

Calidad embrionaria en relación a la morfología pronuclear

Embryonic quality related to the pronuclear morphology

Moreno M, López N, Palomo I, Ordás J

Resumen

El objetivo de este estudio fue analizar si la calidad embrionaria y la tasa de gestación e implantación dependen del patrón pronuclear.

Para ello se analizaron retrospectivamente 200 cigotos de 50 ciclos de FIV-ICSI. Los pacientes fueron incluidos al azar en el periodo comprendido entre el 25 de Noviembre del 2001 y el 19 de Noviembre del 2002.

Los pronucleos fueron observados 18 horas post -microinyección o post- inseminación. Los patrones usados fueron los propuestos por Scott et al (2000), y se basan en el tamaño de los pronucleos, el número de nucleolos y la polaridad.

De los 200 Zigotos analizados, un 16% presentó patrón Z1, un 21% patrón Z2, un 50,5% patrón Z3, y un 12,5% patrón Z4, el patrón más común es el Z3 (pronucleos iguales, con igual nº de nucleolos, no alineados).

Con respecto a nuestros resultados, no hay relación entre el patrón pronuclear y la morfología embrionaria. En nuestro estudio observamos que cuando el patrón de algunos de los embriones seleccionados para el transfer es Z1-Z2-Z3 conseguimos gestación, pero no conseguimos gestación cuando el patrón es sólo Z4. Hay combinaciones que dan lugar a un 100% de tasa de implantación, estas son Z1-Z2-Z2, y Z2-Z2-Z2, hay otra combinación que da lugar a una tasa de implantación del 50% esta es Z1-Z2-Z3.

Aunque el nº de casos estudiados es bajo, lo que si parece interesante es que cuando estemos frente a estas combinaciones, independientemente de la calidad embrionaria, de la edad o del nº de ciclo quizás convendría reducir el nº de embriones a transferir, evitando así las gestaciones múltiples, queda por valorar si esto afectaría a los resultados generales, en la actualidad seguimos con el estudio para poder sacar conclusiones fiables.

Palabras clave: Morfología pronuclear. Calidad embrionaria. Tasa de gestación. Tasa de implantación. FIV-ICSI.

Correspondencia: Dra. Manuela Moreno
Instituto de Ginecología y Medicina de la Reproducción
Dres. Ordás y Palomo
C/ Juan Bravo, 25 Bajo Izda.
28006 Madrid
e-mail: instituto@ordasypalomo.com

Summary

The purpose of this study was to analyze if the embryonic quality, and rate of implantation and the rate of gestation depending on the pronuclear patterns.

Thus, 200 zygotes and 50 FIV-ICSI cycles were analysed retrospectively. Patients were included randomly between November 25, 2001 and November 19, 2002.

The Pronuclei were observed 18 hours post-insemination and post-microinjection.

Patterns used were those proposed by Scott et al (2000), and are based on the size of the pronuclei, the number of nucleoli and the polarity.

Of the 200 zygotes analyzed, 16% presented Z1 pattern, 21% presented Z2 pattern, 50,5% present Z3 pattern, and 12,5% present Z4 pattern. The most usual pattern is Z3 (same pronuclei, with equal number of nucleoli, not aligned).

Regarding our results, there is no relation between the pronuclear pattern and the embryonic morphology. In our study we observed that when the pattern of some of the embryos selected for the transfer are Z1-Z2-Z3 we reach gestation, but we do not reach gestation when the pattern is only Z4. There are combinations that give 100% of the implantation rate, which are Z1-Z2-Z2. There is another combination that gives an implantation of 50 % which is Z1-Z2-Z3.

Although the number of cases studied is low, what seems to be very interesting is that when we are in front of these combinations, independently to the embryonic quality, to the age or to the number of cycles, perhaps it would be convenient to reduce the number of embryos to transfer. Thus, we avoid the multiple gestation. It still must be valued if this would affect the general results. At present, we continue the study in order to reach reliable conclusions.

