



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA
"ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES"**

SUBDIRECCIÓN DE MEDICINA REPRODUCTIVA

**ELABORACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN
INSTRUMENTO PARA EVALUAR MARCADORES
MORFOLÓGICOS DEL DESARROLLO DEL EMBRIÓN
PRE IMPLANTATORIO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
**ESPECIALIALISTA EN BIOLOGÍA
DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA**
PRESENTA
DRA. GABRIELA CÁRDENAS AMARO

DR. GREGORIO PÉREZ PALACIOS
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN HUMANA

DR. JUAN GERARDO BARROSO VILLA
DIRECTOR DE TESIS

DRA. LUZ MARÍA DE REGIL VÉLEZ
ASESOR



INPer

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorización de tesis

ELABORACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN INSTRUMENTO PARA EVALUAR
MARCADORES MORFOLÓGICOS DEL DESARROLLO DEL EMBRIÓN PRE
IMPLANTATORIO

Dr. Enrique Gómez Sánchez
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

Dr. Gregorio Pérez Palacios
PROFESOR TITULAR DEL CURSO

Dr. Gerardo Barroso Villa
DIRECTOR DE TESIS

Dra. Luz María De Regil Vélez
ASESOR METODOLÓGICO

DEDICATORIA

A mis padres por darme la vida y
el digno ejemplo de un familia...

A mis hermanos por su inagotable energía
y por estar siempre a mi lado...

A mis amigos por sus sabios consejos
y su apoyo incondicional...

A mi amor por estar tan cerca a pesar de la distancia.
y hacer de mi vida una lección diaria...

A Dios por enseñarme que lo mejor de la vida llega solo
y que todo tiene una razón de ser...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Nacional de Perinatología por haberme permitido crecer más en el conocimiento de la medicina, específicamente en el área de medicina reproductiva.

Agradezco a todos mis maestros sus esfuerzos y enseñanzas, así como su tiempo y paciencia.

Agradezco a todos mis compañeros, (Edgar, Liz, Juanito, Martín, Cris, Franky, Tito, Pedro, Israel, Jerry y Fer) por su amistad y compañía; agradezco en especial a aquellos a quienes gracias a su esfuerzo desinteresado pude terminar mi tesis. Y un abrazo muy fuerte para aquellos que me levantaban el ánimo por el solo hecho de estar allí y estuvieron aun más cerca en los momentos difíciles.

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Gerardo Barroso, por dedicarme un tiempo entre sus múltiples compromisos en el desarrollo de esta tesis, y por ser un buen amigo, también cuando sus actividades se lo permiten.

Agradezco a Luz Ma por su indispensable y valiosa participación, además de su infinita paciencia y dotes para estimular a la gente a aprender lo que no conoce.

Agradezco a Carlitos por compartir la responsabilidad de este trabajo y estar siempre dispuesto a dar lo mejor.

Agradezco a Rosaura no solo por su participación, si no por toda su nobleza y excelente disposición para que las cosas se lleven a cabo.

Agradezco a mi familia (Carlos César, Miriam, Cristóbal, Alejandro, Eva, Carlos Fernando y Amaranta) por su amor infinito, por todos los desvelos compartidos y los innumerables momentos de alegría.

Agradezco a mis mejores amigos, en especial a Alma y Normita, quienes me conocen tanto, y son testimonio que la verdadera amistad perdura a través del tiempo y la distancia.

Agradezco en especial al hombre que se ha vuelto mi mejor amigo, mi confidente y mi cómplice... Jason, por permitirme ver la vida con otros ojos y tener la paciencia para aceptarme como soy.

Gracias a Dios por permitirme estar aquí y permitirme disfrutar tantas cosas.

"All our dreams can come true, if we have the courage to pursue them." W.D.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Reproducción Asistida	3
Escalas actuales	10
Validación de Escalas	15
Justificación y Planteamiento del problema	19
Objetivos	
General	20
Específicos	20
Hipótesis	20
Material y Métodos	21
Resultados	25
Discusión	30
Conclusiones	37
Anexos	38
Bibliografía	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Grado de comprensión en las definiciones operacionales de ovocitos, cigotos y embrión preimplantatorio.	26
Tabla 2	Diferencias en la comprensión en las definiciones operacionales entre médicos y embriólogos.	27
Tabla 3	Validación de las variables cualitativas dentro del instrumento en el desarrollo embrionario.	28
Tabla 4	Fiabilidad de variables cualitativas en el instrumento en el desarrollo embrionario.	29
Tabla 5	Validez y fiabilidad de variables cuantitativas.	29

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Cuestionario para validar la claridad de los conceptos operacionales para ovocitos, cigotos y embrión preimplantatorio.	39
Anexo 2	Instrumento para valorar las características morfológicas de ovocitos, cigoto y embrión preimplantatorio.	45

RESUMEN EN ESPAÑOL

Objetivo: Elaborar y validar un instrumento para evaluar marcadores morfológicos de fertilización y desarrollo del embrión preimplantatorio.

Material y Métodos: un instrumento de validación operacional fue llevado a cabo con la participación de médicos especialistas en técnicas de reproducción asistida, investigadores metodológicos así como, expertos en el laboratorio de gametos. Este instrumento fue validado con la participación de personal dedicado a la atención de la salud (n=11) en la evaluación de probables marcadores en la fertilización y desarrollo embrionario para la selección de un pre-embrión implantatorio. Esto fue realizado en tres fases: i) definición de conceptos operacionales, ii) evaluación en la comprensión de las definiciones operacionales y iii) validación del instrumento operacional. Los análisis de validez y fiabilidad se realizaron mediante los coeficientes Tau b de Kendall y de Correlación Intraclase.

Resultados: Se elaboraron 23 conceptos relacionados con los parámetros ovocitarios, pronucleares y de morfología embrionaria en día 2, a partir de los cuales se diseñó un cuestionario para valorar el grado de comprensión de cada uno de ellos. Los conceptos ovocitarios, pronucleares y embrionarios tuvieron en promedio 86.9%, 88% y 89% de comprensibilidad respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la comprensión de los conceptos entre médicos y embriólogos (98% vs 80%). A partir de lo anterior, se elaboró un cuestionario de 22 conceptos, en donde las variables cualitativas no mostraron una validez adecuada (0.351) en promedio. Sin embargo, más de la mitad de las preguntas tuvieron un coeficiente Tau (> 0.4) adecuado, en contraparte, la reproducibilidad fue adecuada (Tau = 0.460). La menor validez y reproducibilidad fue observada en la escala de Scott. Las variables cuantitativas mostraron una alta validez y fiabilidad (CCI = 0.81).

Conclusiones: La creación de un instrumento de medición fue factible cuando las definiciones operacionales de ovocitos, cigoto y embrión preimplantatorio fueron expuestos. Tanto las variables cualitativas como las cuantitativas tienen una aplicación real dentro del instrumento de validación.

ENGLISH SUMMARY

Objective: To validate an instrument created to assess the morphological markers for fertilization and embryo development.

Material and Methods: The operational variables were described based on literature, and the experience of 3 physicians, 2 investigators, and 1 embryologist. The degree of understanding of the concepts was measured with a questionnaire which was applied to 5 biologists and 5 physicians. An instrument with these concepts was developed to evaluate morphologic markers in oocytes, zygotes and embryo pictures. This was then applied to 11 evaluators. The tau b and interclass correlation coefficients were used for statistics analysis.

Results: Twenty-three concepts about oocytes, pronuclei and day 2 embryos were described, and a questionnaire was designed to assess the degree of understanding of these concepts. The oocyte concepts had an average understandability of 86.9%. While the pronucleus concepts were at 88% and day 2 embryo concepts were at 89%. On average, physicians showed better understanding of the concepts than biologists (98% versus 80%), with a significant difference ($p < 0.05$). The quantitative variables had a bad validity however, the reliability was appropriated, Tau average = 0.460. The Scott scale showed the smaller validity and reliability. The quantitative variables showed high validity and reliability (ICC = 0.81).

Conclusions: It is feasible to create an instrument to assess morphologic characteristics of the preimplantatory embryo. The qualitative variables have a non appropriate validity, while the quantitative variables have an appropriate validity and reliability.

INTRODUCCIÓN

I. REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Las técnicas en Reproducción Asistida incluyen todos los procedimientos para el tratamiento de la infertilidad en los cuales tanto los espermatozoides como los ovocitos son manipulados. En general, estos procedimientos requieren de la captura de ovocitos, su exposición a los espermatozoides en un medio de cultivo adecuado y su transferencia al útero después de fertilizarlos. Debido al desarrollo sociocultural y al deseo de las mujeres de buscar superación personal y profesional, la búsqueda de embarazo en las parejas actuales es a edades avanzadas. De acuerdo a las estadísticas, el 10% de las mujeres en edad fértil ha tenido por lo menos una consulta en relación a la infertilidad.¹ Por ello y debido al auge de las técnicas avanzadas en reproducción asistida (FIVTE e ICSI), se estima que más de un millón de nacimientos en el mundo ha sido gracias a alguna de estas técnicas.¹

Inicialmente, las técnicas de fertilización *in vitro* se utilizaron casi exclusivamente para infertilidad por causa tubaria, sin embargo, actualmente está indicado en múltiples causas de infertilidad tanto de origen masculino como femenino. El lograr un embarazo con estos procedimientos requiere de un trabajo conjunto entre clínicos y embriólogos. A pesar de ello, en la actualidad, solo 1 de cada 3 ciclos de embriones transferidos resulta en un recién nacido vivo y únicamente, alrededor del 20 al 30% de los embriones transferidos logran implantarse.¹

El objetivo final de estas técnicas es la transferencia de un embrión que cuente con la capacidad de dar un embarazo sano. Por este motivo, se ha intentado encontrar marcadores en el desarrollo embrionario que cumplan con estas condiciones. Desafortunadamente, hasta el día de hoy solo contamos con marcadores morfológicos en las formas tardías del desarrollo embrionario, por lo

que estamos en la espera de marcadores bioquímicos fehacientes que nos permitan la búsqueda de un embrión idóneo³.

