

# Biología de la Reproducción

## **Relación de la morfología de los pronúcleos de cigotos humanos con la calidad embrionaria, tasa de implantación y embarazo.**

### *Relation between pronuclear morphology of human zygotes with embryo quality, implantation rate & pregnancy*

Álvarez C, Taronger R, García Garrido C, Navarro S, González de Merlo G

Hospital General Universitario de Albacete. Unidad de Reproducción Humana. Servicio de Obstetricia y Ginecología. Hospital General Universitario de Albacete. Albacete. España

#### **Resumen**

*Objetivo: Determinar si la morfología de los pronúcleos es un criterio válido para la selección de los embriones que se van a transferir.*

*Ámbito: Hospital General Universitario de Albacete.*

*Material y métodos: En este estudio retrospectivo se evaluó la morfología de los pronúcleos (PNs) de 289 cigotos de 63 ciclos de tratamiento (57 pacientes) a las 16-18 horas post FIV/ICSI. La edad media de las pacientes fue  $34,8 \pm 3,1$  (28-40 años)*

*El patrón utilizado fue el propuesto por Tesarik y Greco (1999) basado en el número, tamaño y distribución de los cuerpos precursores de nucleolos (CPNs) en cada PN (polarizada vs no polarizada) La selección embrionaria se llevó a cabo en D+2 y D+3, clasificando los embriones en G1, G2, G3 y G4 según el tamaño, multinucleación y morfología del citoplasma de los blastómeros, porcentaje de fragmentos citoplasmáticos, velocidad de división y grosor de la zona pelúcida.*

*Se crearon 4 grupos de pacientes según el tipo y patrón de procedencia (cigoto) de los embriones transferidos:*

- Grupo I: 1 embrión G1-G2 procedente de P0 (patrón 0) (n=16)
- Grupo II: >1 embrión G1-G2 procedente de P0 (n=19)
- Grupo III: Sin embriones procedentes de P0 (n=19)
- Grupo IV: Todos los embriones G1-G2 procedentes P0 (n=9)

---

**Correspondencia:** Dra. Cristina Álvarez Lleó  
Laboratorio de FIV. Unidad de Reproducción Humana.  
Servicio de Obstetricia y Ginecología.  
Complejo Hospitalario de Albacete  
C/ Hermanos Falcó s/n  
02006 Albacete  
cristina10lleo@yahoo.es

Resultados: Un 83,3% de los embriones G1-G2 en D+2/D+3 proceden de P0 y un 87,5% de los G3-G4 de P1 ( $p < 0,05$ ).

La edad media de las pacientes entre los grupos no muestra diferencias estadísticamente significativas. El número medio de embriones transferidos en el GIV fue menor y estadísticamente diferente al de los grupos I y II. La tasa de embarazo clínico, la tasa de implantación y la de embarazo múltiple es estadísticamente menor en el GIII que en el resto de los grupos ( $p < 0,05$ ).

Conclusiones: Los preembriones de mejor calidad proceden de cigotos P0 y los de peor de cigotos P1. La transferencia de preembriones (G1-G2) procedentes de cigotos P0 incrementa las tasas de embarazo clínico, implantación y embarazo múltiple. La valoración morfológica de los pronúcleos (D+1) y de los preembriones (D+2/D+3) son criterios complementarios que permiten una mejor selección de los preembriones que se van a transferir.

**Palabras clave:** Morfología pronuclear. Cuerpos precursores de nucleolos. Embrión. Tasa de gestación.

### **Summary**

**Objective:** To determine whether pronuclear morphology is a good criterion to select embryos to transfer.

**Setting:** Hospital General Universitario de Albacete (Albacete, Spain)

**Material and methods:** In this retrospective study, the pronuclei morphology of 289 zygotes from 63 treatment cycles (57 patients), 16-18 h after IVF or ICSI was evaluated. The mean age of patients was 34,8(3.1 (28-40 years). The used patterns were proposed by Tesarik and Greco (1999) based on number, size and distribution of nucleolar precursor bodies (NPBs) in each pronucleus (polarized vs non-polarized) The embryo selection was performed on D+2/D+3, classifying the embryos in G1, G2, G3 and G4 by size, multinucleation and cytoplasmic morphology of blastomeres, percentage of cytoplasmic fragments, cleavage rate and thickness of pelucida zone.

Four groups of patients according to the type and pattern of origin (zygote) of the transferred embryos were created:

- Group I: one embryo G1-G2 that was derived from a zygote with a 0 PN pattern.
- Group II: > one embryo G1-G2 that was derived from a zygote with a 0 PN pattern.
- Group III: none embryo was derived from a zygote with a 0 PN pattern.
- Group IV: all embryos were derived from a zygote with a 0 PN pattern.

**Results:** An 83 % of G1-G2 embryos derived from zygotes with a 0 PN pattern in D+2/D+3 and a 87,5 % of G3-G4 embryos derived from zygotes with a 1 PN pattern ( $p < 0,05$ ).