Key words: Pronuclear morphology. Embryonic quality. Gestation rates. Implantation rates. FIV-ICSI.

INTRODUCCIÓN

El éxito de un programa de Reproducción Asistida se basa fundamentalmente en una buena selección de los embriones a transferir, con el fin de aumentar la tasa de gestación por ciclo, y disminuir el número de embarazos múltiples.

La clasificación de la calidad embrionaria en cinco grados que venimos utilizando se realiza a las 48 horas de cultivo y considera la simetría de las blastómeras, la fragmentación, la velocidad de división, espesor de la zona y presencia o ausencia de blastómeros polinucleados, pero hay otros muchos aspectos que pueden ser tenidos en consideración. Los pronúcleos son el primer signo de fertilización, ambos deberían de aparecer al mismo tiempo y juntos. Fallos de este hecho a las 16-18 horas postfertilización podrían suponer una disfunción en la formación del áster, lo que conduciría a un desarrollo embrionario anormal. El primer factor a tener en cuenta en la clasificación de los pronúcleos es el alineamiento (1). Fallos en la alineación de los pronúcleos supone un fallo en el proceso de desarrollo embrionario.

Así mismo se ha investigado la función y los com-

ponentes moleculares de los nucleolos, observándose que estas estructuras aparecen en cigotos de mamíferos como consecuencia de una síntesis pronuclear temprana de RNA .

Cuando el ovocito se activa por la entrada del espermatozoide, ocurren una serie de sucesos. En humanos el centriolo deriva del espermatozoide(2) , el centriolo y los microtúbulos son los responsables de que el pronucleo masculino y femenino estén juntos, si esto no ocurre el desarrollo embrionario se ve comprometido (3).

El tamaño de los pronucleos es también importante, normalmente hay pequeñas diferencias en el tamaño de los dos pronucleos, pero diferencias importantes están asociadas a defectos cromosómicos, tales como aneuploidias (4) algunos de estos cigotos pueden tener apariencia normal en día 2 ó 3 y sin embargo ser anormales (5).

La clasificación de los pronucleos se basa en el tamaño, nº y distribución de los nucleolos, el número óptimo de nucleolos por nucleo es entre tres y siete. Los nucleolos forman las "áreas organizadoras de nucleolos" en las que los genes codifican para r RNA.

El nº y la localización de las "áreas organizadoras de nucleolos" son especie- específicas (6).

Nuestro equipo consideró la posibilidad de utilizar el criterio de patrón pronuclear junto con la clasificación morfológica habitual, e incorporarla a la rutina del laboratorio de Fiv , con el fin de observar si existe alguna relación entre dicho patrón , la morfología embrionaria y las tasas de implantación y gestación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudia retrospectivamente la morfología de 200 cigotos correspondientes a 50 pacientes sometidas a ciclos de FIV-ICSI durante un periodo de tiempo entre Noviembre de 2.001 y el mismo mes del 2.002. Los 50 ciclos se seleccionaron al azar para que los resultados obtenidos fueran extrapolables a la población general.

La edad media de las pacientes fue de 35,1 años.

La estimulación de la ovulación se llevó a cabo en todos los casos mediante desensibilización previa con agonistas de laGnRH (aGnRH) y tratamiento con FSH recombinante (Gonal o Puregón indistintamente). La ovulación fue inducida con 10.000 UI de HCG que se administró cuando los folículos alcanzaron un diámetros iguales ó mayores de 18 mm con niveles de estradiol plasmático correspondientes a 150-300 pg/ml por cada folículo mayor o igual de 18 mm.

La punción folicular se efectuó por vía transvaginal ecoguiada a las 36 horas de la inyección de HCG .La fase lútea fue apoyada con progesterona vía vaginal u oral, comenzando el mismo día de la punción .A los 12 días post-transferencia se efectuó una determinación de subunidad beta de hCG para comprobar la existencia o no de gestación.