Los primeros intentos para este proceso de selección embrionaria fueron llevados a cabo a finales de los años ochenta, en donde el grupo de Lucinda Veeck propone la clasificación embrionaria en etapas avanzadas antes de la transferencia embrionaria. Esta clasificación ha tenido una clara validez cuando la selección embrionaria es requerida en la presencia de embriones múltiples, sin embargo, las tasas de multigestación no han mostrado una mejoría y si por el contrario, siguen siendo un problema en las instituciones de salud⁴.

Recientemente, se han hecho esfuerzos importantes para encontrar marcadores de inicio temprano relacionados con el proceso de fertilización. Algunos investigadores, han identificado características morfológicas en el citoplasma y en los pronúcleos como posibles indicadores de viabilidad en el blastocisto preimplantatorio^{3,5,6}.

El ovocito

El ovocito es la célula sexual femenina que por división meiótica da lugar a una célula haploide, es además portadora del material genético y es capaz de ser fecundada por un espermatozoide para la formación de un cigoto. La ovogonia (célula germinal femenina) inicia la primera división meiótica, momento en el cual se denomina ovocito primario. Eventualmente, este ovocito primario se convertirá en ovocito secundario al completar la primera división meiótica y expulsar el primer cuerpo polar (evento que sucede antes de la ovulación). La segunda división meiótica, solo se completará si ocurre la fertilización, tras lo cual se eliminará el segundo cuerpo polar. La importancia de la meiosis es permitir la recombinación genética al azar, asegurando que se mantenga la máxima diversidad genética y se produzca una célula fertilizable con el número haploide de cromosomas (23 cromosomas)⁷.

Dos estructuras de gran importancia que rodean al ovocito tras la ovulación son la corona radiada y la zona pelúcida. La corona radiada está formada por células de la granulosa que presentan una expansión preovulatoria con el fin de: i) permitir (durante su paso por la zona ampular de la tuba uterina) el aumento de las posibilidades de contacto con alguno de los pocos espermatozoides que logran alcanzar esta región, y ii) permitir el paso del espermatozoide entre sus células hasta el ovocito, sin la liberación precoz de las enzimas acrosomales.⁸ Por otra parte, la zona pelúcida es una capa de glucoproteínas que rodea al ovocito durante la ovulación y permanece hasta la implantación. Posee ligandos para espermatozoides y participa en la reacción de zona para evitar la poliespermia.⁹

Fecundación

El proceso de fecundación consiste en la fusión y penetración del espermatozoide en un ovocito maduro (ovocito en metafase II). Tres horas después de la entrada del espermatozoide, el ovocito completa la meiosis, el segundo cuerpo polar es liberado y el ovocito alcanza el número haploide de cromosomas, que en unión con los cromosomas espermáticos, restaura el número diploide de la especie. Sin embargo, la reunión de los cromosomas maternos y paternos no se realiza inmediatamente, antes tendrá lugar la formación de los dos pronúcleos (masculino y femenino). Comienza entonces la descondensación de los cromosomas maternos y la formación del pronúcleo femenino. La formación del pronúcleo masculino ocurre simultáneamente y de forma completamente distinta. El primer paso es la desaparición de la membrana nuclear seguida por la descondensación de la cromatina y la expansión del núcleo¹⁰. El paso siguiente es la formación de una membrana nuclear a partir del retículo endoplasmático del ovocito. Se forma así, un pronúcleo masculino perfectamente comparable al femenino. La capacidad del citoplasma del ovocito para permitir el desarrollo del pronúcleo masculino depende de la madurez del ovocito. En este punto, el ovocito es una célula binucleada que cuenta con el número normal de cromosomas de la

especie y puede comenzar el ciclo de división celular normal mediante una duplicación de los cromosomas. Después de la replicación del ADN los dos pronúcleos se acercan, sus cromosomas se individualizan, las membranas pronucleares se disgregan y los cromosomas homólogos de los dos pronúcleos se organizan en el centro del huso mitótico. Va a empezar la primera división celular del nuevo individuo.²

El embrión humano en el laboratorio

La evidencia de que hubo fertilización in vitro está dada por la visualización al microscopio de los dos pronúcleos (PN) y de los dos cuerpos polares (CP) 16 a 18 horas después de la co-incubación de ambos gametos, desapareciendo 4 horas después.¹¹⁻¹² Se conoce que después de la fecundación, los cigotos muestran 2PN y 2CP, una forma regular, una zona pelúcida clara e intacta y un citoplasma homogéneo que normalmente es un poco granuloso.¹³ Sin embargo, existen diversos casos en los cuales existen diferencias con la normalidad. Por ejemplo, es posible observar cigotos con un solo pronúcleo debido a un desarrollo asincrónico, que hasta en el 80% de los casos puede tener un desarrollo normal¹⁴. Además, también se puede observar la dispermia (la introducción de dos espermatozoides en un ovocito maduro con la formación de 3 PN y 2 CP) la cual corresponde a la anomalía de la fecundación más frecuente en el humano.¹⁵ Otro ejemplo son los cigotos digínicos, los cuales son monoespérmicos y presentan 3 PN y 1 CP. En este caso, el tercer pronúcleo se forma debido a la no expulsión del segundo CP por parte del ovocito.

Recientemente, se ha encontrado relación entre ciertos patrones pronucleares y el potencial de desarrollo de los embriones obtenidos. Diferentes características pronucleares han sido estudiadas. Dentro de ellas, destacan las siguientes:

- Equicorporalidad de los pronúcleos (igual tamaño de los pronúcleos): Normalmente, existen pequeñas diferencias en el tamaño de los dos pronúcleos, sin embargo, diferencias importantes están asociadas a defectos cromosómicos hasta en un 87% de los casos. Estos cigotos son portadores de una alta tasa de multinucleación en día 2 de desarrollo y mosaicismo en día 3.¹⁶ Se ha demostrado que esta característica pronuclear tiene mayor relevancia que la polaridad en la distribución de los nucleolos.^{6,17}
- Equicorporalidad de los Nucleolos (igual tamaño de los nucleolos): los ovocitos fertilizados que tienen nucleólos muy pequeños o fragmentados son generalmente anormales y manifiestan un desarrollo pobre y retardado.^{11,15} Además nucleólos de diferente tamaño tienen una mala correlación con el desarrollo embrionario tardío.¹⁸⁻²⁰
- Halo citoplasmático: El halo citoplasmático es la migración mediada por microtúbulos de la mitocondria y otros componentes citoplasmáticos a la región perinuclear. La presencia de un halo, que se observa como un área citoplasmática periférica libre de granulación, dentro del ovocito fertilizado independientemente de su tamaño o característica tiene un valor pronóstico positivo con la calidad del embrión en blastocisto y se correlaciona con una buena calidad embrionaria.²¹
- Distribución Nucleolar: La localización de los nucleólos dentro de cada uno de los pronúcleos tiene importante relevancia en la valoración pronuclear y el desarrollo embrionario. La distribución de los nucleólos cerca de la unión pronuclear alineados de forma vertical, es la característica que mejor correlaciona con un mejor desarrollo embrionario.³
- Cuerpo Polar: se ha analizado la posición del primero y segundo CP encontrando que la distancia entre ellos parece no ser relevante.²² Sin embargo, aparentemente la orientación relativa de los pronúcleos frente a los CP puede estar relacionada con el desarrollo embrionario.²³

Después del estadio pronuclear comienza la etapa de división celular. De igual forma a la etapa pronuclear, existen diferentes características que se han correlacionado con un buen desarrollo embrionario y una alta tasa de implantación y embarazo. Entre ellas, las que mejores correlaciones han ofrecido son las siguientes:

- Número de células: El número de células visualizadas refleja el ritmo de división de los embriones y es un indicador de la capacidad de desarrollo e implantación. En día 2 y día 3 de desarrollo, los embriones con un ritmo de división normal deben haber alcanzado el estadio de 2 a 4 células y 7 a 8 células respectivamente. Estudiando transferencias embrionarias realizadas en día tres de desarrollo, se ha encontrado que los embriones con 7 o más células implantan con mayor frecuencia que los embriones con menor número (35,3% versus 22,8%).²⁴ En algunos estudios se ha observado que la incidencia de anomalías cromosómicas es significativamente menor en embriones de 7-8 blastómeros (50%) en día 3, comparado con aquellos con menor o mayor número de blastómeros en ese día. La incidencia de anomalías cromosómicas es mayor en embriones con 2-3 ó 4 células en el día 3 con incidencias de anomalías cromosómicas en 94 y 85% respectivamente ($P < 0.001$)²⁵.
- Equicorporalidad de las blastómeras (blastómeras de igual tamaño): La forma más común de asimetría embrionaria es la presencia de un blastómero dominante entre otras células más pequeñas. Este tipo de morfología está asociada a un incremento en la incidencia de poliploidia¹⁵.
- Uniones intercelulares: Las uniones *Gap* y los puentes citoplasmáticos juegan un papel importante durante la compactación celular y la diferenciación primaria del embrión humano. Aparentemente, la dispersión de este tipo de uniones altera de forma evidente la comunicación intercelular²⁶.
- Zona Pelúcida: El grosor de la zona pelúcida se reduce durante el periodo de cultivo *in Vitro*. Aparentemente, esta disminución en el grosor es mucho

más evidente en los embriones que han dado lugar a embarazos por lo que su medición podría ser de utilidad²⁷.

- Blastómeros multinucleados: La presencia de blastómeros multinucleados supone una baja tasa de implantación y menor tasa de formación de blastocistos. Además, predispone altas tasas de mosaicismo y/o poliplodia²⁸.
- Fragmentación: La presencia de fragmentación en el embrión ha sido correlacionada con disminución en la tasa de implantación y embarazo. Además, un alto porcentaje de fragmentación se correlaciona con el arresto de la división celular del embrión al tercer día. Algunos estudios han demostrado que no toda la fragmentación es perjudicial. Embriones con hasta el 35% de fragmentación pueden implantarse con unas tasas aceptables después de haber sido sometidos a hatching asistido y aspiración de fragmentos²⁹. Algunos autores han descrito y clasificado los diferentes patrones de fragmentación en cinco tipos, en donde toman en cuenta como determinantes, el tamaño y la distribución de los fragmentos³⁰.
 - Tipo I: La fragmentación es mínima en volumen; y frecuentemente, pero no siempre están asociados a un solo blastómero.
 - Tipo II: Se caracteriza por fragmentos pequeños, localizados en la misma zona y frecuentemente situados en el espacio perivitelino. Normalmente corresponde a la pérdida total o parcial de uno o más blastómeros.
 - Tipo III: Los fragmentos son de pequeño tamaño y están situados al azar por todo el embrión.
 - Tipo IV: Fragmentos de gran tamaño que muchas veces se pueden confundir con blastómeros. Suelen estar distribuidos al azar y normalmente se asocian con blastómeros asimétricos.
 - Tipo V: Los fragmentos tienen una apariencia necrótica, con la característica granulosidad y contracción citoplasmática de los blastómeros intactos.