Mean patients age between groups was not significantly different. Mean number of embryos transferred in GIV was lower than in groups I and II and significantly different. Pregnancy, implantation and multiple pregnancy rates were in GIII significantly lower than in others groups ( $p < 0,05$ ).

**Conclusions:** The preembryos of better quality derived from zygotes with a 0 PN pattern and the worse ones from zygotes with a 1 PN pattern.

The transfer of G1-G2 embryos derived from zygotes with a 0 PN pattern increase pregnancy, implantation and multiple pregnancy rates. The morphologic evaluation of the pronuclei and the preembryos is complementary criteria that allow one better selection of the preembryos to transfer.

**Key words:** Pronuclear morphology. Nucleolar precursor bodies. Embryo. Gestation rate.

## INTRODUCCIÓN

La clave del éxito del laboratorio de embriología radica en seleccionar para la transferencia, los embriones más viables, con el fin de aumentar la tasa de gestación por ciclo y disminuir el número de embarazos múltiples.

Sin embargo, la evaluación tradicional de los embriones humanos en el laboratorio de Reproducción Asistida (RA) basada principalmente en criterios morfológicos como simetría, multinucleación y grado de fragmentación de los blastómeros, velocidad de división del embrión, aspecto del citoplasma y grosor de la zona pelúcida (1-5), tiene considerables limitaciones y su correlación con el potencial de implantación suele ser débil e inexacto, excepto en casos extremos cuando los embriones son claramente degenerativos. Estudios citogenéticos han demostrado que aproximadamente un 30% de los embriones generados por tratamientos de FIV presentan anomalías cromosómicas que impiden su implantación (6-7) El problema se ha hecho cada vez más complejo, por ello se están intentando diferentes estrategias para identificar el mejor embrión, que conduzca al nacimiento de un niño sano.

En un programa de FIV, la selección del procedimiento para elegir los embriones óptimos debe ser segura, no invasiva y fácil de realizar dentro de la rutina del laboratorio. Los problemas inherentes a estimar adecuadamente la vitalidad del embrión, han llevado a un enfoque más detallado que juzgue al embrión en el momento de la transferencia y durante todo su desarrollo, como en un proceso dinámico desde la recuperación del ovocito. La presencia de los pronúcleos (PNs) es el primer signo de fecundación, fallos en su alineación y aparición simultánea indican una disfunción en la formación del aster y un desarrollo embrionario anormal. Tesarik y Greco (8) estudiaron la asociación de la estructura y arquitectura pronuclear con el desarrollo del embrión, sugiriendo que la estimación del número y distribución de los cuerpos precursores nucleolares (CPN), dentro del PN, puede ayudar a predecir el potencial de implantación embrionario. Desde entonces, son numerosos los trabajos publicados que han intentado demostrar la importancia de la morfología pronuclear en el desarrollo y constitución cromosómica de los embriones (9-15)

Los cambios en la estructura pronuclear que sufren los cigotos se correlacionan con una actividad de síntesis de RNA (16, 17) Los nucleolos son los lugares de síntesis del pre-RNA ribosómico (pre-RNAr) y están localizados en regiones cromosómicas que co-

rresponden al loci donde residen los genes que codifican el RNAr. El número y localización de estas regiones son específicos de especie y parecen diferir según el tipo de célula, su actividad y el estado de desarrollo. Los cuerpos precursores crecen rápidamente y se fusionan formando un gran nucleolo típico de la célula interfásica. Un periodo de tiempo preciso y una secuencia coordinada de estos sucesos son extremadamente importantes y el nuevo RNAr sintetizado es necesario para el proceso transcripcional cuando el genoma embrionario llega a ser completamente activado (18)

Basándonos en estas consideraciones la morfología de los PNs y el número y distribución de los CPNs se ha propuesto como un sistema de clasificación y se ha establecido una correlación entre los diferentes patrones pronucleares observados, el desarrollo embrionario y el potencial de implantación (9, 11, 19, 20) Las anomalías cromosómicas representan la mayor causa de fallo de implantación y aborto espontáneo, y se producen en una elevada proporción de los embriones generados en ciclos estimulados (21, 22) Las alteraciones de la morfología pronuclear y las anomalías cromosómicas referidas sugieren que el patrón de morfología nuclear podría depender de la constitución cromosómica.

Se han propuesto numerosos sistemas de clasificación embrionaria, sin embargo el problema radica en elegir el más adecuado. Con el objetivo de aclarar esta cuestión se realizó un estudio retrospectivo para determinar si la morfología de los PNs es un criterio válido para la selección de los embriones que se van a transferir.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Pacientes

Se realizó un estudio retrospectivo de 289 cigotos procedentes de 63 ciclos de FIV y/o ICSI. El grupo de población estaba constituido por 57 pacientes con diferentes problemas de infertilidad, con una edad media de 34,8 (3,1 ± 28-40 años)

### Estimulación ovárica

La hiperestimulación ovárica controlada (HOC) se llevó a cabo utilizando los protocolos establecidos en la Unidad de Reproducción del Hospital General Universitario de Albacete.

