

División embrionaria temprana (EC) en transferencias únicas (SET)

Early cleavage (EC) in single embryo transfers (SET)

María De las Heras¹, Gemma Arroyo¹, Montserrat Boada¹, Buenaventura Coroleu¹, Anna Veiga^{1,2}

¹ Servicio de Medicina de la Reproducción. Departamento de Ginecología, Obstetricia y Reproducción. Institut Universitari Dexeus. Barcelona. ² Banco de Líneas Celulares. Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona. Barcelona.

Resumen

Objetivo: *Determinar el embrión más viable que dará lugar a un embarazo a término es vital en un ciclo de FIV. Este estudio analiza el valor predictivo de la división temprana (early cleavage, EC) como parámetro adicional a la calidad embrionaria en transferencias únicas. Material y métodos:* Se analizaron retrospectivamente 251 transferencias únicas. La división temprana fue determinada 26.7 ± 0.9 horas post-inseminación. La selección del embrión a transferir se basó en su morfología el día de la transferencia, no en el estado de la división temprana. Se analizaron 2 grupos de pacientes en función de observarse o no división temprana en alguno de sus embriones en transferencias únicas selectivas (eSET) y no selectivas (neSET). **Resultados:** De 1751 embriones analizados el 35.8% presentaron división temprana. De éstos, el 82.8% fueron evolutivos frente al 65.8% de los que no presentaron división temprana pero sí desaparición de pronúcleos (no PN) y el 57.4% que presentaban pronúcleos visibles (PN) ($p < 0.0001$). La tasa de implantación de los embriones EC fue del 38.8% frente al 24.6% en los no PN y el 13.1% de los PN ($p < 0.001$). En las 137 transferencias selectivas, 128 pacientes presentaron división temprana en alguno de sus embriones (EC) frente a 9 que no la presentaron en ninguno de ellos (NEC), sin diferencias en la tasa de implantación (42.2% vs 44.4%). La tasa de implantación de los embriones que presentaron EC fue significativamente mayor que la de los embriones NEC en el grupo de transferencias no selectivas (23.1% vs 9.1%; $p < 0.1$). **Conclusiones:** En transferencias únicas, observar división temprana es un factor de buen pronóstico relacionado con el potencial implantatorio del embrión. En transferencias únicas selectivas (eSET) únicamente predice el potencial evolutivo de los embriones mientras que en transferencias únicas no selectivas (neSET) la tasa de implantación es mayor cuando el embrión transferido presenta EC.

Palabras clave: división temprana. Transferencia única. EC. SET

Correspondencia: Dra. María de las Heras
Servicio de Medicina de la Reproducción
Departamento de Ginecología, Obstetricia y Reproducción
Institut Universitari Dexeus
Gran Vía Carlos III 71-75
08028 Barcelona

Summary

Objective: To establish which embryo leads up to pregnancy is vital in IVF programmes. This study examines the predictive value of early cleavage (EC) as an additional parameter to embryo quality in single embryo transfers. **Materials and methods:** 251 single embryo transfers were retrospectively analyzed. Early cleavage status was assessed at 26.7 ± 0.9 hours after insemination. The selection of the embryo for transfer was based on the morphological score in the day of transfer, not on the early cleavage status. The characteristics of two groups of patients were examined, depending on the observation of early cleavage in any of their embryos in elective and not elective single embryo transfers. **Results:** From 1751 examined embryos, 35.8% exhibited early cleavage (EC). Of these, 82.8% were ongoing embryos, whereas of those that didn't exhibit it but in which pronuclear breakdown had taken place (no PN) 65.8% were ongoing while only 57.4% in embryos with visible pronuclei (PN) ($p < 0.0001$). Implantation rate in EC embryos was 38.8% vs 24.6% and 13.1% in no PN and PN embryos respectively ($p < 0.001$). In 137 elective single embryo transfers (eSET), 128 patients exhibited EC in some of their embryos while 9 of them didn't exhibit it in any of them (NEC) with no statistically significant differences in implantation rates (42.2% vs 44.4%). The implantation rate was significantly higher in the EC patients compared with NEC patients in the non elective single embryo transfers (23.1% vs 9.1%; $p < 0.1$). **Conclusions:** In single embryo transfers, occurrence of EC is a good prognosis factor related to embryo's implantation potential. In eSET patients, EC only predicts the embryo's developmental potential, whereas in non elective single embryo transfers (neSET) the implantation rate is higher when transferred embryos exhibited EC.

Key words: Early cleavage, single embryo transfer, EC, SET.

