

Biología de la Reproducción

Evaluación de la eficacia del uso del score embrionario múltiple en relación a resultados expresados en parto con nacido vivo

Evaluation of the effectiveness of the use of the multiple embryonic score in relation to results expressed in live-birth delivery

Tersoglio AE¹, Sibuet ME¹, Tersoglio S¹

¹Centro de Estudios en Reproducción Humana, Mendoza, Argentina.

Resumen

OBJETIVOS: Evaluar la predictibilidad del score embrionario múltiple (SEM) día 1 y al día de la transferencia (días 3 y 5), en relación a parto con nacido(s) vivo(s). **MATERIAL Y METODO:** Estudio retrospectivo, longitudinal y analítico. En 85 ciclos se analizan 228 embriones transferidos. De los embriones transferidos se definieron dos grupos: Grupo A, embriones transferidos que resultaron en parto con nacido(s) vivo(s) y Grupo B embriones transferidos en ausencia de parto con nacido(s) vivo(s). **RESULTADOS:** La tasa de embarazo clínico, de nacidos vivos y partos con nacido(s) vivo(s), todos por transferencia, resultaron en 29,4, 31 y 22,3 % respectivamente. Ambos grupos no presentaron diferencias en relación a edad, indicación de procedimiento (FIV/ICSI) y número de embriones transferidos. Un mayor SEM es obtenido en los días 1, 3 y 5 en Grupo A, resultando significativamente diferente en relación a B (p 0,01, 0,009 y 0,006 respectivamente). Día 3 resulta con un mayor número de células en Grupo A en relación a Grupo B ($7,6 \pm 1,4$, $6,4 \pm 1,8$, $p < 0,001$). SEM días 1, 3 y número de células al día 3 presentaron Odds ratio (OR) con un SEM ≥ 13 de 1.38, 1.36 y 1.42, con un intervalo de confianza 95% (CI) de 1.1-1.7, 1.1-1.66 y 1.18-1.7 respectivamente. SEM día 5 presenta OR de 1.99, con un CI 1.13-3.49. En el día 5 la probabilidad de embarazo con SEM 15 es 0.66. SEM día 1 y 3 en relación a desarrollo de blastocisto muestran un OR de 1.51 y 2.05 y un CI de 1.16-1.98 y 1.45-2.91 respectivamente. **CONCLUSIONES:** Un SEM ≥ 13 en embriones transferidos en el día 5 con FIV/ICSI se presenta con alta predictibilidad para la obtención de nacido(s) vivo(s). SEM en días 1, 3 y número de células presentan solo una asociación y probabilidad positiva en relación a resultados. Por último, los SEM días 1 y 3 resultan predictores para la obtención de blastocisto.

Palabras clave: Reproducción asistida. Score embrionario. Embrión humano. IVF. Blastocisto.

Correspondencia: Dr. Tersoglio AE
CERH
Huarpes 18
CP 5500, Mza, Argentina,
E-mail: cerh.tersoglio@arlinkbbt.com.ar

Summary

OBJECTIVES: To evaluate predictability of the multiple embryo score (MES), day 1 and until the transfer day (days 3 and 5), in relation to live-birth delivery. **MATERIAL AND METHOD:** This is a retrospective, longitudinal and analytic study. In 85 cycles, 228 transferred embryos are analyzed. Two groups of embryo transferred were defined: Group A with live birth delivery and Group B embryos transferred without live-birth delivery. **RESULTS:** Clinical pregnancy rate, live birth rate and live-birth delivery rate all by transfer was 29.4%, 31% and 22.3% respectively. In both groups there were no differences in relation to age, In vitro fertilization procedure (IVF/ICSI) and number of embryos transferred. MES in the days 1, 3 and 5 in Groups A and B were significantly different ($p < 0.01$, 0.009 and 0.006 respectively). Day 3: Group A had a bigger number of cells in relation to Group B (7.6 ± 1.4 , 6.4 ± 1.8 , $p < 0.001$). MES days 1, 3 and the number of cells at day 3 showed Odd ratios (OR) with a MES ≥ 13 of 1.38, 1.36 and 1.42, with an interval of confidence 95% (CI) of 1.1-1.7, 1.1-1.66 and 1.18-1.7 respectively. The logistic regression of the MES in day 5 showed OR 1.99, with a CI 1.13-3.49. In day 5 the pregnancy probability with MES ≥ 15 was 0.66. MES day 1 and 3 in relation to blastocyst development resulted in OR of 1.51 and 2.05 and a CI of 1.16-1.98 and 1.45-2.91 respectively. **CONCLUSION:** Embryos transferred in day 5 with MES ≥ 13 , presented a high rate of predictability for live-birth delivery. MES days 1-3 and the number of cells in day 3 showed only correlation and positive probability in relation to results. A MES ≥ 13 in days 1 and 3 was observed associated to blastulation.

