableciendo como valor de significancia estadística una $p < 0.05$. Además aplicó el software Sigma Plot and Sigma Stat versión 11.0 (SPSS; Erkrath, Alemania).

XI. RESULTADOS

De las 127 pacientes incluidas en el estudio, con respecto a características generales como factor de infertilidad (edad, masculino, uterino, tubario, ovárico y endometriosis) y técnica de reproducción asistida (FIV/ICSI), la tasa de embarazo no se afectó significativamente (**Tabla 3**). Considerando la edad materna encontramos una diferencia significativa en la tasa de embarazo: 37.2% en mujeres ≤ 35 años (78 casos), en comparación con un 24.5% en mujeres ≥ 36 años (49 casos) (**Fig. 19**). La media de la edad fue de 35.8 ± 0.86 años (\pm SD con un 95% de confianza) (**Fig. 20**).

	Edad	Masculino	Uterino	Tubario	Ovárico	Endometriosis	FIV	ICSI
No. (%)	17(13)	25 (20)	5 (4)	32 (25)	23 (18)	25 (20)	28(22)	99(78)
Tasa Embarazo	35%	44%	40%	25%	26%	32%	25%	34%

Tabla 3. Características generales de la población del estudio. Factor de Infertilidad y Técnica de reproducción asistida.

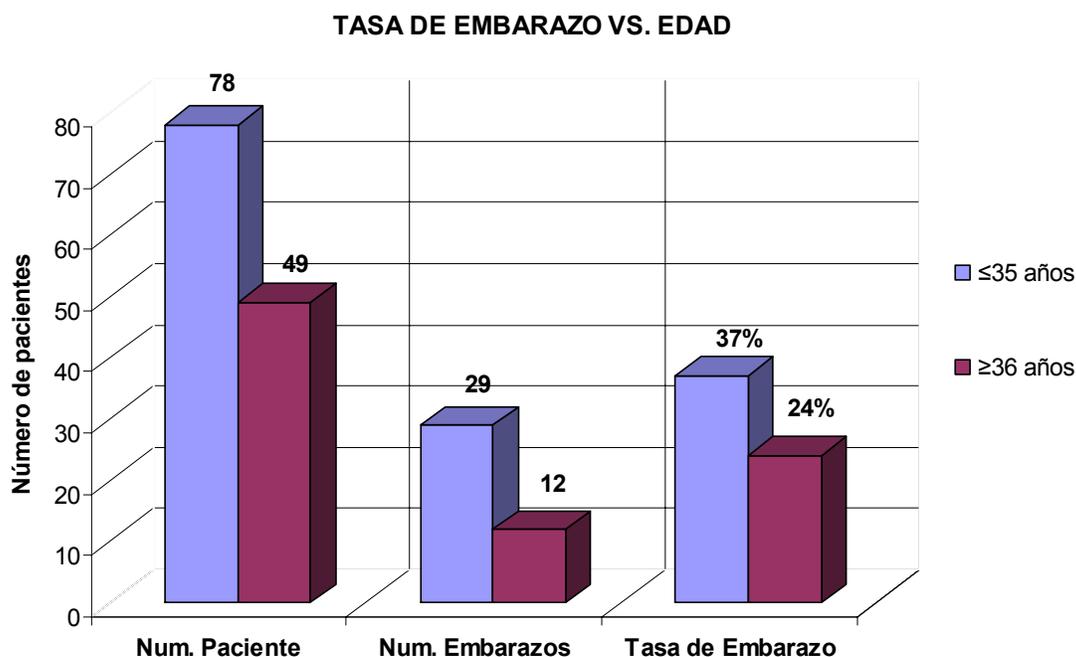


Fig. 19 Relación de la edad con la tasa de embarazo. Encontrando un ligero aumento en grupo de pacientes con edad igual o menor a 35 años.

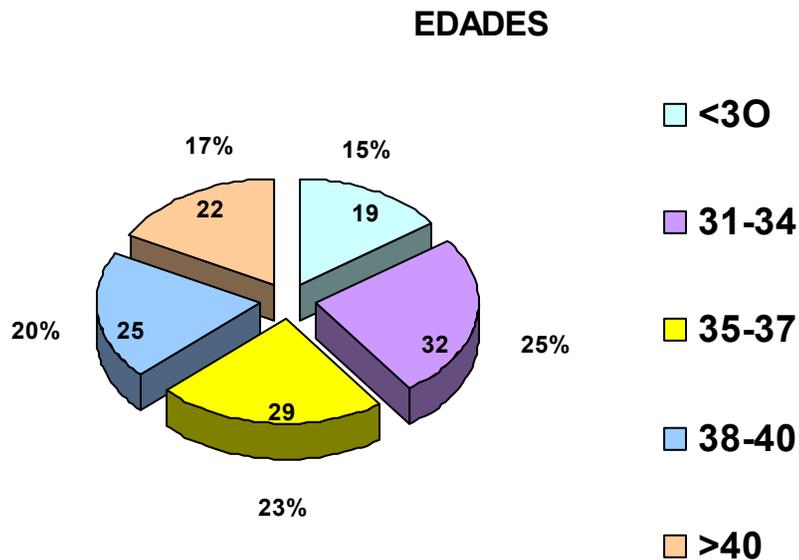
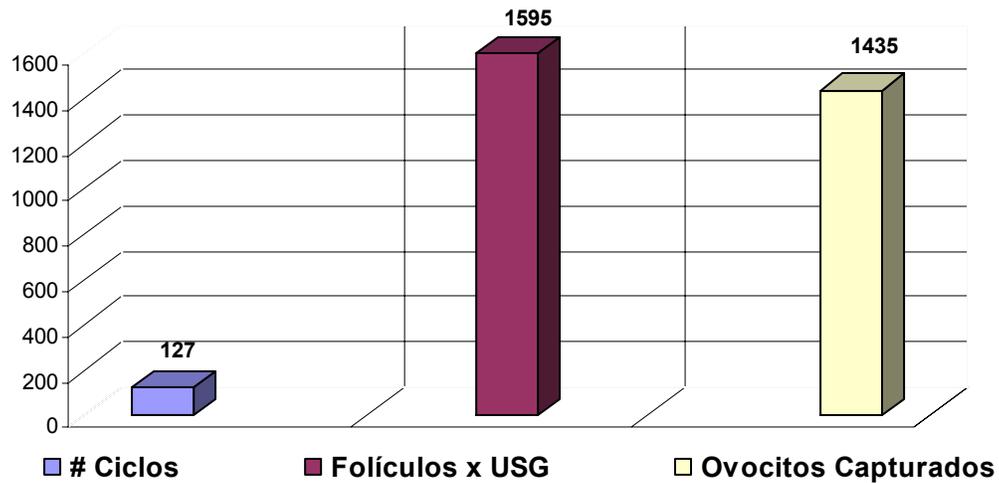