Los oocitos MII fueron microinyectados ó inseminados. Tras la microinyección ó inseminación los ovocitos permanecieron en cultivo (IVF Scandinavian) hasta las 18 horas siguientes. En este momento se valoró la presencia de fertilización y los cigotos se individualizaron en microgotas de 20 microlitros de medio G1 (Scandinavian).

La clasificación de los cigotos se realizó , en primer lugar de acuerdo con la morfología del embrión en el momento de la transferencia (según el modelo G1, G2, G3, G4 velocidad de división y ausencia de blastómeros polinucleados), y en segundo lugar mediante el patrón de morfología pronuclear (7) y cuyos criterios quedan reflejados en la gráfica 1. A igualdad de calidad embrionaria clásica se transfirieron los embriones de mejor patrón pronuclear.

El número de embriones a transferir se determinó dependiendo de la edad de la paciente, número de intentos previos y la calidad embrionaria. Todas las

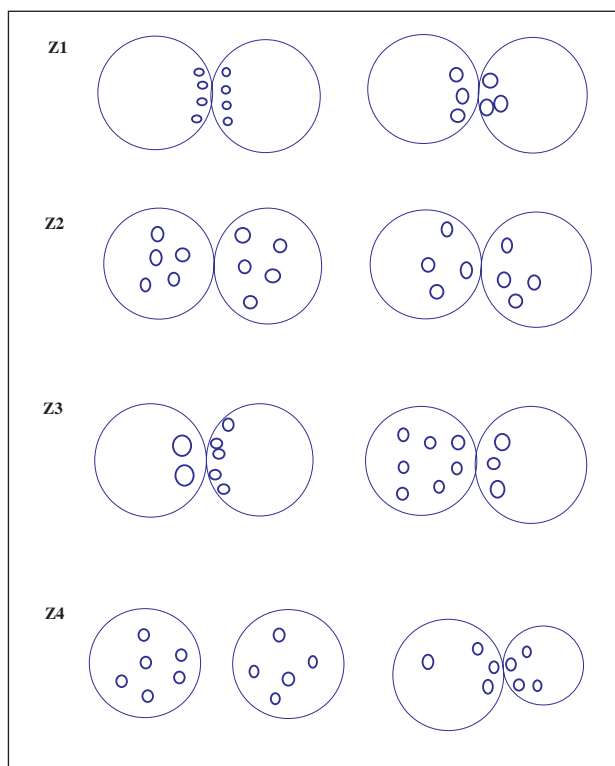


Gráfico 1

Patrón de morfología pronuclear propuesto por Scott et al.

transferencias se llevaron a cabo entre las 48 y las 72 horas postpunción.

El análisis estadístico empleado fue una tabla de contingencia y un test de chi cuadrado con un nivel de significación para $p < 0,1$.

RESULTADOS

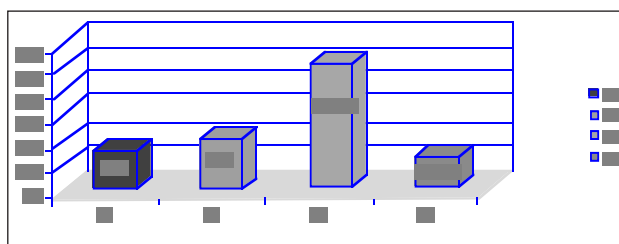
Los resultados globales según el patrón pronuclear de Scott y cols quedan expuestos en la tabla I, junto con el gráfico 2. Se observa que el patrón pronuclear más frecuente es el Z3 (pronúcleos iguales con igual número de nucleolos, pero no alineados).

La tasa de gestación/ciclo fue del 36% , con una tasa de implantación/embrión de un 27 por cien. La tasa de abortos fue de un 11 por cien y la tasa de embarazos triples se situó en un 25 por cien.

