

## **Clasificación de embriones a las 25-27 h post-fecundación en su elección para transferencia**

*Selection of embryos for transfer using the assessment of embryo cleavage at 25-27 h post fecundation.*”

Jiménez V <sup>(1)</sup>, Buelta L <sup>(2)</sup>, Hervas JL <sup>(1)</sup>, Valdor C <sup>(1)</sup>, Carrera T <sup>(1)</sup>, Illarregui A <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander. <sup>(2)</sup>Departamento de Ciencias Médicas y Quirúrgicas. Anatomía Patológica. Facultad de Medicina. Universidad de Cantabria.

### **Resumen**

**Objetivos:** *Determinar si la clasificación de los embriones a las 25-27h post FIV/ICSI altera la tasa de embarazo y si la presencia de embriones divididos a las 25-27 h post FIV/ICSI aumenta las probabilidades de embarazo. Método:* Se incluyeron en este estudio 204 ciclos realizados a 159 parejas sometidas a Fecundación in vitro convencional (FIV) o microinyección citoplasmática (ICSI) con transferencia embrionaria. Se llevan a cabo 2 estudios. En el primer estudio se dividieron los 204 ciclos en 2 grupos, en uno de ellos (1 B) se realizó la observación de los embriones a las 25-27 h post fecundación y en el otro no (1 A). En el segundo estudio sólo se tuvieron en cuenta los 94 ciclos en los que se observaron los embriones a las 25-27 h post FIV y/o ICSI y se dividieron en 2 grupos en función de la presencia (2 A) o no (2 B) de embriones divididos a las 25-27 h post fecundación. Resultados: En el estudio 1 no se observaron diferencias significativas en las tasas de implantación y embarazo pero sí en la calidad de los embriones transferidos, siendo mejor en el grupo 1 B. En el estudio 2, tampoco se observan diferencias en las tasas de implantación y embarazo pero sí en la calidad de los embriones transferidos. Conclusión: La observación de los embriones a las 25-27h no afecta negativamente a los embriones y la presencia de embriones divididos a las 25-27 h post FIV/ ICSI nos permite seleccionar entre embriones de igual calidad en el día de la transferencia.

**Palabras clave:** Embriones humanos. División embrionaria. Tasa de embarazo. Tasa de implantación.

---

**Correspondencia:** Dra. Victoria Jiménez Moreno  
Unidad de Reproducción Asistida, Hospital Cantabria  
C/ Cardenal Herrera Oria s/n  
39011, Santander (Cantabria)  
victoriaj12001@yahoo.es

## Summary

**Objective:** *The purpose of this study is to determine whether the assessment of embryo cleavage within 25-27 h post FIV/ICSI may have any effect on the pregnancy rate and whether the presence of early cleavage embryos within 25-27 h post FIV/ICSI may provide a higher pregnancy rate.* **Method:** *204 cycles were performed in 159 couples who had previously undergone a routine IVF treatment with embryo transfer. Two studies were developed. In study 1, the 204 cycles were divided into two groups: in the first group (1B), the assessment of embryo cleavage within 25-27 h post FIV/ICSI was carried out, whereas in the second group (1A), the observation of embryos within the same period of time was not carried out. In Study 2, once the assessment of embryo cleavage within 25-27 h post FIV/ICSI was carried out, only 94 cycles were selected depending on the presence (2A) or absence (2B) of embryo cleavage within that same period of time. The resulting 94 cycles were then divided into two groups.* **Results:** *In Study 1, no statistically significant differences either in the implantation or in the pregnancy rates were found. However, the embryo quality of transfer embryos was significantly higher in group 1B than in group 1A. Likewise, in study 2 there were no statistically significant differences either in the implantation or in the pregnancy rates, but again the quality of the transfer embryos was better.* **Conclusion:** *The assessment of embryo cleavage within 25-27 h post FIV/ICSI does not cause the embryos any negative effect and, consequently, the presence of cleavage embryos can be used in order to select the most suitable embryos from other embryos of the same quality on the day of transfer.*