II. ESCALAS ACTUALES EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Tras su aspiración, los ovocitos se clasifican de acuerdo a su grado de maduración, tomando en cuenta su corona radiada y la presencia o ausencia de vesícula germinal o cuerpo polar³¹ (Ver figura 1):

- Profase I.- Cumulus-Corona muy compacta, presencia de vesícula germinal, citoplasma granuloso, es un ovocito inmaduro.
- Metafase I.- Cumulus-Corona con poca dispersión, citoplasma granuloso central u homogéneo, ausencia de vesícula germinal y cuerpo polar,
- Metafase II.- Cumulus-Corona en forma radiada expandida, citoplasma homogéneo, presenta cuerpo polar, es un ovocito maduro.
- Post-maduros.- Cumulus-Corona muy disperso o ausente, citoplasma muy transparente o fragmentado, presenta cuerpo polar.

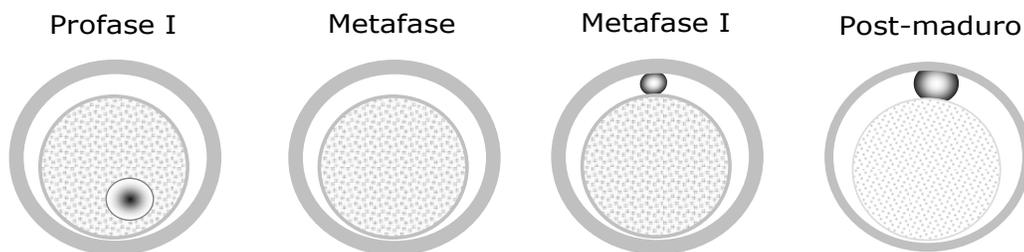


Figura 1. Esquema de ovocitos desnudos en diferentes estadios de maduración.

Durante muchos años, diferentes sistemas de valoración han sido propuestos para la evaluación de la viabilidad embrionaria^{19,29,31-35}. Algunos investigadores han descrito sistemas de puntuación no invasivos para cigotos, los cuales se basan en aspectos morfológicos.^{6,17} En 1998, Scott y Smith reportaron un sistema basado en observaciones empíricas correlacionadas con el embarazo sobre la morfología de los cigotos. Los resultados son poco exactos pues se transfirieron de 3 a 6 embriones con diferentes características haciendo una

escala de valores para cada uno. Se creó un punto de corte con un valor mayor o igual a 15 lo que dio como resultado, una implantación del 28% y nacidos vivos en el 65%⁵.

La clasificación propuesta por Scott en 1998 consta de cinco grados (figura 2):

Grado 1.- Igual número de nucleólos (de 3 a 7) en cada pronúcleo, alineados en la unión pronuclear.

Grado 2.- Igual número de nucleólos (3 a 7) en cada pronúcleo, con alineación nucleolar en la unión pronuclear de uno de los pronúcleos y dispersión nucleolar del otro pronúcleo.

Grado 3.- Igual número de nucleólos (3 a 7) en cada pronúcleo, pero a diferencia del grado 1 estos se encuentran dispersos en los pronúcleos.

Grado 4.- Desigual número y/o tamaño de nucleólos, alineados en la unión pronuclear.

Grado 5.- Número y distribución desigual de los nucleolos así como diferente tamaño de los pronúcleos.

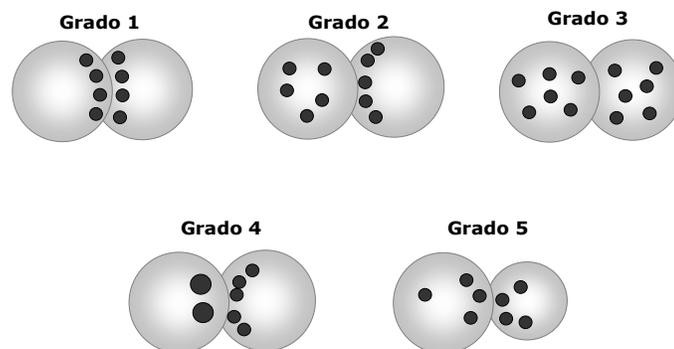


Figura 2. Esquema de la clasificación de pronúcleos de Scott (1998).

En el año 2000 Scott modifica su escala observando que su grado 1 y grado 3 son los que mayor porcentaje de desarrollo adecuado presentaban¹⁷. Por ello, realiza las siguientes modificaciones, utilizando únicamente 4 parámetros.

Z1 Igual número de nucleólos alineados en la unión pronuclear; de 3 a 7 en cada pronúcleo, de igual tamaño y con una diferencia menor de uno entre los dos.

Z2 Igual número de nucleólos dispersos en los pronúcleos; de 3 a 7 en cada pronúcleo, de igual tamaño y con una diferencia menor de uno entre los dos.

Z3 Alineación nucleolar en la unión pronuclear de al menos uno de los pronúcleos, con igual o diferente número de nucleólos y con igual o diferente tamaño.

Z4 Pronúcleos de diferente tamaño, o separados, o nucleólos dispersos con diferencia mayor a uno entre los dos.

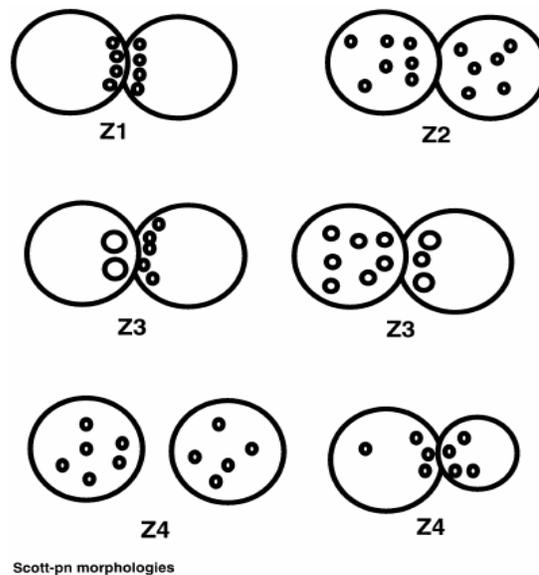


Figura 3. Esquema de la clasificación de pronúcleos de Scott modificada.

Otro sistema de clasificación, propuesto por Tesarik y Greco (1999), incluye seis categorías diferentes de cigotos de acuerdo con el número y distribución de los PN. Utilizando esta clasificación los cigotos se dividen en un grupo normal (Patrón 0), en el cual el número de nucleólos en ambos pronúcleos no difiere en más de tres. Además, los pronúcleos deben estar polarizados cuando son menos de 7 y nunca cuando son más de 7. También describió cinco patrones potencialmente anormales (Patrón 1 a 5). La tasa de embarazo clínico reportado fue 50% si se transfería por lo menos un embrión con patrón 0, y 9% cuando solo retransferieron embriones anormales⁶. (figura 4)

1. Grandes diferencias (3) en el numero de nucleolos en ambos pronúcleos
2. Número reducido (7) de nucleolos sin polarización en por lo menos uno de los nucleolos
3. Numero aumentado (7) de nucleolos con polarización de por lo menos un pronúcleo
4. Número muy reducido (3) de nucleólos en por lo menos un pronúcleo
5. Distribución polarizada de nucleólos en pronúcleos y no polarizada en el otro

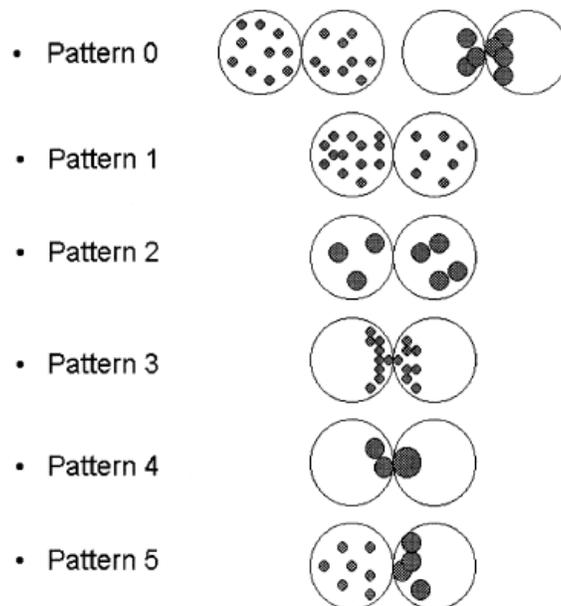


Figura 4. Esquema de la clasificación de pronúcleos de Tesarik

A partir del segundo día posterior a la fertilización, el criterio para evaluar la calidad embrionaria se realiza atendiendo al número y morfología de los blastómeros y a la presencia de fragmentación celular. Con este criterio se puede realizar la siguiente clasificación de los embriones⁴: (figura 5)

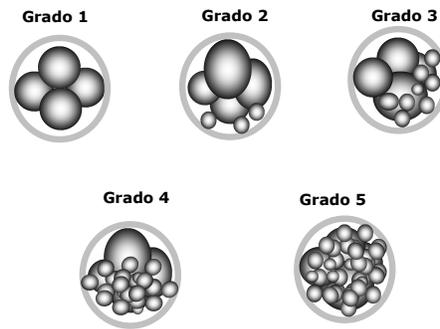


Figura 5. Esquema de la clasificación de embrión en división.

Grado 1: embrión con blastómeros de igual tamaño sin presencia de fragmentos, con citoplasma claro y homogéneo.