INTRODUCCIÓN

En los ciclos de fecundación in vitro, el embriólogo ha de seleccionar para la transferencia el mínimo número de embriones que permita la mejor tasa de embarazo minimizando el riesgo de embarazo múltiple. Este tipo de embarazos generan complicaciones médicas, tanto para la madre como para los fetos así como problemas de índole social y económica [1]. La tasa de embarazo gemelar espontáneo se sitúa alrededor del 1.3%, mientras que es 20 veces mayor tras tratamientos de Fecundación in Vitro (FIV). Por otra parte, la tasa de embarazo triple espontáneo se sitúa alrededor del 0.017% y se multiplica por 400 tras FIV [2]. La elevada tasa de embarazo múltiple (22.7%) [3] se debe a la práctica habitual de transferir más de un embrión para maximizar las posibilidades de éxito del ciclo. En los últimos años la disminución del número de embriones transferidos a cada paciente ha resultado en una disminución del número de embarazos triples sin disminuir la tasa embarazo global [4]. Sin embargo, en aquellos centros en los que la transferencia de dos embriones es la práctica habitual, la tasa de embarazo gemelar se mantiene alrededor del 21.7% [5]. La transferencia selectiva de un único embrión (eSET) ha demostrado ser un método efectivo para reducir la incidencia de embarazos gemelares en ciclos de FIV sin reducir la tasa de embarazo [5-7]. Se define como la transferencia de un único embrión en

aquellos casos en que se podrían transferir dos o más embriones. En nuestro centro, es una técnica que se aplica a pacientes de buen pronóstico (menores de 35 años con embriones de calidad óptima) [8]. El éxito en la transferencia selectiva de un único embrión depende en gran medida de la selección del embrión de mejor calidad para transferir. Los métodos para valorar la calidad embrionaria han de ser métodos no invasivos y rápidos para no dañar a los embriones. El método más habitual para evaluar la calidad embrionaria es su valoración morfológica: el número de células, simetría y porcentaje de fragmentos citoplasmáticos en el día de la transferencia [9,10]. Otros criterios incluyen la morfología ovocitaria [11], la morfología pronuclear en el estadio de cigoto [12,13] y el cultivo hasta blastocisto [14].

La valoración de la división temprana (early cleavage - EC) o tiempo de la primera división mitótica (aproximadamente 26 horas tras la inseminación) [15] ha demostrado tener valor predictivo en las tasa de embarazo tras Fecundación in Vitro convencional [16] y microinyección intracitoplasmática (ICSI) [17]. Es una técnica de fácil implementación en la rutina de un laboratorio debido a que no es necesario equipamiento adicional y está libre de subjetividad a diferencia de la valoración ovocitaria, pronuclear o embrionaria en estadios más avanzados.

El objetivo del presente estudio, es establecer correlaciones entre la observación de división temprana

del embrión con su capacidad de desarrollo y morfología y con su potencial de implantación. Por otra parte, se analiza la morfología y capacidad de desarrollo de toda la cohorte de embriones de las pacientes estudiadas. Se analizan los datos de morfología embrionaria en función de la ocurrencia a o no de división temprana (pacientes EC vs. pacientes NEC) y en transferencias selectivas (eSET) y no selectivas (neSET).

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se recogieron retrospectivamente los datos de 251 ciclos de FIV e ICSI con transferencia de un único embrión, tanto selectivas como no selectivas, que se realizaron entre los años 2003 al 2006 en el Servicio de Medicina de la Reproducción del Institut Universitari Dexeus, no incluyendo ciclos con diagnóstico genético preimplantacional o cultivo largo de embriones. La selección del embrión a transferir se basó en la morfología del embrión el día de la transferencia, no en el estado de la división temprana.

Estimulación de la ovulación

La inhibición de la producción endógena de gonadotropinas se llevó a cabo mediante un protocolo con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), tras lo cual se administraron gonadotropinas para estimular la ovulación. La respuesta ovárica se monitorizó a partir del 6º día de administración mediante determinaciones sanguíneas de estradiol y ecografías transvaginales para controlar el tamaño folicular. La administración de 10000 UI de hormona gonadotrópica coriónica (hCG) se llevó a cabo 36 horas antes de la recuperación ovocitaria mediante punción ecográfica transvaginal.

Valoración de la calidad embrionaria

Se recuperaron un total de 2953 ovocitos, de los cuales 2277 fueron MII, se inseminaron un total de 2441 ovocitos, 644 mediante inseminación convencional (FIV) y 1797 mediante ICSI. La observación de los embriones se realizó en un microscopio invertido con óptica de Nomarski, minimizando el tiempo de observación para preservar la temperatura y pH del medio de cultivo.

A las 18.5 ± 0.9 horas post-inseminación se evaluó la fecundación, considerando un cigoto normal

aquel que presentaba 2 pronúcleos (PN) y 2 corpúsculos polares (CP).

La valoración de la división temprana se realizó a las $26,7 \pm 0,9$ horas post-inseminación. Los embriones se clasificaron en tres grupos, según presentasen aún pronúcleos visibles, desaparición de los pronúcleos o habían realizado ya la primera división mitótica (división temprana). En los embriones con división temprana se valoró la simetría entre blastómeros, fragmentación citoplasmática y número de núcleos por célula.