En la gráfica 3 se expresa la correlación existente entre los cigotos de acuerdo con la calidad embrionaria de los cuatro grados clásicos y la clasificación pronuclear de Scott. Los embriones Z1 y Z2 son los que mayor número de embriones G1 y G2 integran. Se aprecian diferencias estadísticamente significati-

Tabla 1*Resultados según el patrón de Scott (2000)*

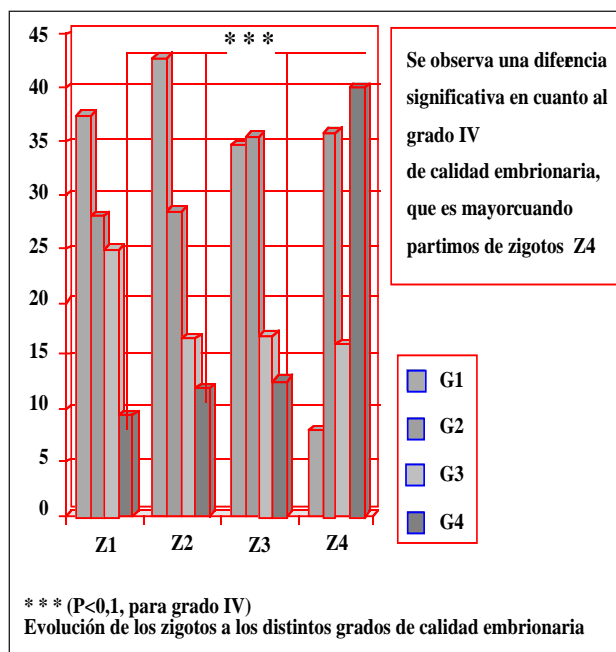
Nº Ciclos	50
Nº transferencias realizadas	50
Media de edad	35,1
Nº cigotos analizados	200
Nº embriones con patrón Z1	32
Nº embriones con patrón Z2	42
Nº embriones con patrón Z3	101
Nº embriones con patrón Z4	25
Tasa de gestación/ciclo	36%
Tasa de implantación/embrión	27%
Nº embriones transferidos	111
Nº sacos gestacionales	30
Nº de Abortos	2
Tasa de Aborto	11,1%
Nº Gestaciones únicas	11(55%)
Nº Gestaciones dobles	2 (10%)
Nº Gestaciones Triples	5 (25%)
Nº Gestaciones Bioquímicas	2 (10%)

**Gráfico 2***Frecuencia de cada tipo de patrón de los cigotos analizados*

vas para el grado IV de calidad embrionaria con $p < 0.1$ (p valor = 0,0035)

En cuanto a las combinaciones de embriones seleccionados para transferencia se puede observar que se consiguen gestaciones con patrones Z1, Z2 y Z3, pero no se obtiene ninguna gestación con patrón Z4 (tabla II y III). Las combinaciones Z1 y Z2 dan lugar a gestaciones triples, disminuyendo el riesgo de las mismas a medida que la calidad pronuclear disminuye. Las diferencias no son estadísticamente significativas.

Debido a que estos resultados no nos parecían concluyentes procedimos a una reclasificación de estos embriones incluyendo los Z1 y Z2 como patrón

**Gráfico 3***Evolución de los cigotos*

P1, los Z3 como patrón P2 y los Z4 como patrón P3. La comparación de esta nueva clasificación con la clasificación de calidad embrionaria clásica queda reflejada en la gráfica 4. En ella se aprecia como el patrón P1 y P2 comprenden la mayor parte de los embriones de G1 y G2, mientras que el patrón P3 incluye los embriones de peor calidad. Las diferencias son estadísticamente significativas para el G1 y el G4, pero no para los grados intermedios (p valor = 0,0120). Los resultados de esta nueva clasificación en cuanto a implantación embrionaria se recogen en la tabla IV.

Hubo 4 transferencias en las que todos los embriones implantaron, estos embriones se compararon con el resto y se vio que no había diferencias con respecto al nº de nucleólos pero sí con respecto a la polarización, en el grupo de embriones con implantación comprobada el número de nucleólos en los dos pronucleos juntos nunca fue menor de 5, y el número máximo nunca fue mayor de 16.