Fig. 20 Edades de las 127 pacientes incluidas en el estudio. Un 25% en el rango de 31 a 34 años.

Se observaron por ultrasonido transvaginal 1595 folículos, se capturaron 1435 ovocitos (Eficacia de ovocitos recuperados 89.96%, **Fig. 21**), de los cuales, 151 ovocitos en metafase I y 1284 en metafase II (Eficacia de madurez nuclear 89.4%, **Fig. 22**), se obtuvieron 971 ovocitos fertilizados, con una tasa de fertilización del 75.6%.

Con un total de 327 embriones transferidos y 58 sacos gestacionales implantados, se tuvo un 17.7% en tasa de implantación. Un total de 41 ciclos con un resultado positivo de fracción beta de hCG, se logró una tasa de embarazo del 32.2% en el estudio (**Fig. 23**).

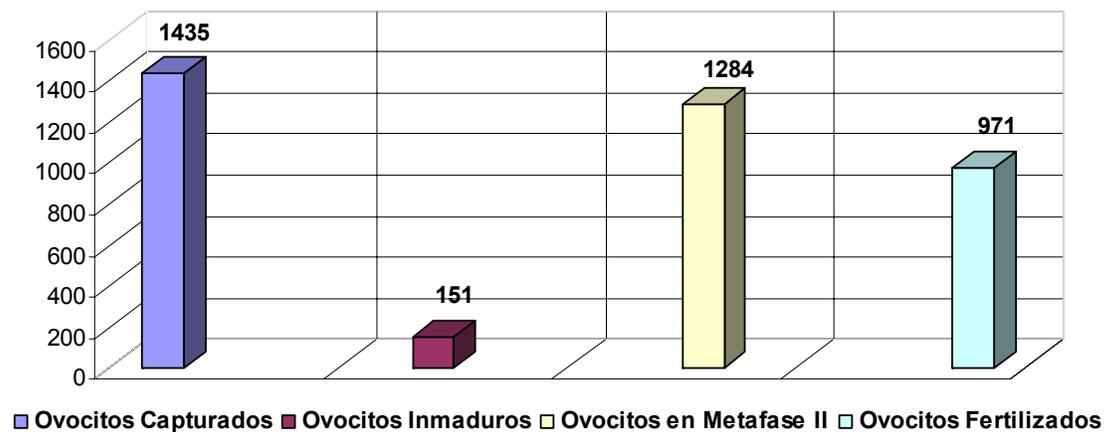
EFICIENCIA DE OVOCITOS RECUPERADOS



EFICACIA DE OVOCITOS RECUPERADOS Ovocitos Capturados / Folículos por USG	89.96%
--	---------------

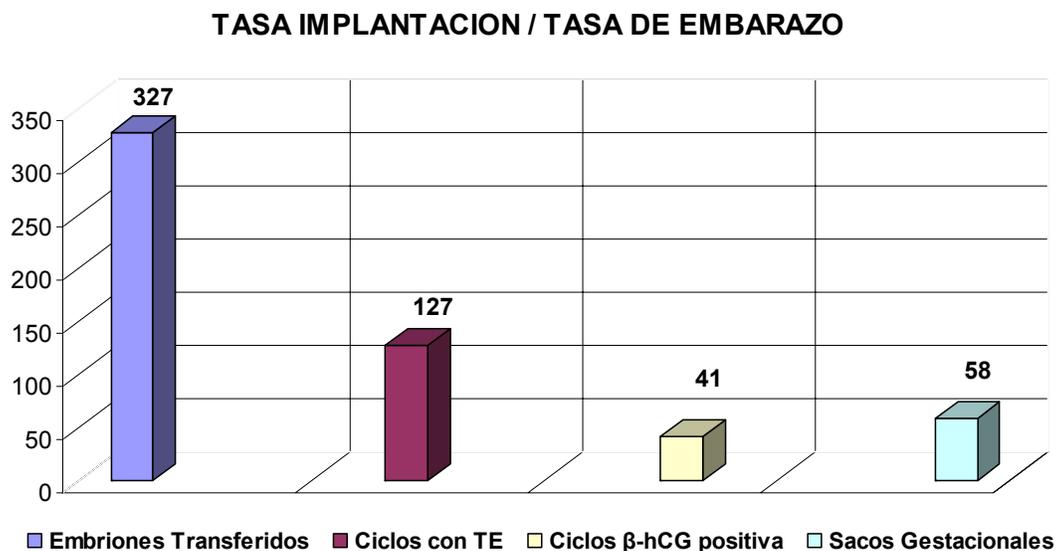
Fig. 21 Total de Ovocitos capturados entre el número de folículos detectados por ultrasonido, determina la eficacia de ovocitos recuperados.