A las $43,7 \pm 1,4$ horas post-inseminación en día+2 y a las $70,2 \pm 1,2$ horas post-inseminación en día+3 se evaluó la calidad embrionaria según el número de blastómeros y simetría entre ellos, grado de fragmentación y presencia de blastómeros multinucleados y se les asignó un score embrionario según los criterios del Institut Universitari Dexeus (Tabla 1). Este score se utilizó tanto para elegir los embriones óptimos para ser transferidos como para decidir qué embriones congelar. Mediante este score y teniendo en cuenta el número de embriones óptimos y la edad de la mujer se decide cuantos embriones transferir [8]. Los embriones considerados de calidad óptima son aquéllos que presentan un score ≥ 8 , presentando 4 ó 6 blastómeros en día+2 y día+3 respectivamente, de tamaño similar, sin multinucleación y con $< 20\%$ de fragmentos. Los embriones de buena calidad presentaban 2-4 blastómeros en día+2 y 4-6 blastómeros en día+3, sin multinucleación, de tamaños diferentes ó con una fragmentación $\geq 20\% - < 30\%$. Los embriones de mala calidad presentaban menos de dos blastómeros en día+2 ó menos de 4 blastómeros en día+3, ó bien presentaban multinucleación, una fragmentación $\geq 30\%$ o se trataba de embriones noevolutivos.

Se establecen correlaciones entre la observación de división temprana del embrión y su capacidad de desarrollo y morfología, así como con su potencial de implantación en 251 transferencias únicas. Por otra parte, se analiza la morfología y capacidad de desarrollo de toda la cohorte de embriones de las pacientes estudiadas (1751 embriones). Se analizan los datos de morfología embrionaria en función de la ocurrencia a o no de división temprana (pacientes EC vs. pacientes NEC) y en transferencias selectivas (eSET) y no selectivas (neSET).

Transferencia de un único embrión (SET)

Las transferencias se llevaron a cabo en día+2 o día+3 por vía vaginal guiada por ecografía abdominal y sin anestesia [18]. Se tuvieron en cuenta las transferencias de un único embrión tanto selectivas como no

Tabla 1
Score embrionario del Institut Universitari Dexeus

Número	Día +2 ≥ 4 < 4	Día +3 ≥ 6 < 6	Score 6 2
Tamaño y forma	Simétricas y regulares Un poco asimétricas y/o irregulares Asimétricas y/o irregulares		1 0 -1
% Fragmentación	< 10% 10% - < 20% 20% - < 30% ≥30% - < 50% 50%		3 2 1 0 -1
Multinudeación	Siempre		-2

selectivas. Las transferencias de un único embrión selectivas (eSET) se realizan sólo en aquellas pacientes de buen pronóstico. Según el Score de Embarazo Múltiple (S.E.M.) del Institut Universitari Dexeus [8], se transfiere un embrión a aquellas pacientes que tienen menos de 30 años y al menos un embrión óptimo (score ≥ 8), entre 30-32 años y al menos 2 embriones de calidad óptima ó entre 33-34 años y al menos tres embriones de calidad óptima. El criterio para la selección del embrión a transferir se basó en la morfología del embrión el día de la transferencia, no en el estado de la división temprana. Los embriones no transferidos y evolutivos se congelaron en día+2 y día+3. Las transferencias de un único embrión no selectivas se realizaron en aquellas pacientes en las que el día de la transferencia únicamente se disponía de un embrión evolutivo.

Determinación de la tasa de embarazo clínico

El embarazo se determinó según el valor de la βHCG 14 días tras la transferencia. El embarazo clínico se confirmó por ultrasonografía a las 6-8 semanas de amenorrea, se monitorizó a las 12-16 semanas [18].

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, a los datos cualitativos se les aplicó el test de la χ^2 o el test de Fisher cuando las medidas muestrales lo permitieron, mientras que para el análisis de las variables cuantitativas se utilizó el test de T-Student o ANOVA, considerando que los datos presentan diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se recogieron los datos de 251 transferencias de un único embrión (SET), así como los datos correspondientes a 1751 embriones.

Características de los embriones

De los 1751 embriones, 627 (35,8 %) presentaron división temprana (EC). La tabla 2 recoge la morfología embrionaria y la capacidad de desarrollo de los embriones según las características del embrión a las ≈ 26 h post-inseminación. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de embriones EC evolutivos frente a los embriones con desaparición de pronúcleos y con pronúcleos visibles (82,8% vs 65,8% vs 57,4%; $p < 0,001$) y en el score de calidad embrionaria ($7,5 \pm 1,9$ vs $6,7 \pm 2,1$ vs $5,3 \pm 2,2$; $p < 0,05$).

Tabla 2

Características de los embriones según presentasen división temprana (EC), desaparición de pronúcleos (NO PN) ó pronúcleos visibles

	n (1751) (%)	Calidad embrionaria	Evolutivos (%)
EC	627 (35,8)	$7,5 \pm 1,9$	82,8
NO PN	600 (34,3)	$6,7 \pm 2,1$	65,8
PN VISIBLES	524 (29,9)	$5,3 \pm 2,2$	57,4
p-valor		$p < 0,05$	$p < 0,0001$

La tabla 3 muestra los datos de calidad embrionaria y tasa de implantación de los embriones transferidos respecto de la división temprana. Se observa que el 48.2 % (121) de las transferencias fueron de embriones que presentaron división temprana frente a un 27.4 % de los casos (69) en que se transfirieron embriones que no presentaron división temprana pero si desaparición de pronúcleos y el 24.3 % de los casos en que se transfirieron embriones en los que aún eran visibles los pronúcleos. Se observaron diferencias significativas en la tasa de implantación los embriones EC transferidos frente a los no PN y PN visibles (38.8% vs 24.6% vs 13.1%; p<0.001) y en cuanto a la calidad media del embrión transferido (p<0.05).