**Key words:** Human embryos, Embryo cleavage. Pregnancy rate. Implantation rate.

## INTRODUCCIÓN

La finalidad de las técnicas de fecundación in vitro (FIV) y el cultivo embrionario es conseguir embriones de buena calidad capaces de desarrollarse e implantar, lo que daría lugar a nacimientos viables (1). Uno de los problemas derivados de la utilización de las Técnicas de Reproducción Asistida son los embarazos múltiples ya que en la actualidad carecemos de los medios adecuados para determinar qué embriones son susceptibles de implantar y por lo tanto es necesaria la transferencia de más de un embrión para obtener las máximas posibilidades de embarazo (2).

Uno de los pasos decisivos en las Técnicas de Reproducción Asistida, es la selección de los embriones que van a ser transferidos al útero materno. Dichos embriones son elegidos dentro de una cohorte embrionaria en función de una serie de parámetros morfológicos y del ritmo de división. A lo largo de los años, se han ido desarrollado diferentes clasificaciones de los embriones para determinar qué embriones tienen mayor capacidad de implantación, sin que ninguna de ellas sea la perfecta.

Normalmente los embriones son transferidos al útero en el estadio de células en el día +2 (3) o día +3 después de la obtención e inseminación y/o microinyección de los ovocitos (día 0). Las características morfológicas que se tienen en cuenta a la hora de seleccionar los embriones a transferir son el número de

blastómeras, tamaño y morfología de las blastómera y grado de fragmentación, tal y como lo describe Veeck L (4). A lo largo de los años a estas características se les han añadido otros parámetros tales como ritmo de división, simetría y aspecto del citoplasma, multinucleación, contacto entre las células y aspecto y grosor de la zona Pelúcida (1). La adición de estos parámetros a la clasificación de embriones clásica establecida por Veeck L (4) permite una mejor selección de los embriones a transferir aunque sigue sin permitirnos determinar qué embriones son realmente susceptibles de implantar.

El siguiente paso fue sustituir la transferencia de embriones en células (transferencia en día +2 y +3), por la transferencia de embriones en el estadio de blastocisto (día +5 o +6) ya que es cuando los embriones son susceptibles de implantar en la cavidad uterina tras realizar hatching (eclosión) y además hay una mejor sincronización entre el embrión y el útero. De esta manera se reduciría el número de embriones a transferir ya que tendríamos mayor probabilidad de elegir embriones genéticamente normales y con mayor capacidad de implantación (2).

La transferencia de embriones en el estadio de blastocistos requiere el cultivo in vitro de dichos embriones durante 4 o 5 días después de que se haya producido la fecundación in vitro. En la actualidad, los recursos (medios secuenciales o cocultivos) de los que se dispone no proporcionan las condiciones físico-quí-

micas y biológicas ideales para el correcto desarrollo de los blastocistos. Menezo y Elder describen que sólo entre un 45-50% de los embriones llegan a blastocistos (1), incluso existen otros autores como Bolton y cols. que hablan de una tasa de formación de blastocistos del 20-25 % (5). Debido a esto, la transferencia de embriones en estadio de blastocistos queda reducida a casos especiales como por ejemplo fallos de implantación repetitivos, diagnóstico preimplantacional, etc.

En los últimos años, diferentes investigadores han ido desarrollando un nuevo sistema de clasificación de cigotos (2PN) (3, 6, 7). Este sistema de clasificación está basado en el estudio de la morfología, localización de los pronúcleos, posición y número de nucleolos y apariencia del citoplasma (presencia o no de halo citoplasmático) de los cigotos (3, 6, 7). El estudio de Scott y col (3) mostraron que cuando existen pronúcleos yuxtapuestos con nucleolos alineados y presencia de halo citoplasmático en dos o más embriones de la cohorte embrionaria da lugar a una elevada tasa de implantación aunque Salumets y col (7) fueron incapaces de demostrar que la clasificación morfológica de los cigotos nos fuera a permitir obtener mejores embriones y tasas de embarazo.