Grado 2: embrión con blastómeros simétricos y con fragmentos de 10 a 20%.

Grado 3: embrión con blastómeros asimétricos o con 20 a 50% de fragmentación.

Grado 4: embrión con divisiones asimétricas y fragmentación mayor a 50%.

Grado 5: embrión con fragmentación en 100%

Como se mencionó con anterioridad, durante la etapa pronuclear del ovocito fertilizado, se presentan diversas características que pueden ser correlacionadas con un adecuado desarrollo embrionario y con una mayor tasa de implantación y embarazo^{3,36}. Todo esto con la finalidad de encontrar un parámetro pronuclear que nos pudiera predecir un adecuado desarrollo, implantación y embarazo con la mayor certeza y seguridad posible. Hasta el momento, han sido múltiples los intentos por encontrar este posible marcador de adecuado desarrollo embrionario, sin embargo, ninguno de ellos ha sido lo suficientemente concluyente. Inclusive, se han creado clasificaciones que involucran diferentes parámetros pronucleares y

ninguna de ellas ha podido predecir un buen desarrollo, una alta tasa de implantación o una alta tasa de embarazo con buena significancia estadística y con buen sustento metodológico^{6,17} y por el contrario existe controversia sobre su utilidad³⁷⁻³⁹.

Por tanto, queda por definir si realmente las características pronucleares del ovocito fertilizado pueden predecir un adecuado desarrollo embrionario ó si por el contrario, es inútil observar al ovocito fertilizado 18 horas post-fertilización debido a su baja predicción en cuanto al desarrollo embrionario, implantación y/o embarazo. Es indispensable realizar un buen estudio metodológico para sustentar los resultados obtenidos con una alta significancia estadística.

III. VALIDACIÓN DE VARIABLES

El estudio de validez y fiabilidad se ha realizado en diversos campos de la medicina.⁴⁰⁻⁴³

De todos los instrumentos empleados en la valoración de la calidad de células ovocitarias y embrionarias no hay reporte de que en alguno se haya aplicado un adecuado estudio metodológico. Recientemente se realizaron dos estudios en los cuales se valoró la variabilidad interobservador e intraobservador en la clasificación de embriones en los primeros días de división, en el estudio de Baxter⁴⁴, empleando la escala de Veeck hay una variabilidad importante interobservador e intraobservador, y en el de Arce hubo poca variabilidad intraobservador y moderada interobservador sin embargo en este último los evaluadores fueron capacitados en las características a evaluar previo al estudio.⁴⁵

Para validar escalas o cuestionarios previo a su aplicación en diferentes poblaciones es necesario seguir varios pasos, a fin de asegurar que el instrumento que empleamos sea fiable y válido.

El primer paso consiste en la operacionalización de conceptos, el cual consiste en un proceso que va de la definición de un concepto al instrumento de medida. El concepto es una categoría que se define a través de la alusión a otros conceptos. Los conceptos no pueden medirse directamente, se miden sus definiciones operativas⁴⁶.

A cada una de las definiciones operativas del concepto se les llama facetas o factores, es decir, son los diferentes aspectos que componen el concepto. No todos los factores contribuyen en el mismo grado para definirlo. Estas facetas, son lo que podemos medir dentro del concepto, (frecuencia, intensidad, porcentaje, cantidad, etc.) y posteriormente traducirlo en una valoración numérica.

Dentro de las mediciones pueden existir variaciones, las cuales pueden deberse al fenómeno en sí, o al error producido en su medición, este último puede ser debido al observador, al instrumento utilizado o a la situación en que se realiza la medición⁴⁶.

Una vez que tenemos un instrumento con el cual deseamos valorar determinada característica de una situación es necesario conocer su fiabilidad y validez, esto con el fin de conocer que tan reales son los resultados que estamos obteniendo con este instrumento.

Fiabilidad

La fiabilidad valora que tan reproducibles son los hallazgos si la misma medición se repite en el mismo sujeto, con el mismo procedimiento en dos o más ocasiones y en las manos de dos o más observadores⁴⁷.

Es decir, la fiabilidad mide el grado de concordancia entre los observadores, así como el grado de concordancia de un mismo observador al medir el mismo evento dos veces, esto se puede valorar utilizando un coeficiente estadístico conocido como coeficiente KAPPA cuando las unidades de medida son nominales y coeficiente de correlación intraclass cuando son medidas numéricas⁴⁸. En el caso se estudien variables ordinales se puede emplear el coeficiente Tau b de Kendall⁵⁰.

Un valor de kappa mayor de 0.75 denota excelente reproducibilidad. La fiabilidad también trata de encontrar hasta que punto un conjunto de medidas son reproducibles en el tiempo, en este caso se mide el fenómeno en un primer momento y posteriormente se vuelve a medir⁴⁹.

Los valores de fiabilidad oscilan entre [0 a 1] ausencia de fiabilidad y fiabilidad perfecta, también puede ser expresada mediante un porcentaje⁴⁶.

Dentro de la valoración de un concepto, como pudiera ser la calidad del embrión, el grado en que contribuye cada una de las características del embrión a este concepto puede determinarse al evaluar su consistencia interna, la cual puede realizarse utilizando la prueba alfa de Cronbach.

Validez

La validez o exactitud es el grado en que un instrumento de medida, mide lo que realmente pretende o quiere medir. Es fundamental para valorar si el resultado obtenido en un estudio es el adecuado⁵¹.

Para validar escalas se pueden tomar en cuenta diversos aspectos⁴⁸:

- a. Validez de Apariencia: La escala parece medir lo que debe medir.

b. Validez de Constructo: La escala no deja factores sin medir ni mide dominios que no son del síndrome.

c. Validez de Criterio: La escala funciona parecido a otros instrumentos.

d. Confiabilidad test–retest o interevaluador: La escala funciona bien bajo diferentes condiciones.

e. Sensibilidad al Cambio: La escala detecta modificaciones de la realidad que mide.

f. Utilidad: Es una escala fácil de aplicar y procesar.

Cuando no tenemos buenos criterios o un estándar de oro contra el cual comparar nuestra escala, es esencial tomar en cuenta la validez de contenido examinando hasta qué punto la definición operativa es representativa de la característica que será investigada. Entre las técnicas para valorar la validez de constructo, al no tener un estándar, se debe aplicar el instrumento a dos o más grupos y ver si discrimina.

JUSTIFICACIÓN y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evaluación de los embriones tiene como objetivo el seleccionar aquellos con potencial óptimo de implantación. Esta búsqueda sigue siendo una causa de frustración para los embriólogos aun después de dos décadas de investigación y experiencia. Recientemente, las características de la morfología pronuclear han sido una de las áreas más estudiadas en el desarrollo embrionario. Diferentes escalas relacionadas con el tema han sido elaboradas con el objeto de predecir, en un alto porcentaje, un buen desarrollo embrionario y una alta tasa de implantación y de embarazo. Sin embargo, la realidad es que ninguna de las escalas elaboradas hasta el momento, cumple con una adecuada metodología o ha seguido un proceso de validación, por lo que recientemente, sus resultados y su aplicación han sido debatidos. Consideramos la necesidad de crear una nueva clasificación y escala respecto a la morfología pronuclear que contenga una validación metodológica y que tenga una aplicación objetiva, medible y reproducible para que pueda ser incorporada a los protocolos en el laboratorio de gametos. Todo esto con la finalidad de definir con precisión, si realmente las características pronucleares del ovocito fertilizado pueden predecir un adecuado desarrollo embrionario o si por el contrario, es inútil observar al ovocito 18 horas post-fertilización debido a su baja predicción en cuanto al desarrollo embrionario, implantación y/o embarazo.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es factible crear un instrumento con adecuada validez y fiabilidad para evaluar el desarrollo del embrión preimplantatorio?

OBJETIVOS

General

Elaborar y validar un instrumento para evaluar marcadores morfológicos de fertilización y desarrollo del embrión preimplantatorio

Específicos

Determinar el grado de comprensibilidad de los conceptos que definen las características morfológicas de los ovocitos, el cigoto y el embrión en día 2.

Evaluar la validez y fiabilidad de un instrumento que evalúe las características morfológicas de los ovocitos, el cigoto y el embrión en día 2.

HIPÓTESIS

El porcentaje de comprensibilidad de los conceptos que definen las características morfológicas de los ovocitos, el cigoto y el embrión en día 2 es mayor del 75%.

El instrumento formado con los conceptos que definen las características morfológicas de los ovocitos, el cigoto y el embrión en día 2, tiene una validez y fiabilidad adecuadas ($Tau\ b > 0.4$ para variables cualitativas y Coeficiente de correlación intraclase >0.8 para variables cuantitativas).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para validar un instrumento, que involucre la evaluación de marcadores morfológicos del desarrollo del embrión preimplantatorio, se siguieron tres etapas:

- a) **Validez de contenido:** Se definieron 22 conceptos operacionales derivados de las características morfológicas, tanto de ovocitos, óvulos fertilizados (cigoto) y embriones en día 2 (embrión preimplantatorio). Los conceptos se describieron, revisando la literatura, y por consenso entre la experiencia de médicos biólogos de la reproducción, embriólogos e investigadores. Éstos se agruparon en 3 apartados: parámetros ovocitarios, parámetros nucleares, y parámetros embrión del día 2. (Anexo 1).