Key words: ART. Score embryonic. Human embryo. IVF. Blastocyst

INTRODUCCIÓN

Con el objeto de incrementar en FIV/ICSI las tasas de embarazo, en los últimos años se han focalizado los esfuerzos en mejorar la calidad de los embriones transferidos y optimizar los medios de cultivo. La maduración del ooplasma es el primer evento de un complejo proceso y sus defectos son posteriormente expresados en la embriogénesis temprana (1). La aplicación de la video cinematografía permitió determinar los eventos morfológicos que ocurrían en el ovocito/zigoto. En un inicio, los ovocitos fertilizados muestran granulación central con un halo claro que corresponde a la concentración organular, período en el que el espermatozoide se descondensa y se vuelve visible la segunda placa metafásica con extrusión del segundo cuerpo polar e identificación de ambos pronúcleos (2). El aporte del centrosoma espermático a la organización microtubular del cigoto posibilita la posterior organización del huso mitótico (3, 4). La aparición de dos pronúcleos, es el primer evento evaluable en la embriogénesis temprana, expresando procesos dinámicos que serán de utilidad en el seguimiento lineal embrionario. Los factores que inducen la transformación del núcleo espermático y la formación de los pronúcleos materno y paterno están localizados en la vesícula germinal del ovocito en desarrollo, los que son posteriormente reensamblados durante la formación de los pronúcleos (5, 6). En cuanto al tiempo de aparición de los pronúcleos, se ha

demostrado una mayor precocidad en ICSI comparado con FIV, como el de una alta proporción de asincronía pronuclear en FIV (7). El alineamiento de los nucleolos y la oposición pronuclear se consideran criterios de transferencia, confirmada tanto en FIV como en ICSI (8, 9, 10, 13). Una posterior revisión demostró que embriones que presentan pronúcleos opuestos y centrales, con un número igual de nucleolos alineados (Z1), evolucionan con una mayor tasa de blastulación y con un significativo aumento en la tasa de embarazo e implantación (14-16). Aún cuando, la correlación día a día en cultivos embrionarios no ha sido totalmente probada, sugiriendo que la evaluación en pronúcleos (PN) se muestra independiente en relación a los días subsiguientes (17). Un tamaño desigual y la separación de ambos PN han sido asociados a baja calidad embrionaria con un aumento de la incidencia de multinucleación (14,18). El alineamiento refleja un DNA intacto con un metabolismo normal y adecuada reserva microtubular, características de buena calidad en un cigoto (19). La sincronía, podemos evaluarla precozmente en estado pronuclear y se expresa por nucleolos de tamaños y números similares, siempre que la observación sea en G1; en los casos de fusión nucleolar precoz y en donde predomina la presentación multinucleolar con nucleolos pequeños, estas podrían ser atribuidas a formas inmaduras o incompletas (20, 21). Las asincronías y asimetrías pueden ser un indicador de disturbios en el huso mitótico, frecuentemente asociados a una dis-

función centrosomal o por defectos en el empaquetamiento del DNA espermático (21, 22).

Un 22% a un 37% de cigotos con pronúcleos óptimos muestran alteraciones cromosómicas, aumentando al 50% en presencia de nucleolos irregulares y no alineados (23, 24). Factores epigenéticos, como condiciones de cultivo y protocolos de estimulación pueden inducir anomalías cromosómicas (25). La presencia de 1 PN no invalida al cigoto, ya que un análisis de los cariotipos indican que en un 46 a 80% de estos embriones son diploides, no distinguiendo si eran productos de fusión pronuclear o fertilización partenogénica (26, 27). Con el estudio de la presencia del cromosoma Y se determinó que el 45 al 48% se trataba de embriones diploides productos de fertilización, descartándose lisis asincrónica de la membrana pronuclear (28,29).

Primer clivaje

El estadio de cigoto representa el retorno a la división mitótica siguiendo a la finalización de la meiosis materna con la entrada en G1, y la transición a dos células depende de los incrementos repetitivos de calcio intracelular (30-33). Varios trabajos muestran que embriones en dos células a las 24-25 horas presentan una mayor tasa de clivaje, de blastulación y ciclos conceptuales que los que no lo hacen precozmente (34-37).

Parámetros morfológicos día 2 y 3

La asimetría se señala asociada a la fragmentación y/o multinucleación, señalándose una disminución significativa de la tasa de embarazo e implantación en embriones con $\geq 35\%$ de fragmentación, hecho frecuentemente asociado a mosaicismo (38-41).

Fallas imputables a la carioquinesis sin citoquinesis, fragmentación parcial del núcleo y migración defectuosa de los cromosomas en anafase, se han propuesto como mecanismos de la multinucleación; hecho frecuente en Fertilización in Vitro pero deletéreo a medida que aumenta la proporción de blastómeras afectadas (12, 28, 42, 43).

Cultivo a blastocisto

El clivaje temprano se encuentra bajo control materno, usando transcriptos acumulados durante la ovogénesis, no así en la compactación, en donde el embrión se comienza a mostrar como unidad por los cambios de uniones tipo gap, uniones intermedias, desmosomas e inicio de mecanismos como la apopto-

sis. Sobre un modelo matemático se puede afirmar que un 25% de los embriones se desarrollarán normalmente, otro 25% es dependiente del medio ambiental y un 50% se detendrán (44).

La selección de los embriones a la transferencia históricamente se han basados en la morfología embrionaria de los días 2 y 3 (34,45). Varios autores han demostrado la consistencia de la evaluación del cigoto con capacidad predictiva de embarazo (9, 10, 14, 17). Otros, solo muestran una limitada correlación entre calidad del cigoto y desarrollo embrionario posterior (14, 46). Inicialmente, el cultivo a blastocisto fue introducido para optimizar la selección embrionaria y reducir el número de embriones a la transferencia con el objeto de disminuir la incidencia de embarazo múltiple (47-52). La propuesta del score embrionario múltiple (SEM) ha sido desarrollada para salvar la escasa correlación de cigoto en día 2 y 3; en la presunción de que el análisis estático del cigoto no se comporta como predictivo (15, 53, 54, 55).

Objetivos

a) Evaluar la predictibilidad del score embrionario múltiple (SEM) al día 1 y día de la transferencia (3 y 5) en relación a los resultados del procedimiento expresados en nacido(s) vivo(s).

b) Evaluar los parámetros morfológicos que intervienen en el SEM días 1, 3 y 5 en relación a resultados.

c) Evaluar la predictibilidad de los SEM en días 1 y 3 con el desarrollo a blastocisto.