Tabla 3

Características de los embriones transferidos según presentasen división temprana (EC), desaparición de pronúcleos (NO PN) ó pronúcleos visibles (PN)

	n (251) (%)	Calidad embrionaria	Implantación (%)
EC	121 (48.2)	8.5 ±1.6	38.8
NO PN	69 (27.5)	7.2±2.1	24.6
PN VISIBLES	61 (24.3)	5.4±2.5	13.1
p-valor		p<0.05	p<0.001

Características de las pacientes

La tabla 4 resume las características de las pacientes a las que se les realizó transferencia de un único embrión así como los resultados en cuanto a tasa de fecundación e implantación en función de si tenían algún embrión que mostrase división temprana (EC) o si ninguno de sus embriones presentaba división temprana (NEC). Los resultados muestran diferencias significativas entre estos dos grupos de pacientes respecto a edad, nivel de estradiol el día de la hCG, nº de folículos, nº de ovocitos recuperados, nº de ovocitos en estadio MII recuperados, tasa de fecundación y tasa de implantación. Las pacientes que tenían algún embrión que presentaba división temprana (EC) son pacientes de mejor pronóstico, significativamente más jóvenes (32.3 ± 4.1 vs 37.1 ± 4.5; p< 0.005), con un número significativamente mayor de ovocitos maduros recuperados (12.6±6.4 vs 3.5±3.6; p<0.005) y mejores tasas de fecundación (75.8% vs 55.25%; p<0.05) e implantación (39.0% vs 13.4%; p<0.0001).

Debido a las grandes diferencias observadas entre el grupo de pacientes que presentaban algún embrión

Tabla 4
Características de las pacientes con algún embrión con división temprana (EC) y sin embriones con división temprana (NEC)

	n (251)	Edad	Estradiol	Folículos	Ovocitos	MII	Tasa fecundación	Tasa implantación
Pacientes EC	154 (61.4)	32.3 ± 4.1	2677.9±1609.6	12.6±5.9	16±8.0	12.6±6.4	75.8%	39.0%
Pacientes NEC	97 (38.6)	37.1 ± 4.5	1258.9±838.8	5.2±4.2	5.0 ±(4.9)	3.5±3.6	55.25%	13.4%
p-valor		p< 0.005	p< 0.005	p< 0.005	p< 0.005	p< 0.005	p<0.05	p<0.0001

con división temprana y el grupo de pacientes que no presentaba división temprana en ninguno de sus embriones, se dividió a las pacientes en dos grupos según se hubiera llevado a cabo transferencia selectiva de un único embrión (eSET) o transferencia no selectiva de un único embrión (neSET).

Características de las pacientes eSET

La tabla 5 recoge las características de las pacientes así como los resultados en cuanto a tasa de fecundación e implantación de las pacientes a las que se les realizó transferencia selectiva de un único embrión (eSET). El 93.4% de estas pacientes presentaron división temprana en alguno de sus embriones y no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados.

Tabla 5

Características de las pacientes a las que se les realizó transferencia selectiva de un único embrión (eSET) según presentasen algún embrión con división temprana (EC) ó no (NEC).

	n (137) (%)	Edad	Estradiol	Folículos	Ovocitos	MII	Tasa fvcundación	Tasa implantación
Pacientes EC	128 (93.4)	31.3 ± 2.9	2935.6 ± 1580.3	14.2 ± 5.1	18.3 ± 6.4	14.5 ± 5.2	77.9%	44.4%
Pacientes NEC	9 ± 6.6)	31 ± 3.4	2826.1 ± 1240	12.3 ± 5.6	15.7 ± 6.1	11.2 ± 5.4	76.7%	42.2%
p-valor		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Características de los embriones de las pacientes eSET

En cuanto a los embriones de las pacientes a las que se les realizó eSET (Tabla 6) se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al score medio de calidad embrionaria en función de si los embriones a las aproximadamente 26 horas post-inseminación presentaban división temprana, desaparición de pronúcleos ó pronúcleos visibles respectivamente ($7 \pm 2,5$ vs $5,6 \pm 3,2$ vs $4,3 \pm 2,9$; $p < 0,001$). El porcentaje de embriones evolutivos en el caso de embriones EC fue de un 82.3% frente a un 66.6% en embriones que presentaban desaparición de pronúcleos y un 55.8% en aquellos embriones con pronúcleos visibles ($p < 0,001$). Los embriones que presentan mejor calidad embrionaria y potencial evolutivo son los embriones en los que se observa EC.