- b) **Comprensión de los conceptos:** se diseñó una encuesta utilizando estos conceptos. Dicha encuesta se aplicó a 5 biólogos y a 5 médicos, todos relacionados con el área de biología de la reproducción, esto con el fin de determinar el grado de comprensión de los conceptos. Cada concepto fue medido utilizando una escala de Likert que iba de “excelente” a “malo”, con tres puntos intermedios. Se pidió a los encuestados que si su respuesta era buena o menos señalaran qué parte de la pregunta no era comprensible. (Anexo 1). A partir de estos resultados y las observaciones realizadas por los evaluadores se hicieron las modificaciones pertinentes a las definiciones operacionales y se creó un instrumento para medir la validez y reproducibilidad de dichos conceptos. (Anexo2)

- c) **Validez de criterio y reproducibilidad:** Se aplicó el instrumento formado a partir de las definiciones operacionales, para describir las características de 20 imágenes de ovocitos , 20 imágenes de

cigotos y 20 imágenes con embriones de día 2. En total se valoraron 60 imágenes por cada participante, todas las fotografías fueron tomadas por la misma persona, encargada del laboratorio de embriología, con 3 años de experiencia en el área. Los ovocitos fueron capturados por aspiración transvaginal con aguja fina y guía ultrasonográfica, bajo anestesia. Los ovocitos fueron inseminados por fertilización in Vitro convencional o Inyección intracitoplasmática del espermatozoide (ICSI). Los ovocitos, cigotos y embriones en día 2, fueron colocados individualmente en un microscopio invertido (Olympus, IX 81), el cual está conectado a una computadora con el programa Image Plus (versión 4 para Windows) a través del cual se tomaron las fotografías. Las fotos de los ovocitos fueron tomadas después de haberlos denudado tras su aspiración. Las fotos de los cigotos, se tomaron de 17 a 19 horas después de la fertilización, y 40 a 42 horas después de la fertilización se tomaron las fotografías de embriones en día 2. Las fotografías tomadas fueron impresas en papel bond, tamaño carta, con impresora láser color en grupos de 4, pudiendo haber hasta 8 fotografías por hoja. Todas las fotografías fueron del mismo tamaño. Se solicitó a 10 médicos adscritos a los servicios reproducción asistida e infertilidad del Instituto Nacional de Perinatología, evaluar las imágenes. A todos los participantes se le solicitó su edad, sexo, ocupación y años de experiencia. A cada participante se le entregó un juego de fotografías y un cuestionario con los conceptos sobre características morfológicas de ovocitos, cigotos y embriones en día 2. (Anexo2). Cada participante realizó su valoración individualmente. Para las preguntas de la medición del grosor de la zona pelúcida y del halo se utilizó una regla y se expresó el resultado en milímetros (mm). Esto solo es aplicable a imágenes impresas pero puede modificarse dependiendo los instrumentos

de medición que se tengan; en algunos laboratorios podrá hacerse directamente al microscopio y las valoraciones serán en micras. Para medir el ángulo entre los pronúcleos y los cuerpos polares se ocupó un transportador. Una semana después de la primera evaluación, se solicitó al mismo personal, hacer otra valoración, sin informarles que las imágenes eran las mismas que vieron una semana previa, pero en diferente orden. El biólogo quien tomó las fotografías fue seleccionado como el estándar para llevar a cabo el análisis estadístico.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la comprensión de las definiciones se decidió dar 4 puntos al concepto cuando fue calificado como excelente, 3 cuando fue calificado como muy bueno, 2 cuando fue calificado como bueno, 1 cuando se calificó como regular y 0 cuando fue malo. Tomando en cuenta que fueron diez personas las encuestadas, el valor máximo posible para un concepto son 40 puntos y el mínimo 0. Se decidió que la comprensibilidad del concepto era adecuada cuando la suma de todos los puntos de cada concepto fue de 30 o mayor, es decir el 75% de los encuestados comprendió satisfactoriamente el concepto. La evaluación metodológica comprendió estadística descriptiva, y las diferencias entre las calificaciones otorgadas por los médicos y los embriólogos se evaluaron por medio de una prueba t de Student para muestras independientes.

En la última etapa, la validez de las variables cualitativas se evaluó por medio del coeficiente Tau-b de Kendall y se calculó para cada evaluador en relación a un experto. Después se obtuvo un coeficiente promediado para cada pregunta. La reproducibilidad se evaluó con la misma prueba estadística considerando los datos recolectados en dos momentos distintos. En ambos casos se consideró adecuado un coeficiente ≥ 0.4 .

En el caso de las variables cuantitativas la validez y reproducibilidad se evaluó mediante el coeficiente de correlación intraclass (CCI), que se consideró como adecuado cuando era igual o mayor a 0.70.

El análisis de la información se realizó con el paquete estadístico SPSS para Windows versión 11.5.

RESULTADOS

En el primer paso para validar un cuestionario en relación al desarrollo del embrión preimplantatorio, se elaboraron los conceptos que valoran la morfología de ovocitos, cigotos y embriones en día 2, basados en la literatura y la experiencia de los investigadores. En esta reunión participaron dos investigadores, asesorando la metodología y la adecuada redacción de los conceptos, tres médicos relacionados con biología de la reproducción aportando los antecedentes de la literatura y una embrióloga que aportó sus conocimientos y experiencia en relación al desarrollo embrionario. De este consenso surgieron 23 conceptos, 4 de ellos en relación a parámetros ovocitarios, tomando en cuenta la corona radiada antes de denudar los ovocitos y las características que se presentan con mayor frecuencia después de denudarlos de acuerdo a su grado de maduración. De igual forma, se describieron 11 conceptos relacionados con parámetros pronucleares, en donde el halo con fines de cuantificación se valoró de tres formas distintas. Para el embrión en día 2, se definieron 8 conceptos morfológicos basados principalmente en las características de los blastómeros.

De estos conceptos se creó un cuestionario, para valorar el grado de comprensión de los mismos, agregando además una clasificación sobre pronúcleos, la clasificación de Scott¹⁴ y una clasificación sobre embriones en día 2 adaptada de la de Veeck⁴⁴. La encuesta fue aplicada a 5 biólogos y a 5 médicos todos relacionados con el área de reproducción asistida. *Anexo 1*.

Comprensibilidad de los conceptos. El grado de comprensión de los conceptos fue valorado dando un puntaje a cada una de las respuestas. Los parámetros ovocitarios fueron valorados con 33 a 36 puntos de un máximo de 40, en promedio 86.9% de comprensibilidad para este grupo de conceptos. Los parámetros dentro del cigoto fueron evaluados con 31 a 38 puntos en promedio 88% de comprensibilidad. Los parámetros de embrión en día dos fueron evaluados con 34 a 37 puntos, en promedio 89% de comprensibilidad. (Tabla 1).

Cada médico y embriólogo calificó 23 conceptos, en total cada grupo calificó 115 conceptos. Los médicos evaluaron los conceptos como excelente en 104 ocasiones (90.4%) y los embriólogos sólo en 37 (32.2%). Los médicos evaluaron como concepto muy bueno solo en 6 ocasiones (5.3%) a diferencia de los embriólogos que lo hicieron en 65 casos (56.5%), los médicos evaluaron los conceptos (4.3%) como buenos en 5 ocasiones y los embriólogos en 12 ocasiones (10.4%), los médicos no evaluaron ningún concepto como regular o malo, y entre los embriólogos solo se evaluó un concepto como regular (0.9%) y ninguno como malo. (Tabla 2). De lo anterior se deduce que en promedio los médicos mostraron una mejor comprensión de los conceptos que los biólogos (98% vs 80%) y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabla 1. Grado de comprensión en las definiciones operacionales de ovocitos, cigotos y embrión preimplantatorio.

<i>Grado de comprensión</i>	Puntuación					<i>Puntaje</i>	<i>%</i>
	4	3	2	1	0		
Conceptos ovocitarios	E	MB	B	R	M		
Ovocito profase I	6	4				36	90
Ovocito metafase I	5	4	1			34	85
Ovocito metafase II	7	2	1			36	90
Ovocito metafase II postmaduro	4	5	1			33	82.5
Conceptos pronucleares	E	MB	B	R	M		
Halo	4	5	1			33	82.5
Grosor de zona pelúcida	7	3				37	92.5
No. de pronúcleos	7	3				37	92.5
No. Nucléolos en Pn masculino	4	3	3			31	77.5
No. Nucléolos en Pn femenino	4	4	2			32	80
Distribución de nucleólos	6	4				36	90
Tamaño nucleolar	6	4				36	90
Tamaño pronuclear	7	3				37	92.5
Situación pronuclear	7	3				37	92.5
Alineación del cuerpo polar	5	3	2			33	82.5
Clasificación Scott	8	2				38	95
Conceptos embrionarios D₂	E	MB	B	R	M		
No. de blastómeras	7	2	1			36	90
No. de blastómeras nucleadas	7	3				37	92.5
No. de blastómeras mononucleadas	7	3				37	92.5
No. de blastómeras multinucleadas	7	2	1			36	90
Fragmentación	6	2	2			34	85
Grosor de zona pelúcida	6	3	1			35	87.5
Tamaño de blastómeras	6	3		1		34	85
Clasificación de morfología D ₂	7	2	1			36	90
Promedio						35.3	88.25

E = Excelente MB = Muy Bueno B = Bueno R = Regular M = Malo
Puntuación: Numero de veces en que cada concepto fue calificado con cada una de las posibles valoraciones.
Puntaje. Calificación en puntos de cada variable con un máximo posible de 40 = 100% de comprensibilidad.
% Porcentaje de comprensibilidad.
Pn= Pronúcleo. D₂= día 2

Tabla 2 Diferencia en la comprensión de las definiciones operacionales entre médicos y embriólogos.

<i>Grado de comprensión</i>	BIÓLOGOS					MÉDICOS				
	4	3	2	1	0	4	3	2	1	0
Conceptos ovocitarios	<i>E</i>	<i>MB</i>	<i>B</i>	<i>R</i>	<i>M</i>	<i>E</i>	<i>MB</i>	<i>B</i>	<i>R</i>	<i>M</i>
Profase I	2	3				4	1			
Metafase I	2	2	1			3	2			
Metafase II	2	2	1			5				
Metafase II postmaduro	2	3				3	1	1		
Conceptos en cigoto										
Halo	1	3	1			3	2			
Grosor de ZP	2	3				5				
No. de pronúcleos	1	4				5				
No. Nucléolos Pn (M)		3	2			4		1		
No. Nucléolos Pn (F)		4	1			4		1		
Distribución nucleolar	1	4				5				
Tamaño nucleolar	1	4				5				
Tamaño pronuclear	2	3				5				
Situación pronuclear	2	3				5				
Alineación del CP	1	3	1			4		1		
Clasificación Scott	3	2				5				
Conceptos embrión D₂										
No. de blastómeras	2	2	1			5				
No. de blastómeras nucleadas	2	3				5				
No. de blastómeras mononucleadas	2	3				5				
No. de blastómeras multinucleadas	2	2	1			5				
Fragmentación	2	2	1			4		1		
Grosor de ZP	2	2	1			5				
Tamaño blastómeras	1	3		1		5				
Clasificación morfológica en D ₂	2	2	1			5				
Total	37	65	12	1	0	104	6	5	0	0
Porcentaje	32.2	56.5	10.4	0.9	0	90.4	5.3	4.3	0	0

E = Excelente MB = Muy Bueno B = Bueno R = Regular M = Malo pn = pronucleo

Total = Numero de ocasiones en que se selecciono cada una de las calificaciones para el grado de comprensión.