Por todo ello es necesario seguir realizando estudios para desarrollar nuevos métodos de clasificación embrionaria que nos permitan elegir los preembriones con mayor capacidad implantatoria. Estos nuevos sistemas de clasificación, tienen que ser no invasivos y tiene que poder realizarse en un periodo de tiempo corto que no afecte la viabilidad de los embriones.

Uno de estos nuevos sistemas de clasificación no invasivos propone la utilización de la primera división celular entre las 25-27 h post FIV/ICSI como parámetro nuevo a tener en cuenta a la hora de seleccionar los preembriones que van a ser transferidos al útero materno.

En 1984, Edwards y col (8) demostraron que a mayor velocidad de división de los embriones mayor probabilidad hay de que estos implanten. Posteriormente Cummins y col (1986) expusieron que una buena calidad embrionaria asociada a una buena velocidad de división aumenta las probabilidades de embarazo (9), “aunque no tuvo en cuenta la variabilidad que existe en el tiempo de división celular” (10). Es decir cuando tiene lugar la clasificación y selección de los preembriones para transferir, no puede distinguir dentro de un grupo de embriones de igual número de células ej. 6 blastómera, “cual es el que acaba de dividirse o cual es el que lleva varias horas dividido”.(10)

Los trabajos realizados por Nagy y col en 1994 (11) y por van Wissen y col en 1995 (12) sobre la primera división mitótica de los preembriones establece

que dicha división celular tiene lugar entre las 25 y 27 h post-tratamiento en aproximadamente el 30% de los ovocitos fecundados.

En función de estos datos, Shourkir y col (13) en 1997 proponen “un nuevo método para evaluar la viabilidad embrionaria basada en el tiempo en el que tiene lugar la primera división celular de los embriones”(10) para ello seleccionaron los embriones que estaban divididos a las 27 h post-FIV y los transfirieron. Como resultado obtuvieron un aumento en las tasas de embarazo e implantación. En 1998, Sakkas y col (10), realizaron un estudio parecido utilizando embriones obtenidos mediante ICSI y los resultados fueron similares.

Ludin y col (14) observaron que existe un mayor número de preembriones de buena calidad morfológica en el grupo de embriones que se encontraba dividido a las 25-27 h post FIV/ICSI que en el grupo de embriones que no presentaba signos de división a las 25-27 h post FIV/ICSI. Fenwick y col (15) observaron que un mayor número de embriones eran capaces de alcanzar el estadio de blastocisto en el grupo de embriones dividido a las 25 h que en el grupo de embriones sin dividir a las 25h.

Teniendo en cuenta estos datos, en nuestra Unidad de Reproducción Asistida hemos comparado los resultados de nuestras pacientes con la finalidad de comprobar si la presencia o no de división celular a las 25-27 h post FIV/ICSI puede ser un parámetro a tener en cuenta a la hora de seleccionar los embriones que van a ser transferidos dentro de una cohorte embrionaria.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en este estudio 766 embriones procedentes de 204 ciclos realizados a 159 parejas en el periodo de tiempo que comprende entre Agosto del 2003 y Abril del 2005. Los embriones se obtuvieron del Programa de Reproducción Asistida del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Las parejas incluidas en este estudio fueron sometidas a Fecundación in vitro convencional (FIV) o microinyección citoplasmática (ICSI) y se les transfirieron entre 1 y 3 embriones en día D+2 (n= 200 transferencias) o D+3 (n= 4 transferencias).