Realizamos la supresión hipofisaria, mayoritariamente, con agonistas de la GnRh, en protocolo largo

a dosis convencionales (Procrin®, Laboratorios Abbot, Barcelona; Synarel®, Lab. Seid, Barcelona; Decapeptyl®, Ipsen Pharma, Barcelona), en las pacientes con reserva folicular disminuida administramos agonistas en protocolo largo a bajas dosis. Utilizamos los antagonistas de la GnRh (Cetrotide®, laboratorios Serono Madrid, y Orgalutran®, Laboratorios Organon, Barcelona) básicamente, en las bajas respondedoras y ante la sospecha de riesgo de hiperrespuesta ovárica, comenzando su administración a partir de la observación ecográfica de folículos mayores de 14-16 mm.

Iniciamos la HOC con dosis y tipos variables de gonadotropinas según el siguiente protocolo establecido en la Unidad: 1°. En pacientes < de 30 años, con esterilidad por factor masculino/ factor tubárico y en pacientes con S.O.P.: 100-150 UI de FSH; 2° >30 años: 150 FSH + 75 HMG/LH; 3° >35 años: 225 UI FSH + 75 HMG/LH; 4°. En Bajas respondedoras y en >37 años: 300 UI FSH + 150 HMG/LH (Gonal-F®, laboratorios Serono Madrid; Puregon®, Laboratorios Organon Barcelona; HMG-lepori, Farma Lepori®, Barcelona; Menopur, Ferring Pharmaceuticals, Madrid; Luveris®, laboratorios Serono, Madrid) Estas dosis se ajustan el 4°-6° día de tratamiento en función de la respuesta individual de cada paciente.

El control de la respuesta ovárica se realizó mediante el seguimiento ecográfico del crecimiento folicular y la determinación del estradiol en sangre circulante. Se desencadenó la ovulación, cuando los folículos alcanzaron diámetros mayores o iguales a 18-20 mm, mediante la administración de 250 µg ó 5000-10000 UI de HCG (Profasi® u Ovitrelle®, Laboratorios Serono, Madrid; HCG-lepori®, Farma Lepori, Barcelona)

La recuperación ovocitaria se realizó, 34-36 horas después de la administración de la HCG, mediante aspiración folicular transvaginal guiada por ecografía, bajo anestesia general o locoregional.

### **Preparación de las muestras seminales**

Las muestras seminales, se evaluaron macroscópica y microscópicamente, tras su licuefacción en el incubador durante 30-40 minutos en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 6%, a 37°C.

El eyaculado se mezcló con medio de cultivo (G-SPERM™, Vitrolife, Suecia) y se realizó un swim up convencional. Tras el lavado de la muestra, el precipitado obtenido se incubó con medio de cultivo (G-FERT™, Vitrolife, Suecia) durante 1 hora en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 6%, a 37°C. Seguidamente se recuperó el sobrenadante, evaluándose el recuento y la movilidad

de la muestra capacitada. Cuando las muestras presentaron una oligoastenozoospermia severa, se concentraron mediante centrifugación con medio de cultivo para lavado de semen. El precipitado se mezcló con un volumen reducido de medio (G-FERT™, Vitrolife, Suecia), evaluándose su concentración y movilidad.

Todos los medios utilizados fueron suplementados con albúmina humana pura o recombinante (HSA-solution™ o G-MM™, Vitrolife, Suecia)

### **Recuperación y fecundación de los ovocitos**

Los ovocitos recuperados se lavaron en medio tamponado (G-MOPS™, Vitrolife, Suecia) y se cultivaron individualmente en microgotas de 40 µl de medio de cultivo (G-FERT™, Vitrolife, Suecia) bajo aceite mineral (G-OIL™, Vitrolife, Suecia) en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 6%, a 37°C, lo que hizo posible asociar cada patrón de morfología pronuclear con cada embrión. Los ovocitos se inseminaron y/o microinyectaron a las 2-4 de su recuperación. Para su microinyección, las células del cúmulo se eliminaron con una solución de hialuronidasa (HYASE™-10x, Vitrolife, Suecia) y mediante pipeteado mecánico. Los ovocitos metafase II (MII) se microinyectaron y se dejaron incubar en microgotas de medio (G-1™ vesion3, Vitrolife, Suecia) cubiertas con aceite mineral.

En los ciclos con FIV convencional, los ovocitos se inseminaron con una concentración de 1x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml y se dejaron incubar en medio de cultivo (G-FERT™, Vitrolife, Suecia) hasta valorar la fecundación.

La fecundación y morfología de los PNs se valoraron a las 16-20 h post-FIV y/o ICSI, utilizando un microscopio invertido con un objetivo de 40x. El patrón utilizado fue el propuesto por Tesarik y Greco (8) basado en el número y distribución de los CPNs (polarizados vs no polarizados) Para ello se modificó el enfoque durante la observación hasta que se inspeccionó la totalidad del volumen de ambos PNs. Los cigotos se giraron mediante movimientos repetidos de la placa de cultivo hasta que ambos pronúcleos fueron claramente visibles.