Observaciones totales por biólogos 115. 115 = 100%

Observaciones totales por médico 115. 115 = 100%

ZP= Zona Pelucida; CP= Cuerpo Polar; Pn (M)= Pronúcleo Masculino; Pn (F)= Pronúcleo Femenino; D₂ = Día 2.

Validez y reproducibilidad: De los 23 conceptos valorados, se diseñó un instrumento con 22 preguntas. En la validación de este instrumento participaron 11 evaluadores, nueve hombres y dos mujeres, que tuvieron una edad de 31 ± 0.31 , con un intervalo de 24 a 42 años. Diez de ellos, médicos dedicados a la biología de la reproducción con una mediana de un año de experiencia (1 a 7 años).

Las variables cualitativas no mostraron en promedio una validez que se pueda considerar como adecuada (0.351), aunque más de la mitad de las preguntas tuvieron un coeficiente Tau que puede considerarse como adecuado. Si se excluyera del análisis al participante que sistemáticamente tuvo la menor validez (tau promedio de -0.122), entonces cinco de las siete preguntas superarían el punto de corte. En contraparte, la reproducibilidad sí se puede considerar adecuada ya que en promedio fue de 0.460 y 5 de 8 preguntas superaron los valores deseables.

Tabla 3. Validación de las variables cualitativas dentro del instrumento en el desarrollo embrionario.

	Post captura	17-19h post fertilización	40-42h post fertilización
Parámetro ovocitario			
Maduración ovocitaria	0.304		
Parámetros Pronucleares			
Distribución de nucléos		0.513	
Tamaño nucleolar		0.350	
Tamaño pronuclear		**	
Situación pronuclear		0.597	
Clasificación Scott		-0.126	
Desarrollo Embrionario D₂			
Tamaño de Blastomeras			0.410
Clasificación Embrión D₂			0.411

Validez adecuada con Coeficiente de Tau de Kendall >0.4 . D₂= Día 2.

** No se pudo calcular debido a que el experto sólo dio una misma respuesta para todas las preguntas

ZP= Zona Pelucida; CP= Cuerpo Polar; Pn (M)= Pronúcleo Masculino; Pn (F)= Pronúcleo Femenino; D₂ = Día 2.

Cabe señalar que la menor validez y reproducibilidad la obtuvo la pregunta 14, que corresponde a la escala de Scott (Tabla 3 y Tabla 4).

Tabla 4. Fiabilidad de variables cualitativas en el instrumento dentro del desarrollo embrionario.

	Post captura	17-19h post fertilización	40-42h post fertilización
Parámetro ovocitario			
Maduración ovocitaria	0.503		
Parámetros Pronucleares			
Distribución de nucléos		0.673	
Tamaño nucleolar		0.505	
Tamaño pronuclear		0.355	
Situación pronuclear		0.337	
Clasificación de Scott		0.256	
Desarrollo Embrionario D₂			
Tamaño de Blastómeros			0.514
Clasificación Embrión D₂			0.543

Reproducibilidad adecuada con Coeficiente de Tau de Kendall >0.4.
D₂ = Día 2.

Las variables cuantitativas mostraron una alta validez y fiabilidad (CCI = 0.81) y solo dos de quince preguntas tuvieron valores ligeramente por debajo de lo aceptable.

Tabla 5. Validez y fiabilidad de variables cuantitativas

	Coeficiente de correlación intraclase	IC 95%
Parámetros pronucleares		
Porcentaje de halo respecto al área total citoplasmática.	0.781	0.689-0.8433
Porcentaje de halo respecto a la periferia del cigoto.	0.839	0.789- 0.8785
Grosor del halo	0.779	0.713- 0.8311
Grosor de la ZP	0.865	0.824- 0.8968
No. de pronúcleos	---	
No. de nucleólos en Pn (M)	0.901	0.871-0.924
No. de nucleólos en Pn (F)	0.920	0.896-0.939
Alineación del CP	0.856	0.809-0.893
Desarrollo embionario D₂		
No. de blastómeros	0.959	0.946-0.968
No. de blastómeros nucleados	0.693	0.599-0.764
No. de blastómeros mononucleados	0.734	0.654-0.796
No. de blastómeros multinucleados	0.535	0.394-0.643
Fragmentación	0.887	0.848-0.915
Grosor de la ZP	0.819	0.763-0.861

--- no se pudo calcular debido a la alta concordancia entre los participantes en la primera y segunda evaluaciones
ZP= Zona Pelucida; CP= Cuerpo Polar; Pn (M)= Pronúcleo Masculino; Pn (F)= Pronúcleo Femenino; D₂ = Día 2.

DISCUSIÓN

Los procesos de fertilización y desarrollo embrionario han estado directamente vinculados a la búsqueda de un embrión preimplantatorio que tenga la capacidad de lograr un embarazo sano. Durante este proceso, se activan una serie de mecanismos que en forma dinámica permiten el vínculo entre el genoma paterno y materno. Hoy en día, es factible visualizar en forma objetiva los cambios morfológicos de estos procesos en sus diferentes etapas, desde la conjunción de los gametos para la formación del cigoto, hasta la formación del blastocisto preimplantatorio pasando por el proceso de activación genómica⁵².

A través de la evolución del ser humano ha quedado implícito las limitaciones, que en materia reproductiva padece, de tal manera que el potencial reproductivo en nuestra especie queda circunscrito a muchos factores. Al momento actual, el estudio minucioso en los procesos reproductivos a través de la fertilización in Vitro nos ha permitido conocer las condiciones en el metabolismo y desarrollo embrionario. Sin embargo, esto ha estado vinculado a la presencia de embarazos de alto orden fetal por el elevado número de embriones transferidos, para tratar de alcanzar una probabilidad aceptable de embarazo. Desafortunadamente, estas condiciones han impactado directamente en la morbi-mortalidad materna y fetal, vinculado directamente al alto costo en las terapias neonatales dentro de las instituciones de salud.

Es por este motivo que se han buscado marcadores selectivos que permitan la transferencia de un embrión único y que permita lograr un embarazo sano. Con este objetivo se han diseñado diferentes escalas tomando en cuenta las características morfológicas de los ovocitos fertilizados y embriones en sus diferentes etapas de desarrollo, buscando el embrión con mayor capacidad de implantación. Desafortunadamente, hasta el día de hoy no contamos con ningún instrumento que cumpla este objetivo y si por el contrario la mayor parte de la

información señalada en la literatura carece de un sustento metodológico, que ofrezca un valor pronóstico real^{4,6,16}.

Valorando estas condiciones nos dimos a la tarea de desarrollar un instrumento clinimétrico de medición, como primera parte de un proyecto con valor diagnóstico y pronóstico en la búsqueda de estos marcadores selectivos en el desarrollo embrionario.

En este estudio, se diseñaron *de novo* definiciones operacionales para describir cada una de las características, con la finalidad de utilizarlas y medirlas dentro de los óvulos, cigoto y embrión preimplantatorio. Anteriormente, estos conceptos han sido definidos bajo un estado morfológico sin una aplicación pronóstica (zona pelúcida, cuerpo polar, pronúcleos, blastómeros, entre otros)^{2,7-13}, por lo que intentamos darles mediante este nuevo instrumento un adecuado valor metodológico y estadístico.

En base a esto se realizaron escalas en el desarrollo embrionario tardío agrupando simetría, número de blastómeros y grados de fragmentación como factores pronósticos de implantación, sin embargo, este tipo de evaluación se realizaba de forma tardía dentro de los laboratorios de gametos y aún así, requería de la transferencia de un número importante de embriones⁴⁴. Recientemente, se han buscado marcadores más tempranos que permitan realizar una selección más específica del embrión mediante la evaluación de sus características citoplasmáticas y nucleares^{13,45}. Desafortunadamente, ninguno de estas propuestas diagnósticas han tenido un adecuado sustento metodológico y si por el contrario han representado una controversia en la toma de decisiones en este campo^{3,4,6}.

Esta falta de definiciones operacionales y su validación, ha dado lugar a controversias en la utilidad de estas escalas para predecir el desarrollo de embriones viables que se traduzcan en embarazos sanos, utilizando marcadores morfológicos tempranos. Anteriormente, en un estudio realizado por Guerif y cols.,

se encontró que la combinación de parámetros morfológicos como son las características de los pronúcleos, el tiempo de división de los embriones, el número de células y el porcentaje de fragmentación (al seguir el desarrollo embrionario del día 1 a 5 postfertilización), permitía la predicción del desarrollo de blastocisto con un área bajo la curva de 0.688, que representa un pobre valor predictivo. De forma aislada, sólo encontró de utilidad la división temprana del embrión y el número de blastómeros en el día 2 para predecir un desarrollo adecuado a blastocisto en el día 5³⁹. Por su parte, Nicoli y cols., realizaron un estudio clínico retrospectivo en el que se buscó el valor pronóstico de la escala de Scott. A diferencia de lo reportado con anterioridad⁵, sus resultados mostraron que la relación de esta escala con la implantación y el embarazo estuvo ausente ($Z1 = 7.2\%$, $Z2 = 6.9\%$ y $Z3 = 85.9\%$)³⁷.