### 1º Estimulación ovárica:

El protocolo utilizado ha sido previamente descrito por Navarro y col (16): la estimulación ovárica se realizó con la administración de acetato de leuprolide (Procrin “Laboratorios Abbott. Madrid) a una dosis de

0.5 mg/día. Tras comprobar la supresión hipofisaria se inició la administración de FSH recombinante (Gonal-F ® Lab.Serono.Madrid.; Puregon® Lab.Organon. Barcelona) a una dosis de 300 UI/día durante 5 días, tras lo cual la dosis diaria se ajustó en función de la respuesta individual. El control del desarrollo folicular se realizó con determinaciones de estradiol sérico y ecografía transvaginal. En el momento en el que se observaron criterios de una adecuada madurez folicular (al menos 4 folículos ( 16 mm y niveles de estradiol adecuados al desarrollo folicular) se indicó la administración de 10.000 UI de Gonadotropina coriónica humana recombinante (Ovitrelle ® Serono. Madrid).

La punción folicular se llevó a cabo 35 horas tras la administración de la hCG, bajo guía ecográfica. La transferencia embrionaria fue ecoguiada y se realizó en el día +2 o +3.

## 2º Procedimientos de laboratorio

Los ovocitos se obtuvieron del líquido folicular extraído mediante punción folicular e incubados al menos 3 horas en medio de cultivo (IVF medium ®Medicult.Dinamarca). Al cabo de las 3 horas de incubación en aquellos casos en los que se fuera a realizar FIV, los ovocitos se inseminaron con  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml por ovocito. En los casos en los que se realizó ICSI, los ovocitos se desnudaron y los que estuvieran en Metafase II fueron posteriormente microinyectados.

A las 18h post inseminación o post microinyección comprobamos que hubiera habido fecundación mediante la presencia de dos pronucleos y dos corpúsculos polares en cada ovocito (cigoto).

Una vez obtenidos los cigotos comenzó el seguimiento. Realizamos la clasificación morfológica de los cigotos propuesta por Gianaroli y col (17) a las 18 h post FIV/ICSI y posteriormente a las 25-27 h post FIV/ICSI. Todos los cigotos fueron cultivados en ISM1 (®Medicult.Dinamarca) hasta el día+2. De la cohorte embrionaria elegimos los 2 o 3 embriones de mejor calidad en función de sus características morfológicas (% de fragmentación, blastómeras regulares y simétricas, grosor de la zona pelúcida, presencia de blastómeras multinucleadas...) y ritmo de división celular (nº de blastómeras). En el caso de que existieran más de 3 embriones de buena calidad, se eligieron aquellos que se habían dividido a las 25-27 h post FIV/ICSI.

Se utilizó la técnica del swin-up para la capacitación de las muestras seminales, tanto para FIV como para ICSI. La concentración y movilidad de las muestras seminales en fresco fueron valoradas mediante la

utilización de una cámara Makler y un microscopio óptico (20X). Para realizar el swin-up, las muestras se lavaron con Flushing medium (®Medicult.Dinamarca) mediante centrifugación. El número de revoluciones por minuto, tiempo de centrifugado y número de tubos dependió de la concentración y movilidad de cada muestra. A los pellets obtenidos se les añadió entre 300 y 600 (1 de IVF médium (®Medicult.Dinamarca) y se incubaron 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se recuperaron los sobrenadantes y se valoró la concentración y motilidad del capacitado con la cámara Makler.

Se determinaron los niveles de βhCG en sangre 14 días después de la captación de los ovocitos. En caso de embarazo, el latido cardíaco fue detectable por ecografía a las 7 semanas después de la punción folicular.

## 3º Definición de variables:

- a- Número de ovocitos: nº de ovocitos que se obtienen por punción.
- b- Número de MII: nº de ovocitos en el estadio de Metafase II que se obtienen por punción.
- c- Número de embriones: número de embriones totales obtenidos por ciclo.
- d- Número de embriones transferidos: nº de embriones por transferencia embrionaria.
- e- Tasa de embarazo: nº de embarazos / nº de transferencias embrionarias
- f- Tasa de implantación: nº total de sacos embrionarios/ nº total de embriones transferidos
- g- % de Abortos: nº de abortos x 100 / nº de embarazos
- h- % Ectópicos: nº de embarazos Ectópicos x 100 / nº total de embarazos
- i- Clasificación embriones:

1- Buena calidad: en D+2 se encuentran entre 2 y 4 células de igual tamaño. Ausencia de blastómeras multinucleadas y menos de un 25% de fragmentación.