EFICACIA DE MADUREZ NUCLEAR / TASA DE FERTILIZACIÓN



EFICACIA DE MADUREZ NUCLEAR Ovocitos metafase II / ovocitos capturados	89.4%
TASA DE FERTILIZACION Ovocitos fertilizados / ovocitos en metafase II	75.6%

Fig. 22 Total de ovocitos en metafase II entre el número de ovocitos capturados, determina la eficacia de madures nuclear. Para calcular la tasa de fertilización, se utiliza el total de ovocitos fertilizados entre el número de ovocitos en metafase II.



TASA DE IMPLANTACION Sacos Gestacionales/Embriones Transferidos	17.7%
TASA DE EMBARAZO Ciclos β-hCG positiva/Ciclos con Transferencia de Embriones	32.2%

Fig. 23 Para calcular la tasa de implantación, es necesario tomar el total de los sacos gestacionales entre el número de embriones transferidos. Con respecto a la tasa de embarazo, el total de ciclos con fracción β- hCG positiva entre el total de ciclos con transferencia de embriones

-Relación entre la calificación del cigoto y el desarrollo del embrión.

Se obtuvieron un total 971 cigotos, en 127 ciclos, los cuales fueron observados individualmente de las 16 hasta las 72 horas posterior a la inseminación (FIV/ ICSI). Considerando todos los embriones clivados, de los 971 cigotos, 258 se arrestaron (26.5%), 713 cigotos se desarrollaron como embriones morfológicamente normales, de los cuales 327 se transfirieron y 386 se criopreservaron (**Tabla 4**).

	A		B		C		TOTALES	
Fertilizados	489	50.3%	432	44.4%	50	5.1%	971	
Transferidos	182	37.2%	130	30.1%	15	30%	327	33.6%
Congelados	200	40.8%	173	40%	13	26%	386	39.7%
Arrestados	107	21.8%	129	30%	22	44%	258	26.5%

Tabla 4. Total de ovocitos fertilizados (cigotos) y sus respectivos patrones morfológicos. Determinando el destino de los mismos.

Tomando la calificación del cigoto individualmente, encontramos con un patrón A un total de 489 (50.3%), patrón B 432 (44.4%) y patrón C (5.1%). De los cuales, se transfirieron 182 (37.2%) patrón A, 130 (30.1%) patrón B y 15 (30%) patrón C. Se criopreservaron 200 (40.8%) patrón A, 173 (40%) patrón B y 13 (26%) patrón C. Por último, cigotos arrestados fueron 107 (21.8%) patrón A, 129 (30%) patrón B y 22 (44%) patrón C (**Fig. 24,25**).

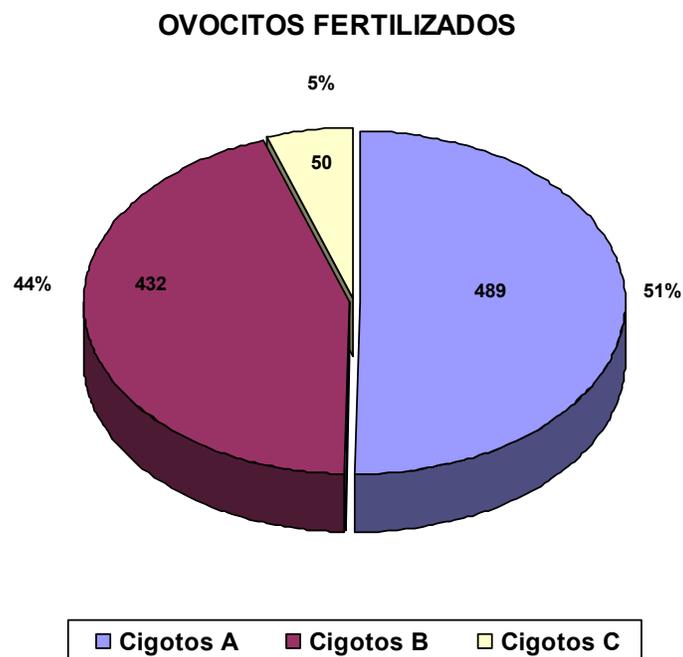


Fig. 24 Total de Ovocitos fertilizados (cigotos) utilizados en este estudio (971 cigotos) y sus respectivas calificaciones.

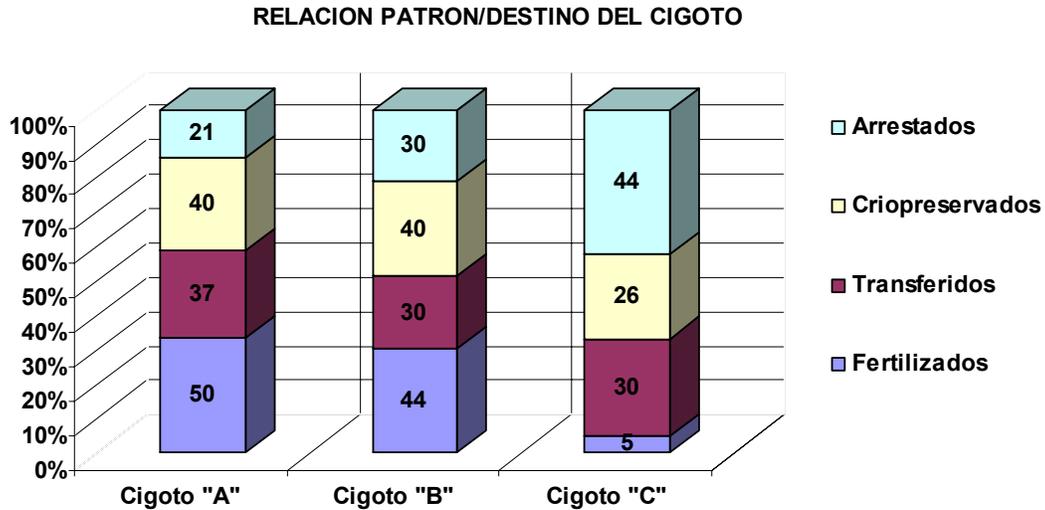


Fig.