Dentro del estudio de los marcadores morfológicos del embrión preimplantatorio no existe ninguna escala que haya sido validada. En algunos casos, sólo se han practicado pruebas de concordancia entre diferentes evaluadores con resultados variables. Por ejemplo, Baxter y cols. (conociendo la falta de validación de la escala de embriones en día 3 de Veeck), cuantificaron la variabilidad inter e intraobservador en 26 embriólogos de la unión americana. Sus resultados demostraron la existencia de una importante diferencia entre los embriólogos a pesar de utilizar la misma clasificación ($Kappa = 0.24$), de igual forma, hubo una variabilidad moderada intraobservador ($Kappa = 0.69$).⁴⁴ La variabilidad reportada en estos resultados podría alterar tanto la calidad evaluada del embrión transferido como el número de embriones transferidos, lo que impactaría directamente en el éxito de los programas de reproducción asistida. Recientemente, Arce y cols. encontraron una adecuada correlación inter e intraobservador entre tres embriólogos que valoraron 4002 embriones a las 68 horas postfertilización. En este estudio, se obtuvo un buen acuerdo interobservador entre los embriólogos, ($kappa 0.64-0.79$) y una excelente reproducibilidad intraobservador ($kappa 0.8-0.91$). Sin embargo, cabe mencionar que antes de iniciar el estudio, a cada embriólogo se le proporcionó un atlas con

fotos representativas de todos los parámetros a valorar y se realizó una sesión de entrenamiento en la clasificación de embriones a través de imágenes digitales⁴⁵. Esta situación estandarizó la forma de evaluar de los embriólogos, explicándose la alta concordancia. En nuestro trabajo como en el de Baxter, no se proporcionó ningún entrenamiento previo a la elaboración del estudio. Esto debido a que una escala debe estar formada por conceptos claros y sencillos que puedan ser comprendidos sin necesidad de dar una capacitación exhaustiva⁴⁸.

Tomando en cuenta la importancia de la comprensibilidad de los conceptos, aplicamos un cuestionario con las definiciones operacionales para evaluar de excelente a malo el grado de comprensión de las mismas. Los evaluadores fueron médicos y embriólogos del área de biología de la reproducción, dado que son el personal que emplearía dichos conceptos. Esta valoración se realizó con el fin de llegar a tener un instrumento formado por conceptos simples, entendibles, lógicos y clínicamente relevantes. Por otra parte, es importante mencionar, que ninguno de los conceptos que forman las escalas de uso actual, han sido valorados de esta forma.

Al analizar los resultados, tenemos que la mayor parte de los conceptos fueron evaluados como excelente o muy bueno. Algunos de los conceptos se reportaron como bueno, y solo un encuestado consideró el concepto de tamaño de blastómeros como regular en cuanto a su redacción pero no en cuanto a su comprensión. Nadie calificó alguno de los conceptos como malo.

El concepto que logró más puntuación fue la clasificación de Scott con 38 puntos (95% de comprensión). Probablemente, esto se debió a que esta clasificación es del dominio de la mayoría de los entrevistados, al ser la escala que se ocupa en la mayor parte de los centros de reproducción asistida. En caso de que se elabore una nueva escala, esta clasificación sería el estándar de oro a comparar. El concepto que obtuvo menos puntos fue la definición del número de nucleólos del pronúcleo masculino con 31 puntos (77.5% de comprensión). Esto

podría deberse a que no se hace una diferencia de género entre los pronúcleos durante su valoración, ya que existe controversia en cuanto a su definición⁵³.

En general, podemos decir que los conceptos tuvieron un adecuado grado de comprensión. Las modificaciones realizadas después de la encuesta fueron pocas y muy precisas, encontrando que incluso el concepto con menor puntuación tuvo un grado de comprensión del 77.5%, considerado como muy bueno en la escala de comprensibilidad.

En promedio, los médicos mostraron una mejor comprensión de los conceptos que los embriólogos con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Esto probablemente se explique porque los biólogos están acostumbrados a utilizar escalas determinadas y encontrar los mismos parámetros de evaluación del embrión preimplantatorio. Descritos de forma diferente, estos conceptos pueden parecerles poco adecuados o pueden contraponerse con sus conceptos preestablecidos.

A partir de la revisión del instrumento, se midió la validez y fiabilidad de cada uno de los conceptos mediante la aplicación del cuestionario a 10 médicos del área de reproducción asistida. Los resultados obtenidos en nuestro estudio demostraron que las variables cualitativas del instrumento no mostraron en promedio, una validez que se pueda considerar como adecuada. Al parecer, esto se debió a que son variables subjetivas y los conceptos que los definen son más complejos. Aún así, la mayoría de las variables cualitativas por separado tuvieron una adecuada validez. En contra parte, la reproducibilidad de estas mismas variables fue adecuada.

Un hallazgo importante, fue el encontrar que la menor validez y reproducibilidad la obtuvo la escala de Scott, aún cuando fue la variable calificada con el mejor grado de comprensibilidad. Probablemente, este resultado se deba a que es poco práctico analizar varias variables para cada uno de los grados de la

clasificación y además, muchas de estas variables son poco medibles debido a su subjetividad.

Las variables cuantitativas a diferencia de las cualitativas mostraron una alta validez y fiabilidad (CCI = 0.81). Al parecer, esto se debe a su objetividad que se ve reflejada en una menor variabilidad. El número de nucléolos en el pronúcleo masculino fue calificado como el concepto menos comprensible, sin embargo, estuvo entre los conceptos con mejor validez y reproducibilidad con un coeficiente de correlación intraclase de 0.901 (IC95% 0.871-0.924).

El número de núcleos de los blastómeros fue el concepto que obtuvo menor validez y reproducibilidad. Probablemente, esto podría estar en relación con la capacidad y entrenamiento visual de cada evaluador. Estamos consientes que las características que pueden evaluarse en una fotografía son limitadas en comparación con una imagen en el microscopio en donde se pueden observar diferentes ángulos y profundidades de las estructuras estudiadas. Sin embargo, la fotografía nos da una mejor proyección de validación ya que los sujetos que evalúan estas fotografías deben observar las mismas características.

Creemos que una adecuada validez y fiabilidad en este grupo de evaluadores podría reflejar aún mejores resultados al ser empleado por embriólogos, dado que estos últimos tienen mayor experiencia en la visualización de estos parámetros.

Para desarrollar una escala con adecuada validez y fiabilidad es importante revisar y estar de acuerdo con todas las definiciones. De igual forma, hay que asegurarse que sean comprendidas y aplicadas adecuadamente, dado el riesgo de efectuar mediciones que no coincidan con la realidad. La escala con mejor utilidad es aquella que se lleva a cabo con la menor demora, requiere menos entrenamiento para su aplicación y se califica fácilmente⁵¹.

Esta es una primera fase en el proceso para elaborar una escala que permita valorar el desarrollo del embrión preimplantatorio con adecuada validez y fiabilidad. Se requieren estudios adicionales de concordancia en el proceso de validación para obtener el conocimiento a través del cual, se puedan realizar modificaciones importantes en la forma de seleccionar al embrión con mayor posibilidad de lograr la implantación y un recién nacido sano.

CONCLUSIONES

Por los múltiples problemas metodológicos encontrados en la literatura para la creación de una escala de medición temprana en el desarrollo embrionario, se hace necesaria la instrumentación de guías que expresen en forma precisa, definiciones operacionales para la evaluación inter e intraensayo de las diferentes escalas de evaluación. Este es el primer intento en la definición de estos conceptos operacionales, que a pesar de su simplicidad, es parte fundamental en la definición diagnóstica y pronóstica de instrumentos de medición que nos permitan obtener en el campo reproductivo la selección de un embrión preimplantatorio sano.

RESUMEN DE CURRICULUM DE TESISISTA

Dra. Gabriela Cárdenas Amaro

Título de Médico Cirujano	UNAM	2001
---------------------------	------	------

Diploma Especialista en Ginecología y Obstetricia Hospital de Gineco-obstetricia "Luis Castelazo Ayala"	UNAM	2006
---	------	------

Diploma Subespecialista en Biología de la Reproducción Humana Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinoza de los Reyes"	UNAM	2008
--	------	------

Dirección: Casas Grandes # 148. Colonia Narvarte. Delegación Benito Juárez.
México, D.F. C.P. 03020

dragabycardenas@yahoo.com.mx

ANEXO 1

Cuestionario para validar la claridad con la que fueron definidos los conceptos de características morfológicas del desarrollo del embrión preimplantatorio.

Este es un cuestionario para valorar el grado de claridad con el cual fueron definidos los siguientes conceptos. Marque con una "X" el grado de comprensión de los conceptos, si su respuesta es 3 o mayor, explique porque y si cambiaria algo para hacer los conceptos más comprensibles.

PARÁMETROS OVOCITARIOS

1. OVOCITO EN PROFASE I: Corona muy compacta formando una capa densa (oscura) alrededor del ovocito cuando no se ha denudado. Se observa vesícula germinal y citoplasma granuloso en el interior del ovocito.				
1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo
Comentarios				
<hr/>				
<hr/>				
2. OVOCITO EN METAFASE I: Corona radiada compacta alrededor del ovocito pero con inicio de dispersión (pequeños espacios entre sus células), antes de ser denudado. No se observa vesícula germinal o cuerpo polar. Citoplasma granuloso central u homogéneo.				
1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo
Comentarios				
<hr/>				
<hr/>				
3. OVOCITO EN METAFASE II MADURO: Corona radiada grande dispersa, con espacios entre las células en forma de rayos, pudiendo observarse los límites del ovocito, antes de ser denudado. Se observa el primer cuerpo polar y citoplasma homogéneo.				
1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo
Comentarios				
<hr/>				
<hr/>				
4. OVOCITO EN METAFASE II POSTMADURO: Corona radiada muy dispersa o ausente, antes de ser denudado, citoplasma muy transparente o fragmentado. El ovocito se puede observar con nitidez e identificar el primer corpúsculo polar.				
1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo
Comentarios				
<hr/>				
<hr/>				

Marque con una “X” el grado de comprensión de los conceptos, si tu respuesta es 3 o mayor explique porque y si cambiaria algo para hacer los conceptos más comprensibles.

PARÁMETROS PRONUCLEARES

HALO: Área citoplasmática periférica libre de granulación. Su presencia se medirá de la siguiente manera:

-  Porcentaje del halo respecto al área total del embrión.
-  Porcentaje del halo respecto a la periferia total del embrión.
-  Cuantificación del ancho del halo en su zona más gruesa, en mm.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

GROSOR DE LA ZONA PELUCIDA: Cuantificación del ancho de la zona pelucida medido en mm en su zona más gruesa.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

NÚMERO DE PRONÚCLEOS: Número de pronúcleos dentro del cigoto.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

NÚMERO DE NUCEÓLOS MASCULINOS: Cantidad de nucleólos dentro del pronúcleo que presente cuando menos dos de las siguientes tres características:

-  Pronúcleo de mayor tamaño.
-  Pronúcleo con el mayor número de nucleólos.
-  Pronúcleo más alejado al cuerpo polar.