2- Mala calidad: son embriones que no cumplen cualquiera de las condiciones anteriores en D+2.

## 4º Definición de los grupos de estudio:

### a) Estudio 1:

Grupo 1 A: los embriones no son clasificados a las 25-27 h post FIV/ICSI en 110 ciclos con transferencia embrionaria (n= 377 embriones).

Grupo 1 B: los embriones son clasificados a las 25-27 h post FIV/ICSI en 94 ciclos con transferencia embrionaria (n= 389 embriones).

Se compararon los resultados (tasa de embarazo,

tasa implantación, % abortos, % ectópicos) entre el grupo 1A y grupo 1B para determinar si la clasificación de los embriones a las 25-27 h post FIV/ICSI resulta perjudicial para ellos.

#### b) Estudio 2:

En este estudio solo se incluyeron aquellos ciclos (n= 94) en las que se hubiera realizado la clasificación de los embriones (n= 389) a las 25-27 h post FIV/ICSI y se compararon los resultados entre el grupo que presentó división celular a las 25-27 h post FIV/ICSI y el grupo que no mostró signos de división celular a las 25-27 h post FIV/ICSI.

Grupo 2 A: si hay división celular a las 25-27 h post FIV/ICSI en 50 ciclos con transferencia embrionaria (n= 245 embriones observados)

Grupo 2 B: no hay división celular a las 25-27 h post FIV/ICSI en 44 ciclos con transferencia embrionaria (n= 144 embriones observados).

En ambos estudios los casos han sido escogidos de forma aleatoria.

#### 5º Estadística:

Se ha utilizado el paquete estadístico SPSS versión 12. Los datos se analizaron mediante el test T-student y la prueba Chi-cuadrado.

## RESULTADOS

#### Estudio 1:

Realizamos 204 ciclos a 168 parejas con transferencia embrionaria. De ellos 110 pertenecían al grupo 1A (ciclos en los que no se ha realizado la observación de 377 embriones a las 25-27h postpunción) y 94 al grupo 1 B (la observación de 389 embriones a las 25-27h postpunción sí ha tenido lugar).

No se han observado diferencias significativas en la media de edad, número de ovocitos por punción, número de MII, número de embriones obtenido, y número de embriones transferidos (Tabla 1)

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos cuando se compararon las tasas de embarazo por transferencia, tasa de implantación, % de Abortos y % de embarazos ectópicos. (Tabla 2).

En cuanto a la calidad de los embriones que se transfirieron, sí se observaron diferencias significativas entre los dos grupos. (Tabla 3).

#### Estudio 2:

En este apartado, se han incluido los 94 ciclos en los que se llevó a cabo la observación de los embri-

**Tabla 1**

*Análisis general de los grupos del estudio 1*

	GRUPO 1 A	GRUPO 1 B	p
Edad	34,46 ± 3,52	34,07 ± 3,80	NS
Nºovocitos	7,31 ± 4,03	8,54 ± 4,30	NS
Nº MII	5,78 ± 3,5	7,10 ± 3,79	NS
Nº de Embriones	3,43 ± 2,14	4,14 ± 2,56	NS
Nº de embriones transferidos	2,31 ± 0,70	2,22 ± 0,69	NS

T student, ± desviación típica, NS: no significativo

Grupo 2 A: sin observación a las 25-27 h post punción.

Grupo 2 B : con observación a las 25-27 h post punción.