25 Relación del patrón del cigoto con el destino de cada uno, expresado en porcentajes.

Se aplicó la prueba de χ^2 para determinar la asociación entre el patrón del cigoto, la morfología embrionaria y el destino final del embrión (transferido, criopreservado y arrestado), con un valor estadístico de 17.74 ($p=0.001$), donde se demuestra que estos valores son dependientes y existe una relación entre estos.

La probabilidad de transferir un cigoto patrón A es estadísticamente mayor que con un cigoto patrón B ($p=0.011$) (**Tabla 5**).

	$H_0: p_A=p_B$	$H_0: p_B=p_C$	$H_0: p_A=p_C$
	$H_A: p_A>p_B$	$H_A: p_B>p_C$	$H_A: p_A>p_C$
Estadística Prueba Z	2.29	0.01	1.06
Valor p	0.011	0.989	0.146

Tabla 5. Tabla que demuestra la probabilidad de un cigoto a ser transferido en base a su calificación o patrón asignado.

La probabilidad de que un cigoto C se arreste es mayor que en cigotos B (valor $p=0.027$), y este último a su vez, es mayor que los cigotos A (valor $p=0.003$). Por consiguiente la del tipo C es mayor que la del tipo A (valor $p=0.001$). La probabilidad de un cigoto patrón C se arreste, es significativa estadísticamente comparado con cigotos A y B (**Tabla 6**).

	$H_0: p_A=p_B$	$H_0: p_B=p_C$	$H_0: p_A=p_C$
	$H_A: p_A < p_B$	$H_A: p_B < p_C$	$H_0: p_A < p_C$
Estadística Prueba Z	-2.76	-1.92	-3.04
Valor p	0.003	0.027	0.001

Tabla 6. Probabilidad de un cigoto a entrar a una fase de arresto en su desarrollo

La proporción de embriones arrestados espontáneamente varía de un 21.8% a un 44% y fue significativamente diferente entre los tres patrones de cigoto ($p < 0.05$). Con una incidencia baja del patrón A (21.8%) con una alta incidencia en patrón C (**Tabla 7**).

PATRON	ARRESTADOS		BUENA MORFOLOGIA		TOTAL
CIGOTO A	107	21.8%	382	78.1%	489
CIGOTO B	129	30%	303	70.1%	432
CIGOTO C	22	44%	28	56 %	50

Tabla 7. Proporción de embriones arrestados

De acuerdo al desarrollo embrionario para cada patrón de cigoto se subdividió en embriones de buena, intermedia y mala calidad utilizando criterios de Veeck (**Tabla 8**). El desarrollo embrionario con respecto al patrón del cigoto, presenta una relación directa.

CIGOTOS Fertilizados	Calidad Buena(1+/2+)		Calidad Intermedia(3+)		Calidad Mala(4+/5+)		TOTAL
A	277	72%	96	25%	9	3%	382
B	198	66%	95	31%	10	3%	303
C	15	54%	13	46%	0		28

Tabla 8. Relación del patrón del cigoto con la calidad del embrión desarrollado.

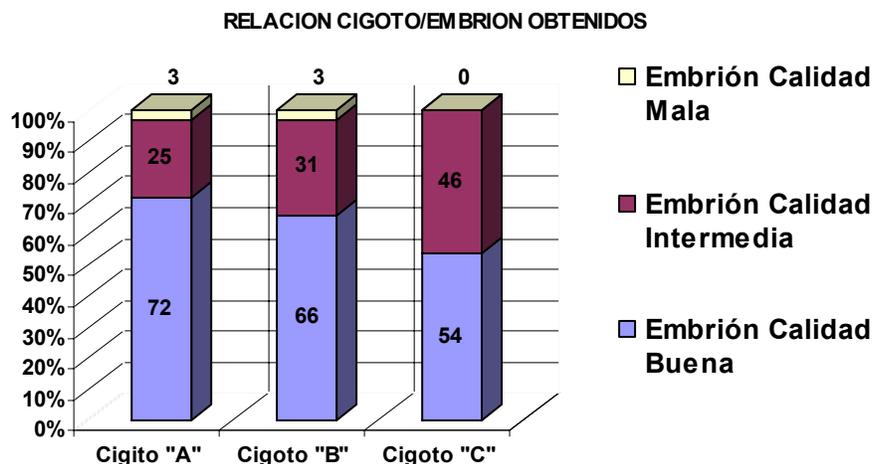


Fig. 26 Evaluación de embrión con la escala de Veeck, en base al tipo de cigoto del cual se desarrollo.

Con respecto a cigotos patrón A, se obtuvieron 277 (72%) embriones de buena calidad, 96 (25%) embriones de calidad intermedia y 9 (3%) de mala calidad. En lo que respecta a cigotos patrón B, en 198 (66%) buena calidad, 95 (31%) calidad intermedia y 10 (3%) mala calidad. Por último, en cigotos patrón C, solamente 15 (54%) presentó una calidad buena, 13 (46%) una calidad intermedia. No se registró ningún cigoto C con un embrión de mala calidad, ya que en este patrón los embriones se arrestaron (**Fig. 26**).