DISCUSIÓN

En este estudio se pretende valorar si el patrón pronuclear sirve como valor añadido para incluir en el proceso de selección embrionaria previo a la transferencia, con el fin de mejorar los índices de gesta-

Tabla 2
Combinaciones de embriones transferidos que dan lugar a gestación

Combinaciones embriones transferidos	Nº transfer	Nº gest	Bioquímica	Única	Gemelar	Triple	Aborto	Tasa de implantación
3 embriones con patrón Z1-Z2-Z2	3	3				3		100%
3 embriones con patrón Z2-Z2-Z2	1	1				1		100%
3 embriones con patrón Z1-Z2-Z3	2	2	1			1		50%
3 embriones con patrón Z2-Z3-Z3	3	3		2	1			44.4%
2 embriones con patrón Z2-Z2	5	4	1	2	1			40%
3 embriones con patrón Z3-Z3-Z4	1	1		1				33.3%
2 embriones con patrón Z1-Z3	3	1		1				16.6%
2 embriones con patrón Z3-Z3	4	1		1				12.5%
3 embriones con patrón Z1-Z3-Z3	9	4		3			1	11.1%
3 embriones con patrón Z3-Z3-Z3	3	1		1				11.1%

Tabla 3
Combinaciones de embriones transferidos que no han implantado

Combinaciones de embriones transferidos	Nº transferencias
3 embriones con patrón Z2-Z3-Z4	1
1 embrión con patrón Z3	2
2 embriones con patrón Z3-Z4	3
1 embrión con patrón Z2	3
2 embriones con patrón Z2-Z4	1
2 embriones con patrón Z1-Z4	1
2 embriones con patrón Z4-Z4	2
2 embriones con patrón Z2-Z3	1
2 embriones con patrón Z2-Z3	1

ciones y disminuir el número de embarazos múltiples y abortos.

Los resultados parecen indicar la existencia de alguna correlación entre los mejores patrones pronucleares y la morfología embrionaria y viceversa

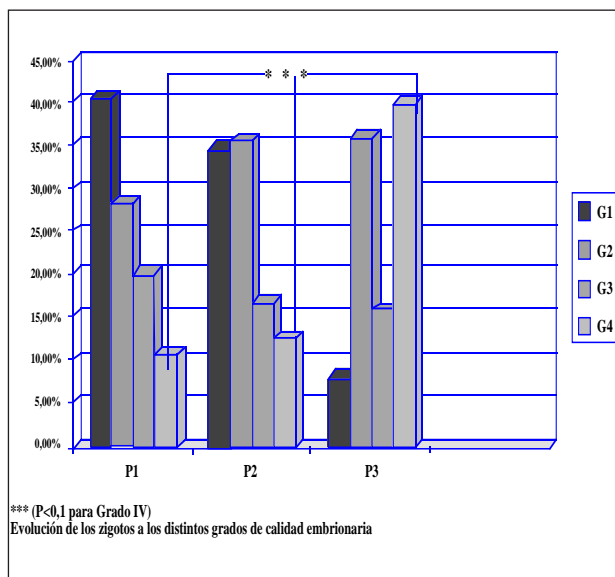


Gráfico 4
Evolución de los cigotos según el nuevo patrón de clasificación

Tabla 5
Resultados según el nuevo patrón de clasificación

Nº Ciclos	50
Nº transferencias realizadas	50
Media de edad	35,1
Nº cigotos analizados	200
Nº embriones con patrón P1	74
Nº embriones con patrón P2	101
Nº embriones con patrón P3	25