MATERIAL Y MÉTODO

Población de estudio

Sobre un total de 94 ciclos FIV/ICSI con ovocitos nativos, en los que el procedimiento se realizó por única vez en el año 2004, con un total de 261 embriones transferidos, resultaron asignados para el estudio 85 ciclos con 228 embriones transferidos. Los criterios de exclusión fueron (i) ciclos con uso de espermatozoides de origen no eyaculado, (ii) criotransferencia, (iii) fallas inmunológicas, (iv) dificultad extrema en la transferencia o segundo intento de la misma, (v) transferencias realizadas al día 6. Sobre el total de embriones asignados, se analizaron los SEM en estadio de cigoto (día 1) y de los transferidos en días 3 y 5. Se consideró embarazo clínico a la presencia de sacro con actividad embriocárdica positiva y embarazo evolutivo al feto viable a partir de las 12 semanas después de la transferencia. Parto con nacido(s) vi-

vo(s) se definió a la obtención de un nacido(s) vivo(s) por transferencia independientemente del número de neonatos (en el caso de un trípleto se consideró como un solo nacimiento). Tasa de nacido(s) vivo(s) se consideró al total de neonatos por transferencia. Cada embrión fue identificado con un número correlativo con el objeto del seguimiento del mismo. Los embriones transferidos se agruparon en relación a los resultados del procedimiento, Grupo A: los que presentaron parto con nacido(s) vivo(s) y Grupo B: los que no lograron parto con nacido(s) vivo(s). El flujo del progreso de los sujetos es presentado en Figura 1.

Tratamiento

Todos los ciclos fueron estimulados bajo régimen de Agonista en esquema largo en dosis variables de 0,5 mg/día (Luprón, Lab Abbott) a partir del día 21 del ciclo previo hasta el día de la descarga de HCG. Con un estradiol plasmático (E2) <50 pg/ml se inició

régimen variable de FSHr (Gonal, Lab Serono Argentina) y luego del día 5 con un E2 >500 pgr/ml se asoció LHr (Luveris, Lab Serono Argentina) o HMG (Menopur Lab Ferring, Argentina). Cuando 2 a 3 folículos alcanzaron 17 mm de diámetro promedio con niveles de E2 de 150 a 200 pgr/fol se procedió a la descarga de 10.000 UI de HCG (Gonacor 5000, Lab Ferring). Como soporte de fase lútea, se utilizó progesterona micronizada por vía vaginal (Progest 200 mg, Lab Elea) en dosis diaria de 600 a 800 mgr. La recuperación ovocitaria fue realizada a las 35hs post descarga de HCG, siendo los ovocitos transferidos a medio comercial IVF (MediCult, Dinamarca) preequilibrado a 37°C y bajo CO2 al 5%. En caso de FIV convencional cada ovocito fue inseminado en cápsula abierta con una concentración de 30.000 espermatozoides en 1 ml de medio IVF (MediCult, Dinamarca), con un tiempo máximo de interacción de 6 horas. En ICSI, según técnica, se procedió a la inyección espermática, solo con ovocitos en metafase