La tabla 7 muestra los datos de calidad embrionaria y tasa de implantación de los embriones transferi-

Tabla 6

Características de los embriones de las pacientes eSET según presentasen división temprana (EC), desaparición de pronúcleos (NO PN) ó pronúcleos visibles (PN)

	n (1586) (%)	Calidad embrionaria	Evolutivos (%)
EC	599 (37,8)	$7 \pm 2,5$	82,8
NO PN	533 (33,6)	$5,6 \pm 3,2$	66,6
PN VISIBLES	454 (28,6)	$4,3 \pm 2,9$	55,8
p-valor		$p < 0,001$	$p < 0,001$

Tabla 7

Características de los embriones transferidos a las pacientes eSET según presentasen división temprana (EC), desaparición de pronúcleos (NO PN) ó pronúcleos visibles (PN).

	n (137) (%)	Calidad embrionaria	Implantación (%)
EC	95 (69,3)	$8,8 \pm 1,0$	43,2
NO PN	29 (21,2)	$8,8 \pm 0,4$	48,3
PN VISIBLES	13 (9,5)	$8,3 \pm 0,6$	23,1
p-valor		n.s.	n.s.

dos a las pacientes eSET respecto de la división temprana. De los 137 embriones transferidos, el 69.3% (95) fueron embriones que habían presentado división temprana, resultando en un porcentaje de implantación del 43.2%, el 21.2% (29) corresponde a transferencias de embriones con desaparición de pronúcleos, con implantación del 48.3% y el 9.5% (13) corres-

ponde a embriones con pronúcleos visibles y con una tasa de implantación del 23.1%. No se observaron diferencias significativas en la tasa de implantación.

Características de las pacientes neSET

La tabla 8 recoge las características de las pacientes a las que se les realizó transferencia única no selectiva así como los resultados en cuanto a tasa de fecundación e implantación en función de si presentaban división temprana en alguno de sus embriones (EC) o no la presentaban en ninguno de sus embriones. En este caso únicamente el 22.8% de las pacientes presentó división temprana en alguno de sus embriones (pacientes EC), observándose un número significativamente mayor de ovocitos recuperados ($4,7 \pm 4,8$ vs $4 \pm 3,2$; $p < 0,05$) y ovocitos MII ($3,5 \pm 3,6$ vs $2,6 \pm 2,1$; $p < 0,05$). Estas pacientes presentaron una tasa de implantación del 23,1% frente al

Tabla 8

Características de las pacientes a las que se les realizó transferencia no selectiva de un único embrión (neSET) según presentasen algún embrión con división temprana (EC) ó no (NEC)

	n (114) (%)	Edad	Estadiol	Folículos	Ovocitos	MII	Tasa fecundación	Tasa implantación
Pacientes EC	26 (22.8)	37.3 ± 5.4	1318 ± 978.6	4.9 ± 3.6	4.7 ± 4.8	3.5 ± 3.6	39.8%	23.1%
Pacientes NEC	88 (77.2)	37.8 ± 4.1	1108.4 ± 598.7	4.5 ± 3.2	4 ± 3.2	2.6 ± 2.1	46.5%	9.1%
p-valor		n.s.	n.s.	n.s.	$p < 0.05$	$p < 0.05$	n.s.	$p < 0.1$

9.1% ($p < 0.1$) de las pacientes que no presentaron división temprana en ninguno de sus embriones.

Características de los embriones de las pacientes neSET

De los 165 embriones de las pacientes a las que se les realizó transferencia única no selectiva, únicamente el 16.9% (28) presentaron división temprana con un score medio de calidad embrionaria significativamente mayor que el de los embriones que a las 26 horas presentaban desaparición de pronúcleos ó pronúcleos visibles ($6.8 \pm 2.7^*$ vs 3.3 ± 3.3 vs 3.6 ± 2.9 ; $*p < 0.05$) El 92.9% de los embriones EC fueron evolutivos (Tabla 9).

De los 114 embriones transferidos 26 presentaron división temprana (22.8%), resultando en una tasa de implantación del 23.1% frente al 7.5% en el caso de embriones con desaparición de pronúcleos y 10.4% en el caso de embriones con PN visibles (n.s.) (Tabla 10)

Tabla 9

Características de los embriones de las pacientes neSET según presentasen división temprana (EC), desaparición de pronúcleos (NO PN) ó pronúcleos visibles (PN).

	n (165) (%)	Calidad embrionaria	Evolutivos (%)
EC	28 (16,9)	$6,8 \pm 2,7^*$	92,9
NO PN	67 (40,6)	$3,3 \pm 3,3$	59,7
PN VISIBLES	70 (42,4)	$3,6 \pm 2,9$	68,7
p-valor		$*p < 0,05$	$p < 0,1$

Tabla 10

Características de los embriones transferidos a las pacientes neSET según presentasen división temprana (EC), desaparición de pronúcleos (NO PN) ó pronúcleos visibles (PN)

	n (114) (%)	Calidad embrionaria	Implantación (%)
EC	26 (22,8)	$7,1 \pm 2,3$	23,1
NO PN	40 (35,1)	$6,0 \pm 2,2$	7,5
PN VISIBLES	48 (42,1)	$4,7 \pm 2,2^*$	10,4
p-valor		$*p < 0,05$	n.s.

DISCUSIÓN

Hay muchos factores que influyen el resultado de un ciclo de FIV, como son la respuesta a la estimu-

lación, la receptividad endometrial, la madurez ovocitaria o las condiciones de cultivo, pero sin duda, la calidad embrionaria es uno de los parámetros fundamentales. Se han llevado a cabo muchos estudios para tratar de encontrar un sistema óptimo de valoración de la calidad embrionaria. Un sistema de valoración ideal comenzaría en el ovocito, continuaría en el estadio de cigoto con la valoración pronuclear y división temprana y concluiría con la selección morfológica en el estadio de 4-6 células o en el estadio de blastocisto. La valoración de la división temprana es una técnica de fácil implementación en la rutina de un laboratorio de FIV, ya que no es necesario más equipamiento para llevarla a cabo y está libre de subjetividad, a diferencia de la valoración ovocitaria, pronuclear o embrionaria en estadios más avanzados.