**Tabla 2**

*Análisis de los resultados de los grupos del estudio 1*

	GRUPO 1 A	GRUPO 1 B	p
Embarazo/ transferencia	32 (29,1 %)	28 (29,8%)	NS
Tasa de implantación	14,96 %	18,18 %	NS
% Abortos	5 (15,6 %)	3 (10,7%)	NS
% Ectópicos	3 (9,4 %)	0 (0,00%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo

Grupo 2 A: sin observación a las 25-27 h post punción.

Grupo 2 B : con observación a las 25-27 h post punción

**Tabla 3**

*Análisis de la calidad embrionaria de los embriones transferidos*

	GRUPO 1 A	GRUPO 1 B	p
Embriones de buena calidad	49 (44,5%)	55 (58,5%)	p <0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo

Grupo 2 A: sin observación a las 25-27 h postpunción.

Grupo 2 B : con observación a las 25-27 h post punción.

nes a las 25-27 h postpunción. De ellos 50 ciclos pertenecieron al grupo 2A (n= 245 embriones estudiados a las 25-27 horas postpunción) y 44 al grupo 2 B (no se observó división embrionaria a las 25-27 horas postpunción, n= 144 embriones).

No se han observado diferencias significativas en la media de edad, número de MII, y número de embriones transferidos. Sin embargo sí que existen diferencias significativas en el número de ovocitos y de embriones obtenidos (Tabla 4).

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los dos grupos cuando se compararon las tasas de embarazo por transferencia, aunque si una cierta tendencia a una mayor tasa de embarazo en el Grupo 2 A. La tasa de implantación, % de Abortos y % de

**Tabla 4**  
Análisis general de los grupos del estudio 2

	GRUPO 2 A	GRUPO 2 B	p
Edad	34,14 ± 3,156	34,00 ± 3,95	NS
Nº ovocitos	9,42 ± 4,60	7,55 ± 3,73	p < 0.05
Nº MII	7,68 ± 3,90	6,43 ± 3,58	NS
Nº de Embriones	5,06 ± 2,75	3,09 ± 1,87	p < 0.05
Nº de embriones transferidos	2,28 ± 0,64	2,16 ± 0,75	NS

T student, ± desviación típica, NS: no significativo  
 Grupo 2 A: con división embrionaria a las 25-27 h post punción.  
 Grupo 2 B : sin división embrionaria a las 25-27 h post punción

embarazos Ectópicos tampoco presentaron diferencias significativas (Tabla 5).

En cuanto a la calidad de los embriones que se transfirieron, sí se observaron diferencias significativas entre los dos grupos. (Tabla 6).

## DISCUSIÓN

La solución para evitar los embarazos múltiples es la transferencia de un único embrión y para llevar a cabo dicho propósito, sin afectar las tasas de embarazo, necesitamos encontrar parámetros que nos permitan seleccionar el embrión con mayor potencial de implantación dentro de una cohorte embrionaria.

Estudios recientes realizados por Cummins y col (9), Sacas y col (10), Shourkir y col (16) proponen la utilización de la primera división celular entre las 25 y 27 horas postpunción como un parámetro nuevo a tener en cuenta a la hora de seleccionar los embriones que van a ser transferidos al útero materno.

Para llevar a cabo la clasificación de los embriones a las 25-27 h postpunción es necesario sacar los embriones del incubador con el correspondiente cam-

**Tabla 5**  
Análisis de los resultados de los grupos del estudio 2

	GRUPO 2 A	GRUPO 2 B	p
Embarazo/ transferencia	18 (36,0 %)	10 (22,7 %)	NS
Tasa de implantación	22,8%	12,6	p = 0.05
% Abortos	2 (11,1 %)	1 (10,0%)	NS
% Ectópicos	0 (0,00 %)	0 (0,00%)	NS

Chi-cuadrado. NS: no significativo  
 Grupo 2 A: con división embrionaria a las 25-27 h post punción.  
 Grupo 2 B : sin división embrionaria a las 25-27 h post punción