Se observó que el número de CPNs puede ser muy variable, dependiendo el desarrollo del cigoto de la distribución que adquieran en el PN. La distribución de los CPNs se consideró polarizada cuando todos los CPNs de un PN se encontraban concentrados en el punto de contacto entre los dos PNs; y no polarizada cuando al menos un CPN se localizó en el hemisferio opuesto (8) El tamaño de los CPNs no se evaluó como parámetro al ser inversamente proporcional al número de CPNs en un PN (23).

Se diferenciaron 6 patrones morfológicos (Patrones 0-5): patrón 0 (P0): la diferencia en el número de CPNs entre los dos PNs nunca es >3; los CPNs siempre están polarizados cuando son <7 y nunca cuando son >7; el número de CPNs en un PN nunca es < 3; la distribución de los CPNs en ambos PNs es la misma (polarizada o no polarizada); patrón 1 (P1): la diferencia en el número de CPNs entre los 2PNs es >3; patrón 2 (P2): al menos un PN con un reducido número de CPNs (<7) sin polarizar; patrón 3 (P3): al menos un PN con un número elevado de CPNs (>7) polarizados; patrón 4 (P4): al menos un PN con un número de CPNs muy pequeño (<3); patrón 5 (P5): CPNs polarizados en un PN y no polarizados en el otro (8)

### Calidad embrionaria

La selección embrionaria se llevó a cabo a las 48h (D+2) ó 72h (D+3) post-punción folicular en función de los criterios morfológicos del embrión: número y tamaño de los blastómeros, porcentaje de fragmentos citoplasmáticos, apariencia del citoplasma, grosor de la zona pelúcida, blastómeros multinucleados y velocidad de división.

Los embriones se clasificaron en grado 1 (G1), grado 2 (G2), grado 3 (G3) y grado 4 (G4) Los embriones de buena calidad (G1 y G2) mostraron 3-4 células de tamaño similar en D+2 y 7-8 en D+3, ausencia de blastómeros multinucleados, no-fragmentación (G1), fragmentación < 20% (G2), citoplasma sin vacuolas y zona pelúcida heterogénea.

### Transferencia Embrionaria (TE)

Siguiendo el protocolo de TE de la Unidad, antes del inicio del ciclo realizamos un test FIV para comprobar la permeabilidad cervical y diseñar la estrategia de inserción del catéter de transferencia. Las TE se realizaron en D2 ó D3, con vejiga llena y bajo control ecográfico. Lavamos con suero la vagina, aspiramos el moco cervical y a presión bañamos el cérvix con medio de cultivo (G-MOPS™, Vitrolife, Suecia)

Se transfirieron un máximo de 4 embriones en función de la edad de la paciente, los ciclos previos y la calidad embrionaria, depositándose los embriones en el tercio medio de la cavidad endometrial. Los embriones se cargaron en el catéter de transferencia con medio G-2™ version3 o embryoGlue® (Vitrolife, Suecia) Posteriormente las pacientes permanecieron en reposo durante dos horas.

La fase lútea se suplementó con 400-600 mg de progesterona natural, iniciándose su administración el

día de la transferencia embrionaria, vía oral o vaginal (Progeffik®, Effik, Madrid o Utrogestan®, Seid, Barcelona)

El diagnóstico de gestación se realizó mediante determinación de la (hCG sérica a los 15 días de la punción folicular. Cuando fue positiva (>20 UI/ ml), se confirmó la gestación dos semanas después, por la presencia de saco gestacional intrauterino.

### Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en medias ((SD) y porcentajes. Se comprobó la normalidad de las funciones de distribución para cada uno de los conjuntos de datos, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene. La significación de las diferencias fue estimada utilizando el análisis de (2 y el Test Exacto de Fisher, así como el Análisis de la Varianza (ANOVA) Las diferencias que mostraron valores de  $p < 0,05$  fueron consideradas estadísticamente significativas. Todos los cálculos estadísticos se realizaron con la versión 12,0 del programa SPSS para Windows (SPSS™ Inc. 1989-2003)

## RESULTADOS

Se evaluaron 289 cigotos, la distribución de los patrones de los PNs fue: 108 (38,7%) P0, 8 (2,9%) P1, 65 (23,3%) P2, 22 (7,9%) P3, 21 (7,5%) P4 y 55 (19,7%) P5.