De acuerdo al desarrollo del embrión, existe una relación directa entre el patrón del cigoto y la calidad del embrión, con una $p=0.028$. Aplicando la prueba de χ^2 , la probabilidad que un cigoto A se desarrolle a un embrión de buena calidad es de $p=0.022$ con respecto a cigoto B y a un cigoto C de $p=0.025$ (**Tabla 9**).

	$H_0: p_A=p_B$ $H_A: p_A>p_B$	$H_0: p_B=p_C$ $H_A: p_B>p_C$	$H_0: p_A=p_C$ $H_A: p_A>p_C$
Estadística Prueba Z	2.01	1.20	1.95
Valor p	0.022	0.115	0.025

Tabla 9. Probabilidad de obtener un embrión bueno en relación al patrón del cigoto

Se transfirieron un total de 327 embriones en 2°, 3° y 5° día del desarrollo respectivamente, con un mayor porcentaje de embriones de buena calidad procedentes de un cigoto A (**Tabla 10**).

A partir de cigotos A se transfirieron 143 (78.5%) embriones de buena calidad, 34 (18.6%) de calidad intermedia y 5 (2.7%) mala calidad. En base a cigotos B se transfirieron 88 (67.6%) con calidad buena, 36 (27.6%) calidad intermedia y 6 (4.6%) de mala calidad. Por último, con cigotos C se llegaron a transferir 8 (53.3%) de buena calidad, 7 (46.6%) con calidad intermedia y no hubo transferencias de embriones de mala calidad procedentes de un cigoto C.

CIGOTOS Transferidos	EMBRION Transferido Bueno (+1+2)		EMBRION Transferido Intermedio (+3)		EMBRION Transferido Malo (+4+5)		TOTAL
A	143	78.5%	34	18.6%	5	2.7%	182
B	88	67.6%	36	27.6%	6	4.6%	130
C	8	53.3%	7	46.6%	0	0 %	15

Tabla 10. Relación de embriones transferidos en base a su calidad, procedentes de cigotos A,B ó C

La probabilidad de obtener de un embrión de buena calidad ($p=0.01$) se incrementa cuando se realiza su selección en base a la calificación del cigoto (Tabla 11). Hay una mayor probabilidad de transferir un embrión procedente de un cigoto patrón A que de un cigoto B ($p=0.017$) y/o de un cigoto C ($p=0.028$).

	$H_0: p_A=p_B$	$H_0: p_B=p_C$	$H_0: p_A=p_C$
	$H_A: p_A>p_B$	$H_A: p_B>p_C$	$H_0: p_A>p_C$
Estadística Prueba Z	2.13	1.06	1.91
Valor p	0.017	0.144	0.028

Tabla 11. Probabilidad de obtener un buen embrión para transferir en base al patrón del cigoto

El total de embriones transferidos se distribuyó en 3 grupos, basada en la evaluación previa del cigoto: Grupo A (solamente cigotos patrón A), Grupo B (solo cigotos B) y Mixto (al menos incluía un cigoto A) (Tabla 12). Por lo anterior, se utilizaron embriones procedentes de cigoto A en 65 ciclos (152 cigotos), de cigoto B en 40 ciclos (102 cigotos) y grupo mixto en 22 ciclos (73 cigotos).

CALIFICACIÓN CIGOTO	TOTAL DE CICLOS	TOTAL CIGOTOS
A	65	152
B	40	102
MIXTO	22	73
TOTAL	127	327

Tabla 12. Embriones transferidos en cada ciclo, se agruparon dependiendo de la calificación del cigoto.

La tasa de implantación del estudio, independiente del embrión transferido, fue del 17.7%, con tasa de embarazo del 32.2%. Al subdividir los datos anteriores, de acuerdo al patrón del cigoto del embrión transferido, se observa una significancia estadística entre el grupo A y el grupo mixto ($p= 0.05$) (**Fig.27**). Teniendo una tasa de implantación del grupo A de 21%, en el grupo B de 19.5% y de 8.2% en el grupo mixto.