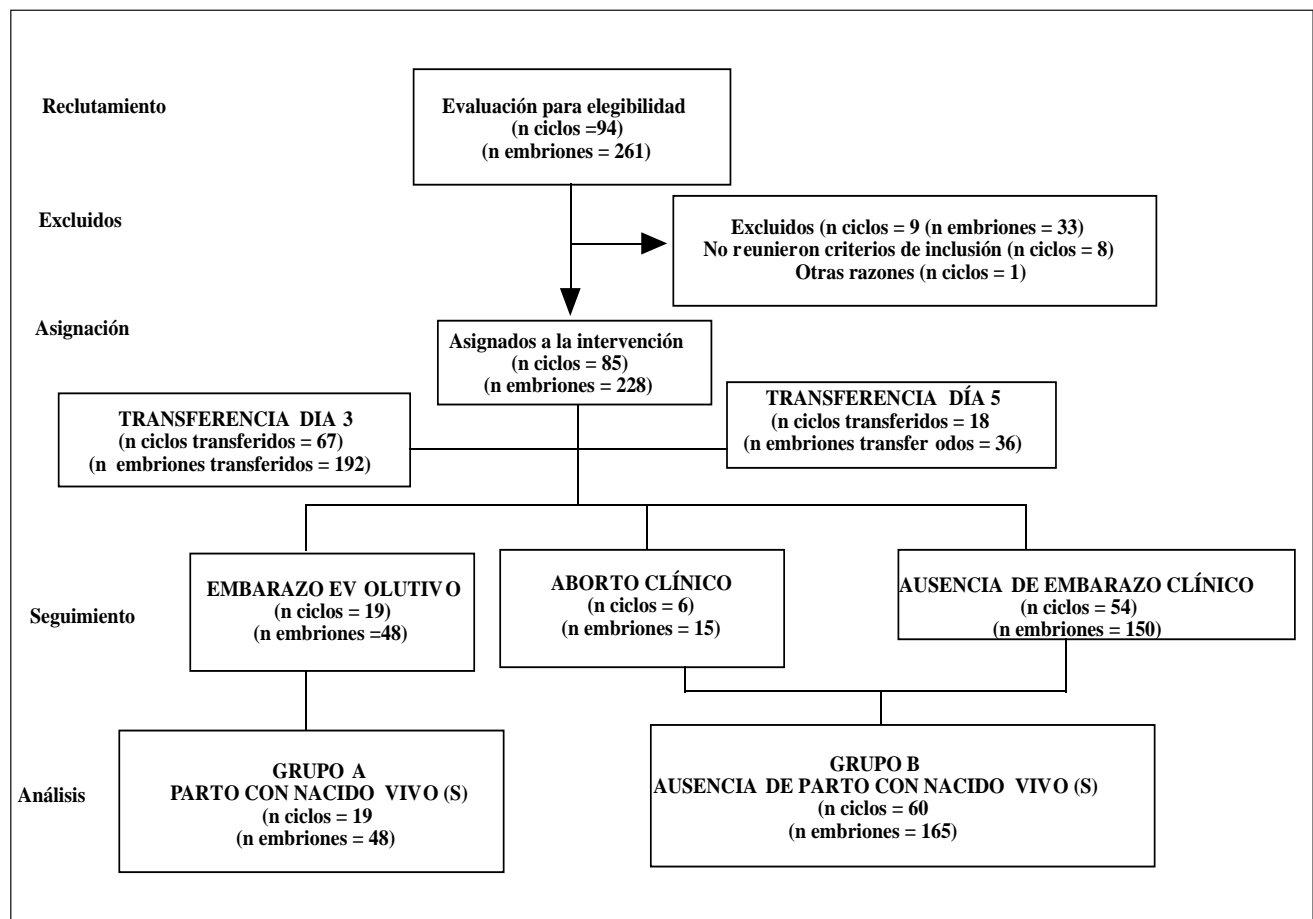


Figura 1

Diagrama de flujo del proceso de los sujetos a reavés de la fase del estudio

2, y en los casos en que se requirió una espera madurativa, los mismos fueron evaluados cada dos horas. En día 1, en forma rutinaria los embriones fueron evaluados e incubados bajo trigas (5% CO₂, 5% O₂ y N₂). En el caso de cultivo a blastocisto se utilizó medio secuencial (BlastAssist, MediCult, Dinamarca). En todos los casos cada embrión fue cultivado en forma independiente lo que permitió su seguimiento e identificación.

Las observaciones fueron realizadas por dos operadores, en forma directa y diferida, esta última por video grabación en forma digital. La observación inicial para determinar el estado pronuclear (PN) se efectuó entre las 15 y 18 hs de acuerdo a la técnica utilizada (día 1); a las 40-41 hs (día 2), a las 64-65 hs (día 3), a las 90 hs (día 4) (parámetro no evaluado en el presente trabajo) y la correspondiente al día 5 entre las 109 y 118 hs posinseminación o posinyección (pi). La transferencia embrionaria en día 3 fue realizada entre las 66 y 72 hs (pi) y 110 a 114 hs (pi) en día 5, con un criterio de calidad embrionaria mínima de por lo menos un embrión transferido con score \geq 12, utilizando catéter Ultrasoft (Lab CCD, France) con una profundidad variable de acuerdo a la evaluación realizada en el ciclo de preparación y a una distancia no menor de 5mm del fondo uterino bajo control ecográfico.

Clasificación embrionaria

Dado que la embriogénesis temprana es un proceso dinámico, se indujo al diseño de score y puntajes relacionados al tiempo del cultivo. La calidad embrionaria frecuentemente cambia, y por lo tanto el análisis estático no es predictivo, lo que hace necesario el uso de score múltiples (55).

En día 1, el estado pronuclear fue evaluado considerando 3 aspectos morfológicos: a) localización pronuclear, b) alineamiento de nucleolos y c) ooplasma. Se determinó un puntaje máximo de 5 por cada variable en los tres parámetros, con un puntaje máximo de 15 que definió al óptimo, al que se le denominó Score Embrionario Múltiple (SEM). La localización fue evaluada por la relación pronuclear con el citoplasma, oposición o separación entre ellos, similitud o diferencia y el posicionamiento de los cuerpos polares en relación al eje longitudinal de los pronúcleos: (□) en el eje longitudinal, (⊥) perpendicular y (○) en el resto. Los nucleolos fueron evaluados por la alineación nucleolar, el número de los mismos en cada pronúcleo y tamaño. La evaluación del ooplasma de acuerdo a las características de definición del halo claro periférico, área granular y resto del ooplasma (2, 13, 14, 56).

La morfología embrionaria en días 2 y 3 fueron evaluadas considerando: a) clivaje (definido por el número de blastómeros), sincronía y simetría; b) multinucleación (porcentaje de blastómeros multinucleados por embrión) y c) la presencia de fragmentos cuantificados por la proporción en relación al volumen embrionario. (46).

Los embriones que presentaron en día 2 \geq 4 células y \geq 6 células en día 3, con mitosis uniformes en el tiempo (sincrónicas), blastómeros de igual tamaño (simétricas), mononucleadas, ausencia de fragmentación y multinucleación resultaron en un score óptimo de 15.

En día 5 con un diseño propio basado en estudios previos, se evaluó a) grado de expansión del blastocelule; b) trofoectodermo de acuerdo a la celularidad y cohesión y c) por estructura, apariencia, celularidad del macizo celular interno. Asignando el máximo score a aquellos con expansión completa, aumento manifiesto de volumen y zona adelgazada, con trofoectodermo en apariencia de mosaico y un embrioplasto bien diferenciado, con buena celularidad y de forma levemente ovoide (14, 47, 52).

Análisis estadístico

Estudio retrospectivo, longitudinal y analítico. Todos los datos posibles fueron presentados con la media (X) y su Desviación Estándar (\pm DS). En el caso de distribución de variables continuas fueron evaluadas por el test de Kolmogorov-Smirnov y t test para muestras independientes. En el caso de distribución anormal fueron analizadas con el test de Mann-Whitney, las proporciones y su significancia fueron calculadas por Chi², y evaluados con una confianza del 95% ($p < 0,05$).