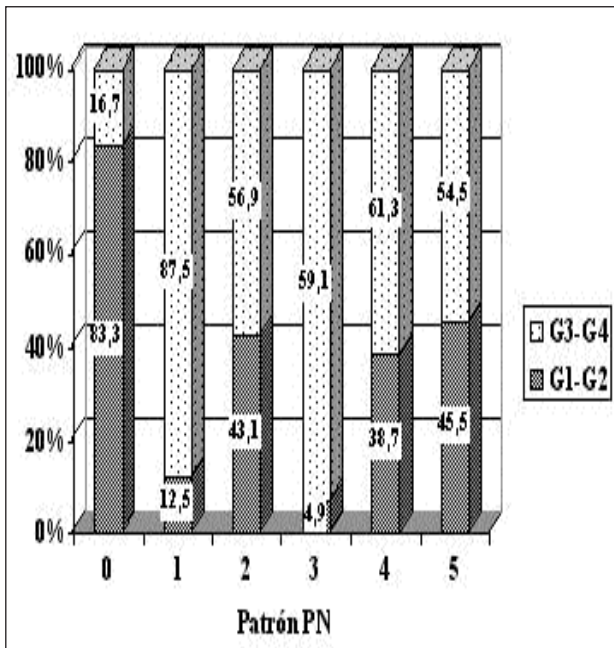
En los PNs con elevado número de CPNs, éstos se distribuían al azar por todo el PN, sin embargo cuando el número de CPNs era bajo, su tamaño aumentaba y se polarizaban próximos a la unión entre los PNs.

En la figura 1 se representa la distribución de los embriones G1-G2 y G3-G4 según su patrón de procedencia. El número y porcentaje de embriones de buena y mala calidad desarrollados a partir de los diferentes patrones pronucleares, así como las diferencias estadísticas se resumen en la tabla 1. El porcentaje de embriones G1-G2 procedentes de P0 fue significativamente superior al resto de patrones. El 83,3 % de los embriones de buena calidad procedían de cigotos P0 y el 87,5% de los de peor calidad de cigotos P1.

Se crearon 4 grupos de pacientes según el tipo y patrón de procedencia (cigoto) de los embriones transferidos:

- Grupo I (GI): 1 embrión G1-G2 procedente de cigotos P0.

- Grupo II (GII): >1 embrión G1-G2 procedente de cigotos P0.



**Figura 1**

*Distribución de los embriones de buena y mala calidad según su patrón pronuclear de procedencia.*

- Grupo III (GIII): Ningún embrión procedente de cigotos P0.
- Grupo IV (GIV): Todos los embriones G1-G2 procedentes de cigotos P0.

En la Tabla 2 se muestra el número de ciclos, la edad media de las pacientes, el número medio de embriones transferidos, el número de embriones transferidos de buena calidad (G1-G2), los ciclos con (hCG positiva, la tasa de embarazo clínico, implantación y embarazo múltiple en cada grupo de pacientes.

La edad media de las pacientes fue muy similar en todos los grupos, no mostrando diferencias significativas. El número medio de embriones transferidos fue menor en el grupo IV donde todos los embriones transferidos fueron G1-G2 y procedían de P0, siendo estadísticamente diferentes al de los grupos I y II. También se observaron diferencias significativas en

el número medio de embriones transferidos entre el grupo II y III.

Los porcentajes de (hCG positiva, tasa de embarazo clínico, implantación y gestación múltiple más bajos se obtuvieron en el grupo (GIII) donde ninguno de los embriones transferidos se originó de cigotos con P0, siendo las diferencias respecto al resto de los grupos significativas. El porcentaje de (hCG positiva fue similar entre GII y GIV, a pesar de transferir en este último grupo un número medio de embriones menor. Por último, todas las (hCG positiva del GIV dieron lugar a embarazos clínicos y a tasas de implantación (62,5 %) e incidencia de embarazo múltiple muy elevadas (42,9 %)

## DISCUSIÓN

Los criterios de evaluación morfológica pronuclear utilizados en este trabajo fueron descritos previamente por Tesarik y Greco (8), cuando demostraron que los embriones de mejor calidad y las mejores tasas de implantación y embarazo se conseguían a partir de cigotos con P0. Los cigotos P0 dan lugar a embriones de "buena calidad" (G1-G2) con mayor velocidad de división, blastómeros simétricos no multinucleados y escasos fragmentos citoplasmáticos. Los resultados de nuestro trabajo, también nos sugieren una buena relación entre la morfología de los cigotos y la calidad embrionaria con el embarazo clínico y la implantación.

Los ovocitos en el folículo antral tienen un nucleolo bien definido, cuando maduran y son ovulados, disminuye la síntesis de RNAr y los nucleolos son pequeños y dispersos. Durante la fecundación, la síntesis se reanuda y los nucleolos se reorganizan y crecen simultáneamente en ambos PN. Durante el desarrollo de los PN, los CPNs son móviles, su actividad parece ser mínima, su distribución puede ser al azar y disminuir durante la migración de los PN (24) o polarizada (25) y su polarización se ha relacionado con el desarrollo embrionario.