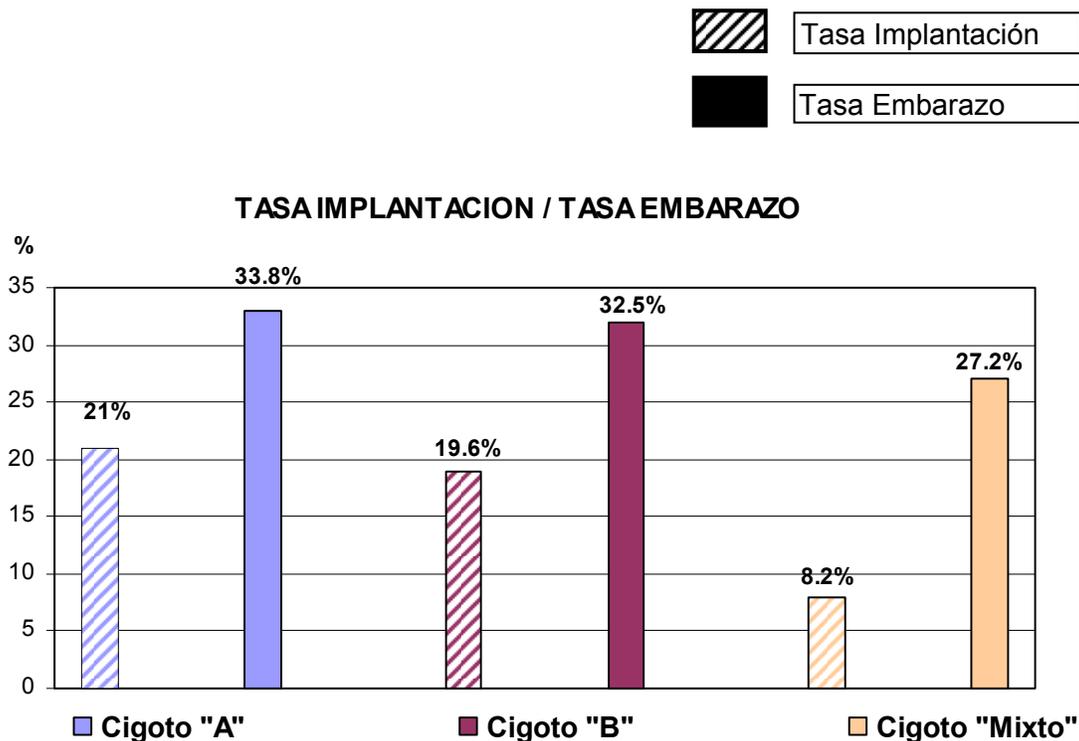


Fig. 27 Tasa de implantación contra tasa de embarazo en cigotos agrupados A, B ó Mixto

La probabilidad de implantación en relación al grupo del cigoto, no demostró diferencia significativa entre el grupo A y B ($p=0.39$). Sin embargo, al compararlas con el grupo mixto existe una diferencia significativa ($p=0.003$ y $p=0.012$, respectivamente).

Al comparar la tasa de embarazo entre los diferentes grupos de cigotos transferidos, no encontramos diferencias significativas (**Tabla 13**). Con una tasa de embarazo del grupo A de 33.8%, en el grupo B 32.5% y del 27.2% en el grupo mixto (**Fig. 27**).

	$H_0: p_A=p_B$	$H_0: p_B=p_M$	$H_0: p_A=p_M$
	$H_A: p_A>p_B$	$H_A: p_B>p_M$	$H_0: p_A>p_M$
Estadística Prueba Z	0.28	2.24	2.78
Valor p	0.389	0.012	0.003

Tabla 13. Probabilidad de que se implante un cigoto del grupo A, B o Mixto.

En los 41 embarazos logrados, se visualizaron por medio de ultrasonido 58 sacos gestacionales. De los cuales, en el grupo A con 22 embarazos, se determinaron 32 sacos gestacionales, grupo B con 13 embarazos y 20 sacos gestacionales, por último, el grupo mixto con 6 embarazos y 6 sacos gestacionales (**Tabla 14**). Únicamente se encontraron implantados más de 1 saco en los grupos A y B.

CIGOTO	NUMERO DE EMBARAZOS	NUMERO DE SACOS
A	22 (53.7%)	32 (51.1%)
B	13 (31.7%)	20 (34.5%)
MIXTO	6 (14.6%)	6 (10.4%)
TOTAL	41 (100%)	58 (100%)

Tabla 14. Relación de cada grupo de cigotos con el número de embarazos y número de sacos gestacionales observados en cada caso.

De acuerdo al grupo de transferencia, se observó una mayor tasa de embarazo del grupo A (33.8%), con una frecuencia aumentada en los embarazos múltiples (7 casos en grupo A y 6 en grupo B). No hubo embarazos múltiples en el grupo mixto (**Fig. 28**).

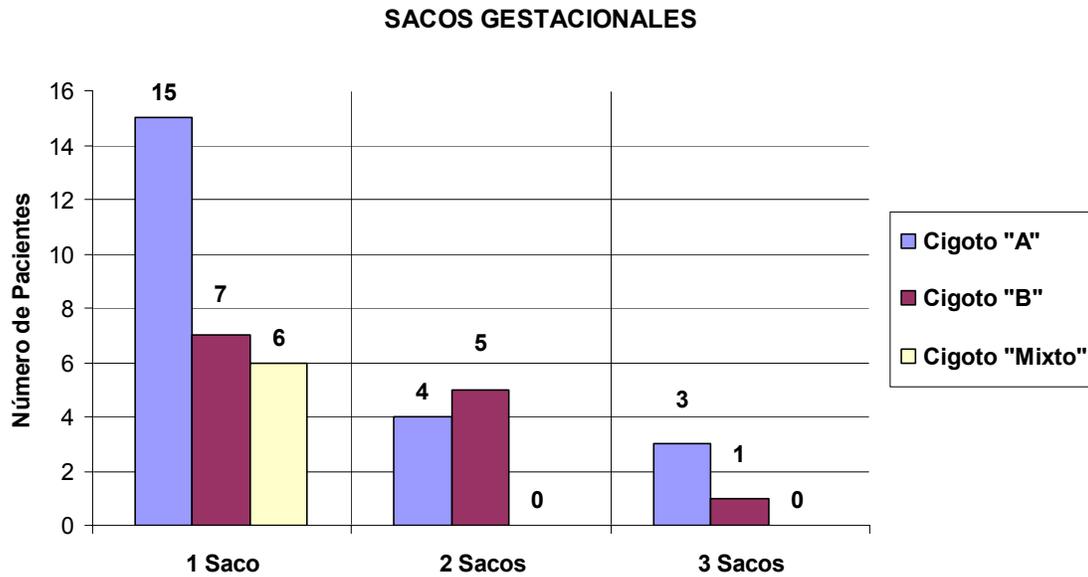


Fig. 28 Número de pacientes que presentaron 1, 2 ó 3 sacos gestacionales en relación con el grupo de cigoto que fue transferido. Se observa que no hubo implantación múltiple en el grupo de cigoto mixto.