**Tabla 6**  
Análisis de la calidad embrionaria de los embriones transferidos

	GRUPO 1 A	GRUPO 1 B	p
Embriones de buena calidad	49 (44,5%)	55 (58,5%)	p < 0,05

Chi-cuadrado. NS: no significativo  
 Grupo 2 A: con división embrionaria a las 25-27 h post punción.  
 Grupo 2 B : sin división embrionaria a las 25-27 h post punción

bio en las condiciones ambientales que les rodean (ej. temperatura y pH del medio de cultivo), los cuales pueden influenciar de forma negativa en el desarrollo embrionario. Según el estudio realizado por Sacas y col (18), el hecho de clasificar los embriones a las 25-27 horas postpunción no afecta al desarrollo embrionario y aumenta las probabilidades de embarazo y la tasa de implantación. Estos resultados no coinciden con los obtenidos en nuestro estudio ya que la observación de los embriones a las 25-27 horas postpunción, si bien parece ser que no afecta al desarrollo embrionario, tampoco aumenta las tasas de embarazo ni las de implantación, aunque tampoco las disminuye. Por otra parte sí que hemos observado que la calidad de los embriones que hemos transferido en el Grupo en el que se ha realizado la observación a las 25-27 h es mejor que en el grupo control. A pesar de que nuestros resultados son diferentes a los obtenidos por Sacas y col (18), estamos de acuerdo con ellos en que la observación de los embriones a las 25-27h postpunción no altera de forma negativa el desarrollo embrionario ya que las tasas de embarazo e implantación no disminuyen.

Una vez establecido que la clasificación de los embriones a las 25-27 horas postpunción no afecta negativamente a los embriones, valoramos si la presencia de embriones divididos en 2 células a las 25-27 horas postpunción da lugar a un aumento en las tasas de embarazo e implantación tal y como habían observado Lundin (14) y Sakkas (10, 18). En nuestro estudio, observamos una mejor calidad embrionaria de los embriones transferidos y una mayor tasa de implantación en el grupo de estudio (embriones divididos a las 25-27h) que en el grupo control (ausencia de embriones divididos a las 25-27h). El mayor porcentaje de embriones transferidos de mejor calidad en el grupo de estudio, según Clegg y col (23) podría deberse a que los embriones que se dividen pronto (25-27 h) tienen menos posibilidades de agotar las reservas de mRNA de origen materno que les permite alcanzar los estadios de 4-8 células donde tiene lugar la activación del genoma embrionario.

En cuanto a la comparación de las tasas de emba-

razo entre los dos grupos, no existen diferencias significativas pero si se observa una cierta tendencia a una mayor tasa de embarazo en el grupo de estudio, lo que se correlaciona con la mayor tasa de implantación y mejor calidad embrionaria observada en dicho grupo con respecto al grupo control. El hecho de que en nuestro estudio no se vea un claro aumento en las tasas de embarazo en el grupo de los embriones divididos podría ser porque hemos incluido en nuestro trabajo todos los ciclos de TRA independientemente de la técnica que hayamos utilizado para fecundar los ovocitos (ICSI o FIV convencional). Lundin y col (14) exponen que los embriones procedentes de ICSI tienen una mayor tasa de división a las 25-27 h postpunción que los embriones procedentes de FIV pero igual porcentaje de embriones de buena calidad. Esto podría deberse a que al realizar la ICSI se introduce directamente el espermatozoide dentro del ovocito y en ese momento se empieza a contabilizar las 25-27 h mientras que al realizar una FIV clásica, el tiempo empieza a contarse cuando los espermatozoides se ponen en contacto con los ovocitos pero todavía tardarán un tiempo en entrar dentro de ellos, ya que tienen que tener lugar una serie de pasos (ej. reacción acrosómica, interacción con zona pelúcida....) necesarios para que tenga lugar la fecundación.