Aunque la importancia de la polarización de los CPNs se ha intentado explicar mediante varias hipó-

**Tabla 1**

*Porcentaje de los embriones de buena y mala calidad desarrollados a partir de los diferentes patrones pronucleares*

Grado Embriones	Patrón 0	Patrón 1	Patrón 2	Patrón 3	Patrón 4	Patrón 5
G1-G2 (%)	83,3 <sup>a</sup>	12,5 <sup>bcd</sup>	43,1 <sup>bcde</sup>	40,9 <sup>bcde</sup>	38,7 <sup>bcde</sup>	45,5 <sup>bcde</sup>
G3-G4 (%)	16,7 <sup>acdef</sup>	87,5 <sup>b</sup>	56,9 <sup>acdef</sup>	59,1 <sup>acdef</sup>	61,3 <sup>acdef</sup>	54,5 <sup>acdef</sup>

<sup>abcde</sup> diferentes letras indican diferencias entre patrones diferentes (p<0,05)

**Tabla 2***Resultados de la transferencia embrionaria en relación con la morfología pronuclear.*

<b>Grupos</b>	<b>GI</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
Nº ciclos transferidos	16	19	19	9
Edad media(DS)	35,5±3,6	34,4±3,2	35,4±2,6	33,3±3,0
Nº medio embriones transferidos	3,0±1,0 <sup>abc</sup>	3,1±0,6 <sup>ab</sup>	2,5±0,5 <sup>acd</sup>	1,8±0,7 <sup>cd</sup>
Embriones transferidos G1-2 (%)	56,3	83,1	48,9	100
(hCG positiva (%))	50 <sup>abd</sup>	89,5 <sup>abd</sup>	26,3 <sup>c</sup>	77,8 <sup>abd</sup>
Tasa embarazo clínico (%)	50 <sup>abd</sup>	78,9 <sup>abd</sup>	15,8 <sup>c</sup>	77,8 <sup>abd</sup>
Tasa implantación (%)	22,9 <sup>abd</sup>	37,3 <sup>abd</sup>	6,4 <sup>c</sup>	62,5 <sup>abd</sup>
Tasa embarazo múltiple (%)	37,5 <sup>abd</sup>	33,3 <sup>abd</sup>	0 <sup>c</sup>	42,9 <sup>abd</sup>

<sup>abcd</sup> diferentes letras indican diferencias entre grupos diferentes (p<0,05)

tesis, su función directa no se ha podido determinar. Se ha sugerido que la polarización de la cromatina (26) y los CPNs representa un paso temprano en la formación del eje embrionario, el cual determina el destino celular de los embriones preimplantacionales (27) Se sabe que la ausencia de aposición pronuclear y las alteraciones en la polarización de los CPNs, son incompatibles con el desarrollo normal de los cigotos y que estas anomalías son el resultado de un mal funcionamiento de los centriolos derivados del espermatozoide. Eppig et al (28) consideraron que la dispersión de los CPNs y su pequeño tamaño era indicativo de un desarrollo asincrónico entre los factores nucleares y citoplasmáticos, y podría ser la causa de las alteraciones que se producen durante el desarrollo del cigoto. De modo, que estos embriones generalmente no son viables.

Tesarik y Greco (8) describieron un criterio de evaluación de la morfología pronuclear basado en una única observación no invasiva de los cigotos humanos tras 12-20 horas de la FIV/ICSI. Con este criterio demostraron que se podía predecir en fases de división temprana, el bloqueo embrionario, el riesgo de desarrollar embriones con blastómeros multinucleados y la mala calidad embrionaria. En un trabajo posterior, Tesarik et al (19), reconocieron una subpoblación de embriones de buena morfología procedentes de cigotos P0 que tenían una tasa de implantación casi el triple que los derivados de cigotos con patrones diferentes, aunque la velocidad de división y la morfología no diferían entre estos dos grupos.

Son varios los trabajos que han estudiado la correlación de la morfología de los PN con otros marcadores de normalidad embrionaria. Wittemer et al (29) concluyeron que cigotos con P0 eran capaces de de-

sarrollar embriones de mejor calidad y con mayor potencial de implantación que los procedentes de patrones menos favorables. Ludwig et al (30) clasificaron los cigotos basándose en la posición de los PN, polarización de los CPNs y la apariencia del citoplasma.

Scott et al (9) observaron que los cigotos que originaban buenos blastocistos tenían entre tres y siete CPNs de tamaño similar en cada PN. La asincronía de los PN, en tamaño y número de CPNs, podría indicar anomalías cromosómicas o acontecimientos meióticos aberrantes que provocarían la alteración del desarrollo embrionario normal y el fracaso de la implantación. En otro grupo de pacientes, la fusión de los CPNs fue extremadamente rápida, originando en cada PN dos o tres CPNs de gran tamaño. Los embriones procedentes de estos cigotos compactaban muy rápidamente formándose uniones celulares estrechas con tan solo 8-10 blastómeros en D+3. Estos embriones habitualmente no llegaban a blastocisto. Los autores pensaron que el desarrollo acelerado provocaba el rápido consumo del sustrato metabólico del medio de cultivo y llevaba a la transferencia de los embriones en un estado de desarrollo muy avanzado respecto al ambiente uterino. Estos hallazgos sugirieron que sería necesario un seguimiento de los embriones durante todo su desarrollo y no una evaluación puntual o de un solo parámetro de selección.