De los 13 casos con embarazo múltiple, 9 fueron dobles (grupo A: 4 casos, grupo B: 5 casos) y 4 de alto orden fetal (grupo A: 3 casos, grupo B: 1 caso) (**Fig. 28**).

XII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El presente estudio se realizó con la finalidad de mejorar los resultados clínicos de nuestras pacientes, en lo que respecta a disminuir el embarazo múltiple, mediante la selección de un cigoto con mayor potencial de implantación. Los resultados presentados indicaron que las características morfológicas del cigoto tienen un efecto directo en el desarrollo del embrión in vitro, lo cual podemos inferir por el aumento en la tasa de implantación (19).

Tesarik y Greco (1999), presentaron nuevos criterios morfológicos a evaluar del cigoto. Realizando un estudio retrospectivo para determinar si el desarrollo progresivo de un cigoto podría basarse en una única revisión no invasiva de la morfología del pronúcleo a las 14-18 horas posteriores a la inseminación, tomando en cuenta el número y distribución de los nucleolos en cada pronúcleo. Determinando que un cigoto óptimo tenía un patrón 0 y los morfológicamente distintos al patrón 0 se clasificaron en patrón 1 al 5. La frecuencia de cigotos arrestados en el patrón 0 fue solo del 8.5% en comparación con 31.6%, 21.9%, 30% y 24.1% para los patrones 1-5 respectivamente. Con un total de 67 ciclos, logrando embarazo en 22 de 44 ciclos (50%), en los cuales, al menos se transfirió un embrión de patrón 0, pero solamente se logró el embarazo en 2 de 23 ciclos (9%) donde se transfirieron embriones con patrón 1-5.

Lo encontrado por Tesarik y Greco con respecto a cigotos arrestados, es similar a lo que encontramos en nuestro estudio. Donde la proporción de cigotos arrestados es mayor conforme las anomalías morfológicas aumentan, esto se demuestra en nuestro estudio, con una disminución en la incidencia de cigotos A arrestados y su aumento en los cigotos C.

Se observa la misma relación en las tasas de implantación y de embarazo, que se incrementan notablemente cuando se transfieren embriones procedentes de cigotos con una morfología adecuada (patrón 0 o patrón A) y disminuye con la participación de embriones de un cigoto con múltiples anomalías (patrón 1-5 o patrón B-Mixto).

Wittemer y colaboradores (2000) en un estudio prospectivo, utilizaron la escala de valoración del cigoto de Tesarik y Greco, y en base al patrón del cigoto evaluaron el desarrollo embrionario en 262 casos. Encontrando, que cigotos con patrón 0 desarrollaban embriones de “buena calidad” con mayor potencial de implantación que los embriones desarrollados a partir de los patrones restantes ($p < 0.01$). Las transferencias embrionarias con al menos un embrión de patrón 0 resultaron con una tasa de embarazo significativamente mayor que en las transferencias donde no se incluyó ningún embrión con patrón 0 (39.5% contra 19.7%, $p < 0.01$). Además, no encontraron relación entre parámetros clínicos (edad y factor de infertilidad) y el patrón del cigoto en su estudio (20).

Al igual que Wittemer, encontramos una relación directa del desarrollo del embrión con respecto al patrón del cigoto. **La probabilidad de obtener un embrión de buena calidad se incrementa cuando se realiza una selección en base a la calificación del cigoto.** Por lo tanto, tenemos una significancia estadística con respecto a la tasa de implantación, siendo mayor en embriones de un grupo A que en embriones de un grupo mixto ($p = 0.05$).

Scott (2003) realiza un estudio retrospectivo, aplicando una escala de evaluación del cigoto (Z- score) en base al número, tamaño y alineación de los nucleolos, presencia de un halo citoplasmático y la orientación del núcleo en relación con el cuerpo polar, denominando al óptimo cigoto como Z1 y conforme presentaran anomalías los clasificaba de Z2-Z4 (Fig.10) en 429 casos, y relacionó la evaluación del cigoto con el desarrollo embrionario en 2°, 3° y 5° día.

Obtuvo 7145 ovocitos, de los cuales 5335 en metafase II (75% madurez), dando una tasa de fertilización del 73%. La edad y el factor de infertilidad no se sometieron a un análisis, ya que se ha demostrado que no afectan la evaluación del cigoto. El total de cigotos se clasificó de la siguiente manera: 1550 (40.7%) Z1, 969 (25.4%) Z2, 879 (23.1%) Z3 y 409 (10.7%) Z4. La escala de evaluación del cigoto (Z-score) y la presencia o ausencia del halo citoplasmático tiene un efecto significativo en la tasa de desarrollo embrionario en 3° y 5° día, ya que su ausencia determina un lento desarrollo, una pobre morfología, aumento en la fragmentación y embriones de mala calidad. Una baja calificación con dicho sistema de evaluación, equivale a un desarrollo lento, una formación inadecuada del blastocisto y una evaluación morfológica mala del embrión. Concluye, la escala Z-score puede ayudar a predecir embriones con alto y bajo potencial de desarrollo e incluso indicar la salud del cigoto (11).

El sistema de calificación de los cigotos utilizado en el laboratorio de FIV de nuestra clínica, se basa en la suma de dos sistemas. El primero de ellos, es el criterio propuesto por Scott y colaboradores (2003), calificación designada como Z1, Z2 y Z3, el segundo criterio asigna valores numéricos (0 y 1) de acuerdo a la presencia de los siguientes parámetros: Citoplasma, Cuerpos polares, Espacio Perivitelino y Zona Pelúcida. Para determinar la calificación final al cigoto, se realizó una suma del primer criterio (Z-score) con el puntaje obtenido de los parámetros restantes. Del análisis del total de parámetros observados se calificó como cigoto óptimo al Patrón A, y al presentar anomalías en su morfología en cigoto Patrón B y cigoto Patrón C. Obtuvimos embriones de buena calidad a partir de 277 (72%) cigotos con patrón A, 198 (66%) cigotos con patrón B y 15 (54%) cigotos con patrón C. Existe mayor posibilidad, que a partir de un cigoto con adecuada morfología (patrón A) se desarrolle un embrión de buena calidad sin anomalías morfológicas. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en la literatura mundial.