Se realizó un análisis de regresión logística entre embarazo con nacido(s) vivo(s) y ausencia de embarazo (considerados éstos como variables dicotómicas) y el SEM del día 1, día 3 y día 5 respectivamente ($p < 0,05$) y en desarrollo de blastocistos y SEM de los días 1 y 3. Se obtuvieron valores de probabilidad (□) de embarazo con SEM y desarrollo de blastocisto a partir de la ecuación derivada desde el análisis de regresión logística.

Resultados

Sobre un total 85 ciclos transferidos, en 52 (61%) se realizaron FIV convencional e ICSI en 33 (39%). No se observaron diferencias entre ambos grupos en relación a la edad y distribución de las mismas, ni en el número de ovocitos recuperados y al de embriones

transferidos. Los resultados generales, tasa de embarazo y parto son mostrados en Tabla 1.

Se compara en la población de transferidos el SEM

Tabla 1

Características de los ciclos transferidos en relación a resultados

	Grupo A	Grupo B	P
No. Ciclos transferidos	19	66	
Edad (media ± DS rango)	31.5±6.3(22-42)	30.1±6.3(22-43)	0.37
Nº. embriones transferidos por FIV (%)	25/137 (18.2)	112/137 (81.8)	
Nº. embriones transferidos por ICSI (%)	23/91 (25.3)	68/91 (74.7)	
Nº. Embriones transferidos (media ± DS rango)	2.31±0.82 (1-4)	2.5±0.95 (1-4)	0.36
Nº. Ovocitos (media ± DS rango)	6.4±3.6 (2-16)	6.3±3.3 (2-16)	0.84
Tasa de embarazo clínico por transferencia (%)	25/85 (29.4)		
Tasa de implantación (%)	37/228 (16.2)		
Parto con nacido(s) vivo(s) por transferencia (%)	19/85 (22.3)		
Nacidos vivos por transferencia (%)	26/85 (31)		
Tasa de aborto (%)	6/25 (24)		
Nacidos vivos por parto (%)	Simple Doble Triple	14/19 (74) 3/19 (16) 2/19 (10)	

en día 1, al momento de la transferencia en días 3, 5 y número de células al día 3 de acuerdo a resultados en Grupos A y B (Tabla 2). El SEM en los días 1, 3 y 5 resultan significativamente mayores en el grupo de embarazo con nacido(s) vivo(s) (Grupo A) comparado con (Grupo B), p 0,01, 0,009 y 0,006 respectivamente. Observándose un mayor número de células en Grupo A en relación al Grupo B (7.6±1.4, 6.4±1.8 p <0,001).

Cuando se comparan individualmente los parámetros en los días 1, 3 y 5 en grupos A y B, la evaluación de los nucleolos en día 1; clivaje y fragmentación en día 3; trofoectodermo y macizo celular interno en día 5 resultaron significativamente diferentes (p <0,001, 0,013, 0,003, 0,01 y 0,009 respectivamente) (Tabla 3).

El score embrionario múltiple tanto del día 1, día 3, día 5 y número de células al día 3 con SEM ≥13, presentaron coeficiente de correlación positivo y p significativa con Odds ratio de 1.38, 1.36, 1.99 y 1.42 respectivamente. (Tabla 4).

Tabla 2

SEM Días 1, 3, 5 y número de blastómeros en relación a resultados. Media ± DS (rango)

	Grupo A	Grupo B	P
SEM Día 1	13.6±1.4 (11-15)	12.9 ±1.8 (7-15)	0.01
SEM Día 3	13.7±1.3 (11-15)	12.9±2 (7-15)	0.009
No Células Día 3	7.6±1.4 (6-12)	6.4±1.8 (2-14)	<0.001
SEM Día 5	12.9±1.4 (11-15)	10.6±2 (6-15)	0.006

Tabla 3

Parámetros del SEM días 1, 3, 5 de embriones transferidos en ambos Grupos

DÍA 1	GRUPO A (n=48)	GRUPO B (n=180)	P
Localización	5 (2-5)	5 (1-5)	0,058
Nucleolos	5 (2-5)	4 (2-5)	<0,001
Ooplasma	5 (3-5)	5 (1-5)	0,23
DÍA 3			
Clivaje	5 (2-5)	5 (1-5)	0,013
Multinucleación	5 (3-5)	5 (3-5)	0,958
Fragmentación	5 (3-5)	4 (1-5)	0,0037
DÍA 5			
Expansión	3 (2-5)	3 (1-5)	0,146
Trofoectodermo	5 (4-5)	4 (2-5)	0,019
Macizo celular interno	5 (4-5)	3 (1-5)	0,009

Valores expresados en Mediana (rango) y P valor Mann-Whitney test

En el modelo logístico, los SEM días 1 de los embriones transferidos y a la transferencia en día 3 muestran una mayor probabilidad de embarazo con un SEM ≥12, logrando un valor de $\beta=0,28$ y $0,25$ respectivamente en un SEM de 15 (Figura 2 y 3). Los SEM transferidos en blastocisto muestran un aumento en la probabilidad de embarazo en las mismas condiciones que los anteriores, alcanzando un valor $\beta=0,66$ (Figura 4).