Coskun et al (31) observaron la relación del patrón pronuclear con la incidencia de anomalías cromosómicas, siendo éstas significativamente más bajas en los cigotos con los CPNs polarizados. Sin embargo, otras características del cigoto como la presencia de halo citoplasmático, tamaño de los pronúcleos y número de CPNs no mostraron esta relación.

Balaban et al (15) describieron que la tasa de

aneuploidías en embriones derivados de cigotos con ambos PNs normales (P0), uno anormal o ambos anormales fue 25,6%, 73% y 83%, respectivamente. La tasa de desarrollo hasta blastocisto de los embriones con patrón normal fue mayor (90%) que la de los embriones cromosómicamente normales con un solo PN anormal (61%) o dos PNs anormales (40%) Concluyeron que la morfología de los PNs predecía el riesgo de bloqueo del desarrollo embrionario y la incidencia de anomalías cromosómicas.

De Placido et al (32) evaluaron la calidad embrionaria en D+2 y D+3. El análisis de los datos les mostró un bajo coeficiente de correlación. En este trabajo seleccionaron los embriones por su calidad en D+1, morfología embrionaria y número de blastómeros en D+2/D+3. Este sistema de selección fue altamente predictivo del éxito o fracaso de la FIV. De hecho, cuando se transfirió un 100 % de embriones de buena calidad las tasas de embarazo y de implantación fueron del 75% y del 28,1%, respectivamente. Estos autores concluyeron que la morfología del cigoto, del embrión y la tasa de desarrollo no son capaces de predecir independientemente el resultado del ciclo de FIV, sino que se requiere una combinación de todos estos parámetros. Este sistema de selección, valorando múltiples factores, permite reducir el número de embriones para transferir, conservando buenas tasas de gestación y reduciendo la incidencia de embarazo múltiple (32) Sin embargo, en ocasiones este seguimiento embrionario no es suficiente ya que la edad materna es otro factor que se debería tener en consideración (33)

Salumets et al (11) estudiaron la morfología pronuclear combinada con la transferencia de un único embrión para determinar si la evaluación actual de los cigotos permite la predicción de la calidad embrionaria y de la tasa de implantación. Consideraron 3 grupos en función de la polarización de los CPNs: polarización en ambos, al menos en uno y en ninguno. La tasa de división fue 57,3%, 54% y 38,9%, respectivamente ( $p < 0,005$ ) Sin embargo, no hubo diferencias en la tasa de gestación entre los grupos cuando se transfirió un único embrión. También clasificaron los cigotos basándose en el número y distribución de los CPNs. Ninguno de los 6 patrones dio embriones de mejor calidad o mayor tasa de gestación en las 144 transferencias de un único embrión, a diferencia de nuestros resultados donde los mejores embriones procedían de cigotos P0.

Cuando agrupamos los ciclos como previamente se ha indicado (Tabla 2), la edad media de las pacientes fue muy similar en todos los grupos, aunque ligeramente inferior en el grupo (GIV) donde todos los

embriones transferidos fueron de buena calidad, se desarrollaron a partir de cigotos con patrón ideal, y además el número medio de embriones transferidos fue menor ( $p < 0,05$ ) Es decir como cabría esperar, las pacientes más jóvenes tuvieron mejores embriones procedentes de cigotos de buena calidad.

Gamiz et al (12) encontraron que los cigotos con similar tamaño pronuclear y con 3-4 CPNs polarizados tenían mejor pronóstico, basándose en el desarrollo embrionario y en la baja incidencia de anomalías cromosómicas (D+3) El tamaño del PN fue el factor que más afectó al desarrollo del embrión. Cuando el tamaño de los PNs fue similar, se encontró un menor porcentaje de multinucleación de los blastómeros en D+3 y mayor porcentaje de embriones compactados y cavitados en D+5. Esto solo se observó en pacientes con edad media (37 años, lo que confirmó que la valoración de los PNs debería utilizarse como herramienta para seleccionar los mejores cigotos / embriones para transferir en este grupo de edad.

El número de embriones transferidos en GIII fue bajo, inferior al de los grupos I y II, sin embargo se trataba de embriones que no procedían del patrón ideal. Para explicar estos resultados hubiera sido interesante disponer del número medio de ovocitos recuperados y de la tasa de fecundación en cada uno de los grupos, ya que si el número de ovocitos recuperados en GIII y su tasa de fecundación fuesen reducidas, se entendería la transferencia de un menor número de embriones a pesar de su mala morfología.