XIII. CONCLUSIONES

En la actualidad, todavía no se ha establecido un método para seleccionar un embrión viable de una cohorte resultante de una inducción de ovulación en un ciclo de fertilización in vitro. La morfología del cigoto ha sido correlacionada con la tasa de implantación en numerosos artículos (Tesarik y Greco, 1999; Scott, 2000; Wittemer, 2000), al igual que se ha relacionado el desarrollo y la morfología del blastocisto con su potencial de implantación (Gardner, 1998; Scott, 2000). Los datos presentados, han mostrado que la morfología de los pronúcleos de un cigoto tiene un efecto significativo en el adecuado desarrollo in vitro de un embrión.

La morfología de los pronúcleos está directamente relacionada con los gametos, son la estructura más temprana del desarrollo del cigoto, que nos permite determinar su salud y normalidad. Esta evaluación del cigoto asociada con la evaluación morfológica del embrión durante el 2°, 3° y 5° día de su desarrollo, permite la selección de embriones con un alto potencial de implantación. No debemos olvidar que la maduración del ovocito, su fertilización y el desarrollo embrionario son continuas etapas dinámicas dentro de los cambios morfológicos del embrión.

El uso de esta estrategia nos guiará a una limitación estricta del número de embriones a transferir y por lo tanto, el poder disminuir la frecuencia de embarazos múltiples con sus importantes repercusiones. Para alcanzar la meta de realizar transferencias de un solo embrión, sin afectar la tasa de implantación y disminuir el riesgo materno-fetal.

1. La morfología de los pronúcleos de un cigoto tiene un efecto significativo en el adecuado desarrollo del embrión in vitro.
2. La morfología de los pronúcleos esta directamente relacionada con los gametos. Su adecuada evaluación puede predecir la salud y normalidad del cigoto.
3. La evaluación del cigoto, asociada con la evaluación morfológica del embrión durante su división celular permite la selección de un mejor embrión con alto potencial de implantación.
4. La utilización adecuada de la evaluación del cigoto y del embrión nos guiara a limitar el número de embriones a transferir, disminuyendo la incidencia de embarazos múltiples.

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Gardner, D. K., Weissman, A., Howles, C., Shohan, Z. (2004) Textbook of assisted reproductive techniques: laboratory and clinical perspectives. *Taylor & Francis Group* 15, 201- 208.
2. Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B., Wagley, L. et al (1998) A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 13, 3434-3440
3. Ludwig, M., Schopper, B., Al-Hasani, S. and Diedrich, K. (2000) Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo law. *Hum. Reprod.*, 15, 325-329
4. Steer, C.V., Mills, C.L., Tan, S.L., Campbell, S., Edwards, R.G. (1992) The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in vitro fertilization and embryo transfer programme. *Human Reproduction*, 7: 117-19.
5. Milki, AA., Hinckley, MD., Gebhardt, J., Dasig, D., Westphal, L.M., Behr, B. (2002) Accuracy of day 3 criteria for selecting the best embryos. *Fertil Steril* ., 77: 1191-5
6. Moore, K., Persaud, T.V.N. (2004) The developing human, clinically oriented embryology. *Elsevier Science*, 2, 16-42
7. Speroff, L., Glass, R., Kase, N. (1999) Clinical gynaecologic endocrinology and infertility. *Lippincott Williams & Wilkins*, 3, 107-122
8. Remohí, J., Pellicer, A., Simón, C., Navarro, J. (2002) Reproducción humana. *McGraw-hill – Interamericana*, 2da. Ed. 4, 23-31
9. Remohí, J., Pellicar, A., Simón, C., Navarro, J. (2002) Reproducción humana, *McGraw-hill – Interamericana*, 2da. Ed. 5, 33-43
10. Remohí, J., Pellicar, A., Simón, C., Navarro, J. (2002) Reproducción humana, *McGraw-hill – Interamericana*, 2da. Ed. 47, 393-399
11. Scott, L. (2003) Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. *Reprod BioMed Online*, 6, 57-70
12. Scott, L. (2002) Embryologic strategies for overcoming recurrent ART treatment failure. *Hum Ferti.*, 5, 206-14

13. Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reprod.* 15, 2394-403
14. Remohí, J., Pellicar, A., Simón, C., Navarro, J. (2002) Reproducción humana, *McGraw-hill – Interamericana*, 2da. Ed. 51, 421-429
15. Veeck, L., (1999) An Atlas of human gametes and conceptuses. *Parthenon Publishing*, 6, 46-51
16. Salumets, A., Hyden-Granskog, C., Makinen, S., Suikkari, A.M., Tiitinen, A., Tuuri, T. (2003) Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Human Reprod.*, 18, 821-5
17. Van Royen, E., Mangelschots, K., et al. (1999) Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Human Reprod.*, 14, 2345-9
18. Neuber, E., Rinaudo, P., Trimachi JR., Sakkas, D. (2003) Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Human Reprod*, 18, 1307-12
19. Tesarik, J., Greco, Ermanno (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reprod*, 14, 1318-1323
20. Wittemer, C., Bettahar-Lebugle, K., Ohl, J., Rongieres, C., Nisand, I., Gerlinger, P., (2000) Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Human Reproduction* 15, 2591-2597