La mayoría de los estudios que se han llevado a cabo sobre el valor predictivo de la división temprana incluían la transferencia de más de un embrión cuando no todos habían presentado división temprana, no pudiendo atribuir con certeza la implantación al embrión EC [16, 17, 19, 20, 21]. Muchos de estos estudios sugieren que la valoración de la división temprana se relaciona con un mayor potencial de implantación de los embriones; sin embargo el valor predictivo de la división temprana todavía está en debate. Estudios en los cuales se llevaron a cabo transferencias de embriones únicos apoyan la división temprana como una herramienta útil en la selección de embriones de buena calidad [22-25], aunque otros [26] sugieren que la valoración de la división temprana no mejora la tasa de embarazo en transferencias únicas. Los datos presentados en este estudio analizan el valor predictivo de la división temprana en transferencias únicas de un embrión permitiendo establecer correlaciones concluyentes respecto de la calidad embrionaria y de la tasa de implantación.

Los resultados del presente estudio muestran una frecuencia de división temprana del 35,8% (no pronúcleos: 34,3%; pronúcleos visibles: 29,9%). Esta frecuencia está en concordancia con otros estudios en los cuales se estudia el valor predictivo de la división temprana en transferencias únicas y que muestran frecuencias de división temprana del 26,3% [22], 39% [23] y 32,2% [26]. Los embriones que presentan división temprana tienen una mejor calidad y un mayor potencial evolutivo que los embriones que a las 26 horas post-inseminación no se han dividido o muestran las estructuras pronucleares. Algunos autores [27] han sugerido que la razón por la cual la calidad de los embriones que presentan división temprana es mejor se debe a que son embriones que provienen de ovocitos que sufrieron un proceso de maduración nu-

clear y citoplasmática más sincronizado y/o mejor metabolismo, presentando una mayor disponibilidad y competencia de ATP, mRNA y mitocondrias. La primera división mitótica distribuye los componentes ovocitarios a los dos blastómeros resultantes y una distribución incorrecta y desigual de ciertos productos génicos o componentes citoplasmáticos en las células puede afectar al futuro desarrollo del embrión. Otros autores sugieren que la división temprana puede estar relacionada con factores paternos debidos a la contribución de los centriolos del espermatozoide [28] o a la sincronización de los genomas paterno y materno [29]. La fecundación es un proceso que incluye múltiples pasos, como son la penetración del espermatozoide en el ovocito, la activación ovocitaria, la reorganización de la cromatina introducida por el espermatozoide, la formación de los pronúcleos y el establecimiento del cigoto para comenzar la primera división mitótica. El tiempo necesario para estos acontecimientos varía entre los embriones que presentan división temprana y aquéllos que no la presentan. Algunos estudios demuestran que el timing de la cascada de eventos que ocurren desde la rotura pronuclear hasta el inicio de la división mitótica son predictivos de la formación de embriones de buena calidad [30, 31]. Se ha demostrado que embriones que presentan división temprana tienen más posibilidades de llegar al estadio de blastocisto que aquéllos que no la presentan [32, 33]. La división temprana sería un marcador útil del potencial de desarrollo embrionario hasta estadios de blastocisto al igual que un criterio adicional para la selección de embriones de buena calidad para transferir o congelar. Algunos autores [34, 35] han demostrado que los embriones que presentan rotura temprana de los pronúcleos tienen tendencia a un mayor score de calidad embrionaria y mejor pronóstico que los que aún presentan pronúcleos visibles.

Según nuestros resultados, en las transferencias de un sólo embrión (SET=eSET+neSET), la tasa de implantación es significativamente más alta cuando el embrión transferido presentaba división temprana en comparación con embriones no PN o con PN visibles (38,8%; 24,6%; 13,1 respectivamente, $p < 0,001$). Estos resultados están en concordancia con los resultados de estudios previos con transferencias selectivas de un único embrión en los cuales se reportaban tasas de implantación significativamente superiores en embriones EC frente a embriones no EC; 50% vs 26,4% [22], 46% vs 18% [23], 49,4% vs 33,3% [24]. A pesar de que en nuestra práctica la presencia de división temprana no es un criterio a tener en cuenta para la selección del embrión a transferir, casi un 50% de los

embriones transferidos presentaba división temprana. La calidad embrionaria y el potencial evolutivo de un embrión se han correlacionado con su capacidad de implantación siendo por tanto los embriones con división temprana los de mejor pronóstico de cara a obtener una gestación.

Analizando las características de las pacientes a las que se les realizó transferencia de un único embrión, los resultados del presente estudio muestran que las pacientes en las que no se observa división temprana son mujeres de edad significativamente más avanzada, con peor respuesta al tratamiento y con una tasa de implantación significativamente más baja. La división tardía se ha observado frecuentemente en mujeres de edad avanzada [33, 36, 37], lo cual puede ser indicativo de defectos en el citoplasma y/o anomalías cromosómicas de los ovocitos. La calidad de los ovocitos estaría comprometida en estas pacientes, lo que justificaría también una disminución en la tasa de fecundación. Por otra parte, estudios previos [38, 39], muestran una tasa de aneuploidía mayor en embriones que presentan una baja tasa de división mitótica, dando lugar a bajas tasa de implantación y embarazo.