COMBINACIONES DE EMBRIONES TRANSFERIDOS QUE DAN LUGAR A GESTACIÓN

Combinaciones de embriones transferidos	Nºtransfer	Nºgest	Bioquímica	Única	Gemelar	Triple	Aborto	Tasa de implantación
3 embriones con patrón P1-P1-P1	4	4				4		100%
3 embriones con patrón P1-P1-P2	2	2	1			1		50%
2 embriones transferidos con patrónP1-P1	5	4	1	2	1			40%
3 embriones transferidos con patrón P2-P2-P3	1	1		1				33.3%
3 embriones transferidos con patrón P1-P2-P2	12	7		5	1		1	19.4%
2 embriones transferidos con patrón P1-P2	3	1		1				16.6%
2 embriones transferidos con patrón P2-P2	4	1		1				12.5%
3 embriones transferidos con patrón P2-P2-P2	3	1		1				11.1%

(Gráficos 3 y 4).Sin embargo esta correlación desaparece en los grados G2 y G3. El grado 2 puede incluir embriones con patrones pronucleares de todo tipo, sin que haya diferencias estadísticamente significativas; lo mismo sucede con los embriones G3, aunque en estos se aprecia un mayor número en los patrones Z2 a Z4. Solamente el grado 4 tiene una correlación directa con el patrón pronuclear Z4, pudiendo decirse que existe una clara significación entre la peor calidad embrionaria y el peor patrón pronuclear

Aunque los resultados no consigan demostrar una correlación entre la morfología embrionaria y el patrón pronuclear mas que en los casos extremos, lo que si parece evidente es que hay ciertas combinaciones

muy problemáticas en cuanto a la tasa de implantación (ver tabla II).Las combinaciones en las que existen embriones Z1 y Z2 son las que dan lugar a mayor número de embarazos pero también a mayor número de embarazos múltiples (cinco embarazos triples en seis transferencias). Si bien somos conscientes de que el número de casos analizados no es suficiente para sentar conclusiones, es evidente que la tasa de triples resulta inaceptable, podría plantearse disminuir el número de embriones a transferir en casos de pacientes jóvenes cuya clasificación pronuclear sea Z1 y Z2.

Es evidente , como se deduce de las tablas III y IV , que a medida que el patrón pronuclear es peor también empeoran los índices de gestaciones y disminu-

yen linealmente las tasas de triples y de gemelares. Con embriones Z4 no se ha producido ningún embarazo, curiosamente aún en los casos en que se han transferido asociados con embriones de mejor calidad y mejor patrón pronuclear.

Si sumamos los embriones Z1 y Z2 (lo que hemos llamado en nuestra clasificación P1) veremos que quedan incluidos la mayor tasa de embarazos y una gran parte de los embriones de grado 1 y 2 .El P3, sin embargo acumula el máximo de embriones de peor calidad morfológica con la excepción de una alta tasa de embriones G2, a pesar de lo cual la tasa de embarazos conseguida es ínfima en relación a los otros , P1 y P2.

Podemos terminar diciendo que aunque nuestro estudio no sea concluyente, la suma del estudio del patrón pronuclear a la morfología del embrión nos proporciona datos de gran valor a la hora de mejorar nuestros resultados de FIV, cuya finalidad última es conseguir el máximo de eficacia(más alta tasa de embarazos) con el mínimo de riesgos para la paciente (menor tasa de gemelares y triples).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Scott LA, and Smith S.:** The succesful use of pronuclear embryo transfers the day after oocyte retrieval. Hum Reprod, 1998; 13: 1003-1013.
2. **Schatten G.:** The centrosome and its mode of inheritance; the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. Dev Biol, 1984; 165: 299-335.
3. **Sathananthan AH, Kola I, Trounson A, et al.:** Centrioles in the beginning of human development. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1991; 88: 4806-4810.
4. **Munné S, and Cohen J.:** Chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod; Update, 1998; 4: 842-855.
5. **Sadowy S, Tomkin G and Munné S.:** Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. Zygote, 1998; 63: 137-141.
6. **Goessens G.:** Nucleolar structure. Int. Rev. Cytol, 1984; 87: 107-158.
7. **Scott LA, Alvero R, Leondires Mark, Miller Bradley.:** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod, 2000;15: 2394-2403.