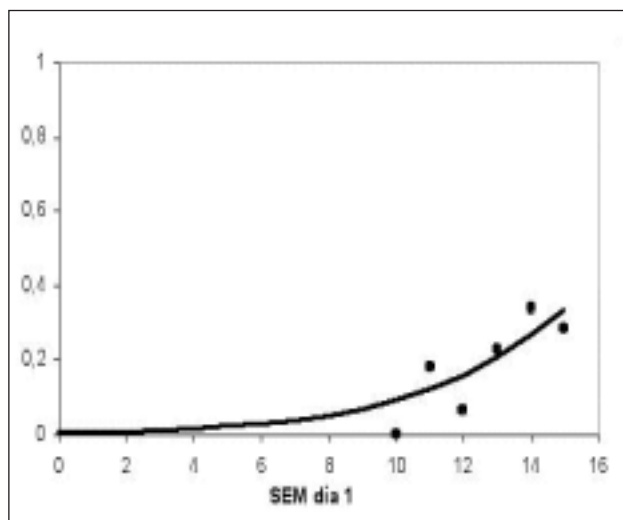
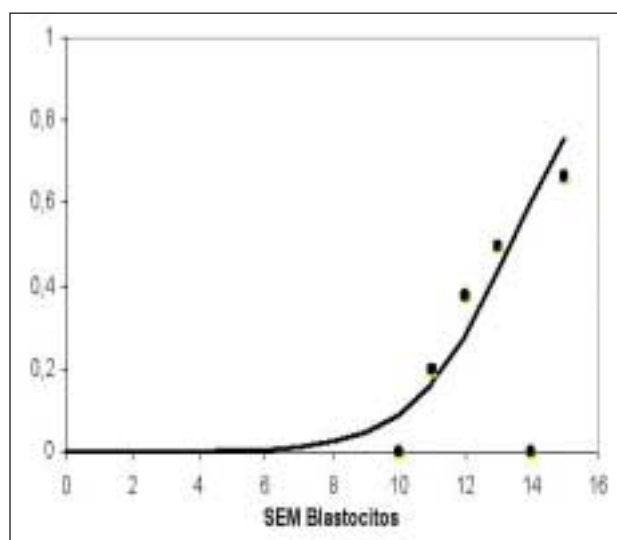
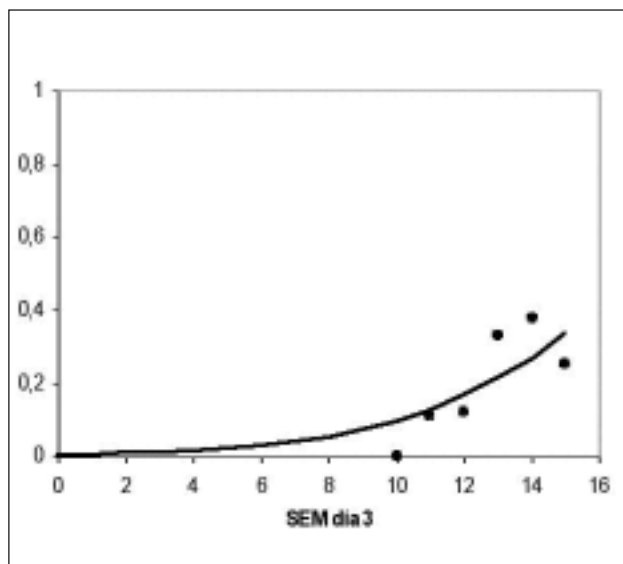
Se realiza análisis de regresión logística utilizando como variables SEM día 1 y 3 en relación a desarrollo a blastocisto como variable dicotómica, encontrando correlación positiva con un coeficiente de 0,42 y 0,72, Odds ratio de 1,51 y 2,05, con un p valor de 0,0007 y <0,0001 respectivamente. (Tabla 5)

DISCUSIÓN

A fin de optimizar la calidad de los embriones transferidos, se han propuesto varias clasificaciones siendo el score múltiple una forma que intenta expresar los cambios morfológicos de los mismos, con un

Tabla 4*Análisis Odds ratio en días 1, 3, 5 y número de células a día 3 respecto a resultados*

Variables	Coefficiente	Err.est	Odds ratio	OR inf.95%	OR sup.95%	P
SEM día 1	0.32	0.11	1.38	1.1	1.7	0.0014
SEM día 3	0.31	0.1	1.36	1.1	1.66	0.0012
SEM día 5	0.69	0.29	1.99	1.13	3.49	0.0029
N° Células día 3	0.35	0.09	1.42	1.18	1.7	0.0001

**Figura 2***Probabilidad de embarazo y SEM día 1***Figura 4***Probabilidad de embarazo y SEM día 5***Figura 3***Probabilidad de embarazo y SEM día 3*

carácter dinámico. Numerosos trabajos avalan la asociación de la morfología pronuclear con la tasa de implantación y desarrollo embrionario (9, 10, 46, 57, 58). Otros autores señalan que la polarización de los nucleolos no se relaciona con la tasa de implantación y embarazo (13, 59, 60, 61). El cultivo prolongado a blastocisto permitió valorar su capacidad predictiva de embarazo en los días 1 y 3 (47, 62). El uso del score múltiple demostró correlación positiva del cigoto, con cultivo embrionario y blastocisto, aún cuando otros autores sostienen la independencia de estos estadios (14, 54, 55). El presente trabajo tiene el mérito de analizar la población embrionaria transferida con un seguimiento lineal e individual en relación a partos con nacido(s) vivo(s). El diseño del estudio consideró las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud del 2001 (63).