El análisis de las características de las pacientes a las que se les realizó eSET no muestra diferencias entre las pacientes del grupo de división temprana y aquellas en las que ninguno de sus embriones mostraba división temprana. Tampoco se observaron diferencias en la tasa de implantación de estos dos grupos. Se trata de pacientes de buen pronóstico, en las que en más del 90% de los casos alguno de los embriones presentaba división temprana (tabla 5). También en este grupo de pacientes la presencia de división temprana se correlaciona con una mejor calidad embrionaria y un mayor potencial evolutivo.

En las transferencias únicas selectivas (eSET), en los dos grupos de pacientes (EC/noEC) se transfiere un único embrión de calidad óptima en d+2 y d+3, no observándose un aumento de la tasa de implantación en el grupo de pacientes con división temprana. A pesar de que la media de calidad embrionaria de los embriones transferidos no difiere entre EC, no PN y PN visible hay una tendencia a una tasa de implantación más baja en el caso de observarse los PN a las 26 horas post-inseminación, no llegando a ser significativa posiblemente debido al bajo número de casos en los que se ha transferido un embrión que a las 26 horas post-inseminación presentaba PN visibles. Dado que en las pacientes eSET casi el 70% de los embriones presenta división temprana a las $26,7 \pm 0,9$ horas post-inseminación (tabla 7) cabría considerar la posibilidad de llevar a cabo observaciones más precoces a

las 24 horas post-inseminación con el fin de detectar cigotos que presentan un mayor potencial de desarrollo con una división embrionaria precoz. Un estudio en el que se analiza el patrón temporal de la síntesis de DNA previa a la primera división mitótica en 72 embriones humanos donados [40], evidencia que a las 20 horas post-inseminación, el 89% de los cigotos presenta pronúcleos visibles, mientras que a las 24 horas el 41% no presentan pronúcleos visibles y el 5% han realizado la primera división mitótica. De acuerdo con nuestros datos y los datos de la literatura parecería que los embriones que a las 24 horas post-inseminación ya han realizado la primera división mitótica serían los de mejor pronóstico.

Los resultados de nuestro estudio muestran que en las transferencias selectivas de un embrión (eSET), la división temprana predice únicamente la calidad embrionaria y el potencial evolutivo de los embriones, sin reflejo en la tasa de implantación. El hecho de realizar la observación de la división temprana a las 24 horas post-inseminación en lugar de a las 26 horas post-inseminación permitiría una detección de los embriones con división temprana precoz que presentarían probablemente un mayor potencial implantatorio.

Analizando las características de las pacientes a las que se les realizó transferencia no selectiva de un único embrión se ve que se trata de pacientes de peor pronóstico en las que únicamente en el 23% de los casos alguno de los embriones presentaba división temprana (tabla 8). Sin embargo, en el grupo de las pacientes neSET, las pacientes con algún embrión con división temprana muestran una tendencia a una mayor tasa de implantación que aquellas en las que no se observa división temprana en ninguno de sus embriones.

En las pacientes neSET únicamente el 17% de los embriones presentaron división temprana. La división temprana se relaciona también en este grupo con la calidad embrionaria. Se observa una clara tendencia a una disminución de la tasa de implantación cuando se comparan los grupos de EC con los de no PN y PN visibles. En este grupo de pacientes, el EC constituye una buena herramienta para predecir el potencial de implantación pero no para la selección embrionaria ya que se trata de transferencias únicas no selectivas.

En conclusión, este estudio confirma los resultados de estudios previos que demuestran que la división temprana es un parámetro indicativo del potencial evolutivo e implantatorio del embrión. Nuestros resultados no evidencian la utilidad de la detección de la división temprana en transferencias selectivas de un único embrión cuando ésta se lleva a cabo a las 26 horas post-inseminación. Se propone la observa-

ción de la división temprana a las 24 horas post-inseminación en lugar de la las 26 horas para discriminar más y elegir los embriones más precoces. Serían necesarios estudios con mayor nº de pacientes/embriones para establecer el valor de la observación de la división temprana para la selección de embriones.