En resumen, podemos concluir que la clasificación de los embriones a las 25-27 horas no afecta a los resultados de las técnicas de Fecundación In vitro y nos aporta información sobre los embriones obtenidos. La presencia de embriones divididos a las 25-27 horas postpunción por si sola no es un parámetro determinante a la hora de seleccionar los embriones que vamos a transferir y por tanto seguiremos dando preferencia al ritmo de división (nº de células) y características morfológicas de los embriones aunque probablemente sean los embriones de división temprana los que tengan una mayor calidad embrionaria. La división a las 25-27 horas postpunción será un parámetro muy útil a la hora de elegir entre dos embriones de igual calidad en el momento de la transferencia.

También consideramos que es necesario continuar estos estudios, para poder aumentar el número de muestreos y poder tener en cuenta otro tipo de factores como por ejemplo la técnica de Reproducción asistida empleada (FIV o ICSI), calidad ovocitaria, parámetros seminales etc.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Menézo Y, Elder K.:** Desarrollo embrionario hasta blastocisto. En Remohi J, Pellicer A, Simón C, Navarro J.

Reproducción humana. 2ª de. Madrid: Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S.A.U; 2002.p.407-412.

2. **Karaki R Z, Samarraie S S, Younis N A, Lahloub T M, Ibrahim M H.:** Blastocyst culture and transfer: a step toward improved in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* 2002; 77: 114-118.
3. **Scott L A, Smith S.:** The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. *Human. Reprod.* 1998; 13 (4): 1003-1013.
4. **Veek L.:** Evaluación de ovocitos y preembriones en el laboratorio FIV. En : Remohi J, Pellicer A, Bonilla-Musoles F, editores. *Avances en Reproducción Asistida*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos S.A., 1992, p 117-162.
5. **Bolton UN, Wren ME, Parson JH.:** Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil. Steril.* 1991; 55:830-832.
6. **Tesarik J, Greco, E.:** The probability of abnormal implantation development can be predicted by a single static observation on PN stage morphology. *Human Reprod.* 1999, 14: 1318-1323.
7. **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. *Human Reprod.* 2001, 16 (10): 2177-2181.
8. **Edwards R G, Fishel S B, Cohen J et al.:** Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J. In Vitro Fert.Embryo Transf.* 1986, 1:3-23.
9. **Cummins J M, Breen T M., Harrison K , et al.:** 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.
10. **Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi P G, Campna A.:** Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum.Reprod.* 1998, 13:182-187.
11. **Nagy Z, Liu J, Joris H, et al.:** Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod* 1994, 9:1743-1748.
12. **Van Wissen B, Wolf J P, Bomsel-Helmreich O, et al.:** Timing of pronuclear development and first cleavages in human embryos after subzonal insemination: influence of sperm phenotype. *Hum.Reprod.* 1995, 10:642-648.
13. **Shourkir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D.:** Early cleavage of in vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryos quality and viability. *Hum.Reprod.* 7:1531-1536.

14. **Ludin K, Berg C, Hardarson T.:** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Human.Reprod.* 2001, 16: 2652-2657.
15. **Fenwick J, Platteau , Murdoch A.P, Herbert M.:** Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Human. Reprod.* 2002, 17: 407-412.
16. **Navarro I, Quintero LA, Jimenez-Moreno V, Monzo A, Santana AG, Montañana V, Romeu A.:** Comparación del porcentaje de fecundación y la calidad embrionaria tras la realización de FIV e ICSI en un mismo ciclo de tratamiento: estudio preliminar. *R. Iberoamericana de Fertilidad* 2001, 18 (2): 75-79.
17. **Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A.P., Fortini D, Griego N.:** Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil. Steril.* 2003, 80: 341-349.
18. **Sakkas D, Percival G, D`Arcy Y, Sharif K, Afnan M.:** Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertility and Sterility* 2001, 76:1150-1156.
19. **Clegg K.B., Piko I.:** Quantitative aspects of RNA synthesis and polyadenylation in 1-cell and 2-cell mouse embryos. *J. Embryol.Exp.Morphol.*, 1983, 74: 169-182.