Nuestros resultados muestran una mejor morfología, expresada por el SEM durante el cultivo embrionario y un significativo aumento de la celularidad al día 3, en los embriones transferidos que obtienen embarazo. El análisis de los parámetros por día de culti-

Tabla 5
Análisis Odds ratio con SEM ≥ 12 en días 1 y 3 y desarrollo de blastocisto

	Coefficiente	Err.Est	Odds ratio	OR inf.95%	OR sup 95%	P
DIA 1	0.42	0.14	1.51	1.16	1.98	0.0007
DIA 3	0.72	0.18	2.05	1.45	2.91	<0.0001

vo en relación a resultados identifica a: nucleolos en día 1, clivaje y fragmentación al día 3 y trofoectodermo y macizo celular interno al día 5 como las variables de mayor peso estadístico en la conformación de los SEM, resultados que concuerdan con la bibliografía citada. En presencia de un alto score al día 5 de cultivo se observó una alta asociación y una probabilidad del doble de obtener un nacimiento; siendo para los días 1 y 3 dicha probabilidad de menor grado. La transferencia de blastocisto presenta una alta eficiencia con un alto nivel de exigencia en cuanto a su calidad. Un breve comentario es necesario realizar sobre los parámetros evaluados en estadio de cigoto, la subjetividad en la evaluación del ooplasma y el carácter dinámico de los nucleolos contrasta con los parámetros del día 3, en el que los procesos son más lentos y tanto el clivaje, fragmentación y multinucleación son cambios detectables y cuantificables sin mayores dificultades (2, 7). Cabe aclarar que por el diseño del estudio no se han volcado los datos referentes al día 4, pero en todos los casos fue de rutina el examen a las 90 hs y lo consideramos como un momento clave de la embriogénesis en cultivo a día 5 (64). El resultado es evaluado en relación a nacido(s) vivo(s) por parto, el que es aceptado como la forma más eficiente para evaluar el método (65, 66). Se demuestra un alto grado de asociación y correlación de los SEM días 1 y 3 con la obtención de blastocisto. Si el SEM del día 3 fuese ≥ 13 la probabilidad de obtener blastocisto es del doble comparado cuando esta condición no se presenta. Las consecuencias del presente trabajo son importantes para definir pautas en la selección embrionaria para optimizar la técnica en cuanto a resultados y disminuir la incidencia de embarazos múltiples. A su vez demuestra que la evaluación en estado pronuclear no se presenta como predecible por sí sola y sugiere cierto riesgo el de considerar únicamente la morfología del día 1 para la toma de decisiones.

En conclusión: EL SEM ≥ 13 en embriones transferidos en día 5 se presenta como variable predecible en FIV/ICSI de obtener parto con nacido vivo. SEM en días 1, 3 y número de células presentan solo una asociación y probabilidad positiva en relación a resultados. Por último, los SEM días 1 y 3 resultan predictores para la obtención de blastocitos.

BIBLIOGRAFÍA

- Balakier H, Sojecki A, Motamedi G, Librach C.:** Time-dependent capability of human oocytes for activation and pronuclear formation during metaphase II arrest. *Hum Reprod* 2004; 19: 982-987.
- Payne D, Flaherty S, Barry M, Colin M.:** Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time lapse video cinematography. *Human Reproduction* 1997; 12: 532-541.
- Palermo GD, Colombero LT, Rosenwaks Z.:** The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Reviews of Reproduction* 1997; 2:19-27
- Schatten G.:** The centrosome and it's made of inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev Biol* 1984; 165: 2999-3335.
- Bao S, Obata Y, Ono Y, Futatsumata N, Niimura S, Kono T.:** Nuclear competent for maturation and pronuclear formation in Mouse oocytes. *Hum Reprod* 2002; 17: 1311-1316.
- Szollasi D, Szollasi MS, Czolowska R, Tarkowski AC.:** Sperm penetration into immature mouse oocytes and nuclear changes during maturation: an EM study. *Biol Cell* 1990; 69: 53-64.
- Nagy ZP, Janssenswillen C, Janssens R, DeVos A, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem AC.:** Timing of oocyte activation pronucleate formation and cleavage in humans after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with testicular spermatozoa and after ICSI or in-vitro fertilization on sibling oocytes with ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 1998; 13:1606-1612.
- Wright G, Wiker S, Elsner C.:** Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990; 5: 109-115.
- Scott L, Smith S.:** The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Human Reproduction* 1998; 13:1003-1013.
- Tesarik J, Greco E.:** The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Human Reproduction* 1999; 14:1318-1323.

11. **The European IVF-monitoring programme (EIM), for the European Society of Human Reproduction and Embriology (ESHRE).** Assisted reproductive technology in Europe, 2001. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2005; 20: 1158-1176.
12. **Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J.:** Multinucleation in cleavage stage embryos. *Human Reproduction* 2003; 18:1062-1069.
13. **Wittermer C, Bettahar-Lebugle K, Oh J, Rongieres C, Nisand I, Gerlinger P.:** Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Human Reproduction* 2000; 15:2591-2597.
14. **Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B.:** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction* 2000; 15: 2394-2403.
15. **Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G.:** The graduated embryo score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2001; 9: 1970.
16. **Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Ramazan M, Mumcu A, Nuhoglu A.:** The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357-2361.
17. **Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M.:** Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum Reprod* 2000; 15: 1396-1399.
18. **Zollner U, Zollner KP, Dietl J, Steck T.:** The use of detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. *Hum Reprod* 2002; 17: 1327-1333.
19. **Dozortsev D, Coleman A, Nagy P, Diamond MP, Ermilov A, Weier V, Lyanage M, Reid T.:** Nucleoli in a pronuclei-stage mouse embryo are represented by major satellite DNA of interconnecting chromosomes. *Fertil Steril* 2000; 73: 366-371.
20. **Munné S, Cohen J.:** Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 842-855.
21. **Shoukir Y, Chadonnens D, Campana A y Sakkas D.:** Blastocyst development from supernumerary embryos alters intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod* 1998, 13: 1632-1637.
22. **Tesarik J, Kopečný V.:** Development of human male pronucleus: Ultrastructure and timing. *Gam Res* 1989; 24: 135-149.
23. **Almeida PA, Bolton VN.:** The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development in-vitro. *Reprod Fertil Dev* 1996; 8: 235-241.
24. **Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P.:** Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 2002; 12: 3193-3200.
25. **Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, Tucker M, Cohen J, Gianaroli L.:** Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1997; 12: 780-784.
26. **Plachot M.:** Chromosome analysis of oocytes and embryos. In Verlinsky Y and Kuliev A. (eds). *Preimplantation Genetics*. Plenum Press, New York. 1991; 103-112.
27. **Staessen C, Janssenwillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1993; 8: 221-223.
28. **Staessen C, Van Steirteghem A.:** The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. *Human Reproduction* 1998; 13: 1625-1631.
29. **Levron J, Munné S, Willadsen S.:** Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biol Reprod* 1995; 52: 653-657.
30. **Kline D, Kline JT.:** Repetitive calcium transients and the role of calcium exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Dev Biol* 1992; 149: 80-89.
31. **Vitullo AD, Ozil JP.:** Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Bio* 1990; 109: 117-127.
32. **Whittingham DG, Carroll J.:** A cell-cycle associated change in Ca²⁺ releasing activity leads to generation of Ca²⁺ transients in mouse oocytes during the first mitotic division. *J Cell Biol* 1996; 132: 915-923.
33. **Herbert M, Gillespie JI, Murdoch AP.:** Development of calcium signaling mechanisms during maturation of human oocytes. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 965-973.
34. **Edwards RG, Fishel SB, Cohen J.:** Factors influencing the success of in vitro for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984; 1:3-23.
35. **Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A.:** Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Human Reproduction* 1998; 13:182-187.
36. **Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M.:** Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Human Reproduction* 2002; 17: 407-412.
37. **Salumets A, Granskog HC, Mäkinen S, Suikkari A-M, Tiitinen A, Tuuri T.:** Early cleavage predicts the

- viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; 18: 821-825.
38. **Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi J, Mack Caryn Scott R.:** Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility* 1999; 71: 836-842.
 39. **Antczak M, Van Blerkom J.:** Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999; 14: 429-447.
 40. **Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Pölz W, Tews G.:** Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertility and Sterility* 2001; 76: 281-285.
 41. **Munné S, Cohen J.:** Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 842-855.
 42. **Balakier H, Cadesky K.:** The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Human Reproduction* 1997; 12: 800-804.
 43. **Jackson K, Ginsburg E, Hornstein M, Rein M, Clarke R.:** Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization embryo transfer cycles. *Fertility and Sterility* 1998; 70: 60-66.
 44. **Hardy K, Spanos S, Becker D, Iannelli P, Winston RML, Stark J.:** From cell death to embryo arrest: Mathematical models of human preimplantation embryo development. *PNAS* 2001; 98: 1655-1660.
 45. **Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN.:** Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in vitro fertilization. *Human Reproduction* 1997; 12: 1545-1549.
 46. **Ludwig M, Schöpfer B, Hasani SA, Diedrich K.:** Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* 2000; 15: 325-329.
 47. **Gardner DK, Phil D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft W.:** Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertility and Sterility* 1998; 69: 84-88.
 48. **Gardner DK, Phil D, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft W.:** Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertility and Sterility* 2000; 73: 1155-1158.
 49. **Van der Auwera I, Debrock S, Spiessens C, Afschrift H, Bakelants E, Meuleman C, Meeuwis L, D'Hooghe MD.:** A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer. *Hum Reprod* 2002; 17: 1507-1512.
 50. **Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhardt, Dasig D.:** Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 454-457.
 51. **Cho HJ, Son WY, Yoon SH, Lee SW, Lim JH.:** An improved protocol for dilution of cryoprotectants from vitrified human blastocysts. *Human Reproduction* 2002; 17: 2419-2422.
 52. **Richter K, Harris D, Daneshmand S, Shapiro B.:** Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertility and Sterility* 2001; 76: 1157-1167.
 53. **Desai N, Goldstein J, Rowland D, Goldfarb JM.:** Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Human Reproduction* 2000; 15: 2190-2196.
 54. **Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D.:** Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod* 2003; 18: 1307-1312.
 55. **De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B.:** High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Human Reproduction* 2002; 17: 2402-2409.
 56. **Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy CR, Hartshorne GM.:** Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes? *Human Reproduction* 1999; 14: 2588-2595.
 57. **Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N.:** Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertility and Sterility* 2003; 80: 341-349.
 58. **Dale B, Fiorentino A, de Simone MI, di Matteo L, di Frega AS, Wilding M, Fehr P, Bassan E, Lo Giudice C, Maselli A.:** Zygote versus embryo transfer: a prospective randomized multicentre trial. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19: 456-461.
 59. **Montag M, van der Ven H.:** German Pronuclear Morphology Study Group. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. *Hum Reprod* 2001; 16: 2384-2389.
 60. **Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M.:** Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a

simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. Hum Reprod 2000; 15: 1396-1399.

61. **Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T.** The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16: 2177-2181.
62. **Gardner D, Schoolcraft W, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in vitro fertilization. Human Reproduction 1998; 13: 3434-3440.
63. **Current Practices and Controversies in Assisted Reproduction. Report of a Meeting on Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction held at WHO, Geneva, Switzerland,** 17-21 September 2001, Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD(eds).
64. **Kidder GM, Winterhager E.** Intercellular communication in preimplantation development: the role of gap junctions. Front Biosci 2001; 6: D731-736.
65. **EISIG.** (European and Israel Study Group on highly purified hMG versus rFSH (2002) Efficacy and safety on high purified menotropin versus recombinant follicle-stimulating hormone in in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a randomized, comparative trial. Fertil Steril 78, 520-528.
66. **Arce J, Nyboe Andersen A, Collins J.** Resolving methodological and clinical issues in the design of efficacy trials in assisted reproductive technologies: a mini review. Hum Reproduction 2005; 20: 1757-1771.