AGRADECIMIENTOS

A Nacho Rodríguez por su ayuda con el análisis estadístico de los datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. **The ESHRE Capri Workshop Group.:** Multiple gestation pregnancy. *Hum Reprod* 2000; 15: 1856-1864.
2. **Callahan TL, Hall JE, Ettner SL, Christiansen CL, Green MF, Crowley WF Jr.:** The economic impact of multiple gestation pregnancies and the contribution of assisted-reproduction techniques to their incidence. *N Engl J Med* 1994; 331: 244-249
3. **Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, et al.:** European IVF-monitoring (EIM) Consortium; ESHRE. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008, 23(4):756-71
4. **Ludwig M, Schöper B, Katalanic A, Sturm R, Al-Hasani S, Diedrich K.:** Experience with the elective transfer of two embryos under the conditions of the German embryo protection law: results of a retrospective data analysis of 2573 transfer cycles. *Hum Reprod* 2000; 15: 319-352
5. **Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, et al.:** Elective single embryo transfer versus double-embryo transfer in in-vitro fertilization. *N Engl J Med* 2004; 351: 2392-2402
6. **Veleva Z, Vilska S, Hydén-Granskog C, Tiitinen A, Tapanainen JS, Martikainen H.:** Elective single embryo transfer in women aged 36-39 years. *Hum Reprod* 2006; 21(8): 2098-102
7. **Moustafa MK, Sheded SA, El Aziz Moustafa MA.:** Elective single embryo transfer versus double embryo transfer in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(1): 82-7
8. **Aurell R, Tur R, Torelló MJ, Coroleu B, Barri PN.:** Clinical strategies to avoid multiple pregnancies in assisted reproduction. *Gynecol Endocrinol.* 2006; 22(9): 473-8
9. **Giorgetti C, Terriou P, Auquier, Hans E, Spach JL, Salzmann J, et al.:** Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod* 1995; 10: 2427-2431
10. **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. *Hum Reprod* 1997; 12(7): 1545-1549
11. **Ebner T, Moser M, Tews G.:** Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? *Reprod Biomed Online* 2006;12(4):507-12
12. **Scott LA and Smith S.:** The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998; 13: 1003-1013
13. **Tesarik J and 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
14. **Janny L and Menezo YJ.:** Maternal age effect on early human embryonic development and blastocyst formation. *Mol Reprod Dev* 1996; 45(1):31-7
15. **Edwards RG, Fishel SB, Choen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al.:** Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1984; 1(1): 3-23
16. **Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D.:** Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod* 1997; 12(7): 1531-6
17. **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. *Hum Reprod* 1998; 13 (1): 182-187
18. **Coroleu B, Barri P, Carreras O, Belil I, Buxaderas R, Veiga A et al.:** Effect of using an echogenic catheter for ultrasound-guided embryo transfer in an IVF programme: a prospective, randomized, controlled study. *Hum Reprod* 2006; 21(7): 1809-15.
19. **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. *Fertil Steril* 2001; 76(6):1150-6
20. **Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN.:** Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16(12): 2658-61
21. **Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY.:** Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76(3): 293-7.
22. **Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T.:** Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod* 2003; 18(4): 821-5.
23. **Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers**

- JL.:** Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod* 2004; 19(9): 2103-8.
24. **Giorgetti C, Hans E, Terriou P, Salzmann J, Barry B, Chabert-Orsini V, et al.:** Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(1): 85-91.
 25. **Terriou P, Giorgetti C, Hans E, Salzmann J, Charles O, Cignetti L, et al.:** Relationship between even early cleavage and day 2 embryo score and assessment of their predictive value for pregnancy. *Reprod Biomed Online* 2007; 14(3): 294-9
 26. **Emiliani S, Fasano G, Vandamme B, Vannin AS, Verdoodt M, Biramane J, et al.:** Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod Biomed Online* 2006; 13(2): 255-60
 27. **Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M.:** Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. *Fertil Steril* 2006; 85(2): 358-65.
 28. **Palermo G, Munné S, Cohen J.:** The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod* 1994; 9(7): 1220-5.
 29. **Boiso I, Veiga A, Edwards RG.:** Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod Biomed Online* 2002; 5(3): 328-50.
 30. **Miller KF, Sinoway CE, Fry KL, Falcone T.:** Early cleavage of zygotes indicative of the inherent development potential of the cohort. *Fertil Steril* 2001; 76(Suppl 1): S 125-6
 31. **Lechniak D, Pers-Kamczyc E, Pawlak P.:** Timing of the first zygotic cleavage as a marker of developmental potential of mammalian embryos. *Reprod Biol* 2008; 8(1): 23-42.
 32. **Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M.:** Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Repro* 2002; 17: 407-412.
 33. **Lundin K, Bergh C, Hardarson T.:** Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 2652-2657.
 34. **Hammoud I, Vialard F, Casasnovas P, Lefebvre G, Vauthier-Brouzes D, Poirot C.:** How viable are zygotes in which the PN are still at 25 hours? Impact on the choice of embryo for transfer. *Fertil Steril* 2008; 90(3): 551-6.
 35. **Wharf E, Dimitrakopoulos A, Khalaf Y, Pickering S.:** Early embryo development is an indicator of implantation potential. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(2): 212-8
 36. **Ciray HN, Ulug U, Bahçeci M.:** Transfer of early-cleaved embryos increases implantation rate in patients undergoing ovarian stimulation and ICSI-embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(2): 219-23
 37. **Ciray HN, Karagenc L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M.:** Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2005; 84(5):1411-6.
 38. **Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K.:** Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16(2): 313-8
 39. **Luna M, Copperman AB, Duke M, Ezcurra D, Sandler B, Barritt J.:** Human blastocyst morphological quality is significantly improved in embryos classified as fast on day 3 (≥ 10 cells), bringing into question current embryological dogma. *Fertil Steril* 2008; 89(2): 358-63.
 40. **Balakier H, MacLusky NJ, Casper RF.:** Characterization of the first cell cycle in human zygotes: implications for cryopreservation. *Fertil Steril* 1993; 59(2): 359-65.