La tasa de embarazo múltiple fue similar en GI y GII, a pesar de transferir en GI un único embrión de buena calidad procedente de un cigoto P0. La tasa de implantación más baja se obtuvo en el grupo donde ninguno de los embriones transferidos se originó de cigotos con P0, lo que evidencia que los embriones de buena calidad (G1-G2) que no derivan de cigotos P0 son capaces de implantar aunque con una menor tasa de éxito. Por tanto parecen necesarias y complementarias la evaluación en D+1 y D+2/D+3 para seleccionar los embriones más viables, así como el seguimiento del ovocito desde el momento de su recuperación.

Concluimos por el análisis de nuestros resultados y los trabajos referidos que la valoración de los PNs puede incorporarse satisfactoriamente a la práctica de la evaluación embrionaria y predicción del potencial de implantación (8, 9, 11, 14, 15, 20, 25, 29, 30, 31); y que los embriones de buena calidad (G1-G2) procedentes de cigotos con patrón ideal (P0) tienen mayor tasa de implantación que los desarrollados a partir de cigotos anormales (P1-P5) La morfología del cigoto y del embrión dividido nos proporciona información de

gran valor a la hora de incrementar la eficacia de los ciclos de FIV, es decir nos permiten incrementar las tasas de gestación reduciendo el riesgo de embarazo múltiple. Actualmente, se está desarrollando este trabajo para incrementar el número de ciclos por grupo y obtener resultados más concluyentes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Cummins JM, Breen <sup>TM</sup>, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF.:** A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1986; 3: 284-295.
2. **Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F.:** Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987; 2:705-708.
3. **Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG.:** 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. *Hum Reprod* 1992; 7:117-119.
4. **Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y.:** Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 1993; 60:123-126.
5. **Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R.:** Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10: 2427-2431.
6. **Marquez C, Sandalinas M, Bahce M, Alikani M, Munne S.:** Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* 2000; 1:17-26.
7. **Rubio C, Simon C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, Pellicer A.:** Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* 2003; 18: 182-188.
8. **Tesarik J, Greco E.:** The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-1323.
9. **Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B.:** The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 2000; 15:2394-2403.
10. **Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Donmez E, Benkhalifa M, Findikli N, Vanderzwalmen P.:** Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. *Hum Reprod* 2002; 17:3193-3200.
11. **Salumets A, Hyden-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T.:** The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. *Hum Reprod* 2001; 16:2177-2181.
12. **Gamiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simon C, Remohi J, Pellicer A.:** The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 2413-2419.
13. **Chen CK, Shen GY, Horng SG, Wang CW, Huang HY, Wang HS, Soong YK.:** The relationship of pronuclear stage morphology and chromosome status at cleavage stage. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 413-420.
14. **Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A.:** The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357-2361.
15. **Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J.:** Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 695-700.
16. **Tesarik J, Kopecny V.:** Nucleic acid synthesis and development of human male pronucleus. *J Reprod Fertil* 1989; 86: 549-558.
17. **Tesarik J, Kopecny V.:** Assembly of the nucleolar precursor bodies in human male pronuclei is correlated with an early RNA synthetic activity. *Exp Cell Res* 1990; 191: 153-156.
18. **Braude P, Bolton V, Moore S.:** Ethical bounds. *Nature* 1988; 335 (6189): 392.
19. **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.
20. **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.
21. **Munne S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J.:** Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993; 8: 2185-2191.
22. **Gianaroli L, Magli MC, Munne S, Fiorentino A, Montanaro N, Ferraretti AP.:** Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod* 1997; 12: 1762-1767.
23. **Tesarik J, Kopecny V.:** Development of human male

- pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* 1989; 24: 135-149.
24. **Wright G, Wiker S, Elsner C, Kort H, Massey J, Mitchell D, Toledo A, Cohen J.:** Observations on the morphology of pronuclei and nucleoli in human zygotes and implications for cryopreservation. *Hum Reprod* 1990; 5: 109-115.
  25. **Scott L.A. and Smith S.:** The successful use of PN embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Huma Reprod* 1998; 13: 1003-1013.
  26. **Van Blerkom J, Davis P, Merriam J, Sinclair J.:** Nuclear and cytoplasmic dynamics of sperm penetration, PN formation and microtubule organization during fertilization and early preimplantation. *Hum Reprod Update* 1995; 1: 429-461.
  27. **Edwards RG and Beard HK.:** Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 863-905.
  28. **Eppig JJ, Schultz RM, O'Brien M, Chesnel F.:** Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. *Dev Biol* 1994; 164:1-9.
  29. **Wittmer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongières C, Nisand I, Gerlinger P.:** Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 2000; 15: 2591-2597.
  30. **Ludwig M, Schopper B, Al-Hasani S, 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.
  31. **Coskun S, Hellani A, Jaroudi K, Al-Mayman H, Al-Kabra M, Qeba M.:** Nucleolar precursor body distribution in pronuclei is correlated to chromosomal abnormalities in embryos. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 86-90.
  32. **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 Reprod* 2002; 17: 2402-2409.
  33. **Van Kooij RJ, Looman CW, Habbema JD, Dorland M, Velde ER.:** Age-dependent decrease in embryo implantation rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1996; 66: 769-775.