1 Muy bueno	2 Bueno	3 Regular	4 Malo	5 Muy malo

Comentarios

PARÁMETROS PRONUCLEARES

NÚMERO DE NUCLEÓLOS FEMENINOS: Cantidad de nucleólos dentro del pronúcleo que presente cuando menos dos de las siguientes tres características:

- ✚ Pronúcleo de menor tamaño.
- ✚ Pronúcleo con el menor número de nucleólos.
- ✚ Pronúcleo más cercano al cuerpo polar.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

DISTRIBUCIÓN DE NUCLEOLOS: Localización de los nucleólos dentro del pronúcleo. Se subdivide en cuatro parámetros:

1. Alineación vertical de los nucleólos de ambos pronúcleos cerca de la unión pronuclear.
2. Alineación vertical de los nucleólos del pronúcleo masculino cerca de la unión pronuclear con dispersión de los nucleólos del pronúcleo femenino.
3. Alineación vertical de los nucleólos del pronúcleo femenino cerca de la unión pronuclear con dispersión de los nucleólos del pronúcleo masculino.
4. Dispersión de los nucleólos de ambos pronúcleos.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

TAMAÑO NUCLEOLAR: Equivalencia entre el tamaño nucleolar de ambos pronúcleos. Se divide entonces en dos:

1. Nucleólos equicorporales (igual tamaño entre los nucleolos de un pronúcleo) en ambos pronúcleos.
2. Nucleólos equicorporales en el pronúcleo masculino y no equicorporales (diferente tamaño entre los nucleólos de un pronúcleo) en el femenino.
3. Nucleólos equicorporales en el pronúcleo femenino y no equicorporales (diferente tamaño entre los nucleólos de un pronúcleo) en el masculino.
4. Nucleólos no equicorporales en ambos pronúcleos.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

PARÁMETROS PRONUCLEARES

TAMAÑO PRONUCLEAR: Equivalencia entre el tamaño pronuclear dentro del cigoto. Se divide entonces en dos:

1. Equicorporales (igual tamaño entre los pronúcleos del ovocito fertilizado).
2. No equicorporales (diferente tamaño entre los pronúcleos del ovocito fertilizado).

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

SITUACION PRONUCLEAR: Relación que guardan los pronúcleos entre ellos.

1. Conglomerados: sus membranas pronucleares están en contacto
2. Dispersos: separados, sus membranas no están en contacto

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

ALINEACIÓN DEL CUERPO POLAR: Localización en grados de una línea imaginaria trazada en la unión pronuclear en relación con una línea que pase por el centro del cuerpo polar y el centro del cigoto. Para fines de este estudio, el cuerpo polar se colocará a las 12 horas en el sentido horario.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

CLASIFICACIÓN DE SCOTT: La clasificación de los pronúcleos se basa en el tamaño, número y distribución de los nucleolos (alineación). Consta de cuatro categorías pronucleares:

1. Igual número de nucleolos alineados en la unión pronuclear; de 3 a 7 en cada pronúcleo, de igual tamaño y con una diferencia menor de uno entre los dos.
2. Igual número de nucleolos dispersos en los pronucleos; de 3 a 7 en cada pronúcleo, de igual tamaño y con una diferencia menor de uno entre los dos.
3. Alineación nucleolar en la unión pronuclear de al menos de uno de los pronucleos, igual o diferente numero de nucleolos e igual o diferente tamaño.
4. Pronucleos de diferente tamaño, o separados, o nucleolos dispersos con diferencia mayor a uno entre los dos.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

PARAMETROS DEL EMBRION EN EL DIA DOS

NÚMERO DE BLASTÓMERAS: Número de blastómeras observadas en el segundo día después de la fertilización.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

NÚMERO DE BLASTÓMERAS NUCLEADAS: Número de blastómeras con presencia de núcleo en su interior.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

NÚMERO DE BLASTÓMERAS MONONUCLEADAS: Número de blastómeras nucleadas con presencia de un solo núcleo.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

NÚMERO DE BLASTÓMERAS MULTINUCLEADAS: Número de blastómeras nucleadas con presencia de múltiples núcleos.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

FRAGMENTACION: Número de cuadrantes dentro del embrión con presencia de fragmentos. Para fines de este estudio, dividiremos al embrión en cuatro cuadrantes.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

PARAMETROS DEL EMBRION EN EL DIA DOS

GROSOR DE LA ZONA PELUCIDA: Cuantificación del ancho de la zona pelucida, medido en mm en su zona más gruesa.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

TAMAÑO DE BLASTÓMERAS: Blastómeras equicorporales (de igual tamaño) dentro del embrión.

1. Equicorporal: Blastómeras de igual tamaño.
2. No equicorporales: Blastómeras de diferente tamaño.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE EMBRIONES EN DIA DOS:

1. GRADO I: Embrión con 4 blastómeras equicorporales con adecuado contacto entre las células sin blastómeras multinucleadas y con menos del 10% de fragmentación.
2. GRADO II: Embrión con 4 blastómeras simétricas con 10 a 20 % de fragmentación o con falta de adecuado contacto entre las células sin blastómeras multinucleadas.
3. GRADO III: De 2 a 3 blastómeras, ó 4 blastómeras con 20% de fragmentación, ó blastómeras asimétricas; ninguna multinucleada.
4. GRADO IV: Más de 4 blastómeras ó 2 a 4 blastómeras con > de 20% de fragmentación ó blastómeras asimétricas ó blastómeras multinucleadas.
5. GRADO V: Menos de dos blastómeras con fragmentación severa ó con la mitad de las blastómeras presentes multinucleadas.

1 Excelente	2 Muy Bueno	3 Bueno	4 Regular	5 Malo

Comentarios

ANEXO 2

Instrumento para valorar las características morfológicas de ovocitos, cigoto y embrión preimplantatorio

Edad: _____ Sexo: _____ Profesión: _____ Años ejerciéndola: _____

PARÁMETROS OVOCITARIOS

Marque con una X el estadio al que corresponde cada uno de los casos que se le presentan.

CONCEPTOS	CASOS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
OVOCITO EN PROFASE I: Aquellos con corona compacta formando una capa densa (oscura) alrededor del ovocito, antes de ser denudado. Se observa vesícula germinal y citoplasma granuloso en el interior del ovocito.																				
OVOCITO EN METAFASE I: Aquellos con corona radiada semicompacta, es decir, con inicio de dispersión (pequeños espacios entre sus células), antes de ser denudado. No se observa vesícula germinal o cuerpo polar. Citoplasma granuloso central u homogéneo.																				
OVOCITO EN METAFASE II MADURO: Aquellos con corona radiada grande, expandida (con espacios entre las células en forma de rayos), pudiendo observarse los límites del ovocito, antes de ser denudado. Se puede observar el primer cuerpo polar y citoplasma homogéneo.																				
OVOCITO EN METAFASE II POSTMADURO: Corona casi ausente o ausente. Citoplasma muy transparente o fragmentado. El ovocito puede observarse con nitidez. Puede identificarse el primer cuerpo polar, el cual, en ocasiones está fragmentado.																				

GRACIAS POR SU AYUDA

PARÁMETROS DEL CIGOTO

Conteste en el cuadro que corresponde a cada caso lo que se le solicita: porcentaje, número total, medida o el número de una de las opciones que se dan. Si cree que alguna de las definiciones no se aplica a la imagen que observa favor de poner NA (no aplica)

CONCEPTOS	CASOS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
HALO Área citoplasmática periférica libre de granulación.																				
✚ Porcentaje del halo respecto al área total del embrión.																				
✚ Porcentaje del halo respecto a la periferia total del embrión.																				
✚ Cuantificación del ancho del halo en mm en su porción más gruesa.																				
GROSOR DE LA ZONA PELUCIDA Medición del grosor de la zona pelúcida, medido en mm																				
NUMERO DE PRONUCLEO Número de pronúcleos dentro del cigoto.																				
NUMERO DE NUCLEOLOS EN PRONUCLEO MASCULINOS Cantidad de nucléolos dentro del pronúcleo masculino, el cual se define como aquel que presente cuando menos dos de las siguientes tres características: <ul style="list-style-type: none"> ● Pronúcleo de mayor tamaño. ● Pronúcleo con el mayor número de nucléolos. ● Pronúcleo más alejado del cuerpo polar. 																				
NUMERO DE NUCLEOLOS EN PRONUCLEO FEMENINO Cantidad de nucléolos dentro del pronúcleo femenino, el cual se define como aquel que presente cuando menos dos de las siguientes tres características: <ul style="list-style-type: none"> ● Pronúcleo de menor tamaño. ● Pronúcleo con el menor número de nucléolos. ● Pronúcleo más cercano del cuerpo polar. 																				

PARÁMETROS DEL CIGOTO

Conteste en el cuadro que corresponde a cada caso lo que se solicita: porcentaje, número total, medida o el número de una de las opciones que se dan. Si cree que alguna de las definiciones no se aplica a la imagen que observa favor de poner NA (no aplica)

CONCEPTOS	CASOS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
DISTRIBUCIÓN DE NUCLEOLOS: Localización de los nucleólos dentro del pronúcleo. Se subdivide en cuatro parámetros: 1. Alineación vertical de los nucleólos de ambos pronúcleos cerca de la unión pronuclear. 2. Alineación vertical de los nucleólos del pronúcleo masculino cerca de la unión pronuclear con dispersión de los nucleólos del pronúcleo femenino. 3. Alineación vertical de los nucleólos del pronúcleo femenino cerca de la unión pronuclear con dispersión de los nucleólos del pronúcleo masculino. 4. Dispersión de los nucleólos de ambos pronúcleos.																				
TAMAÑO NUCLEOLAR: Equivalencia entre el tamaño nucleolar de ambos pronúcleos. Se divide entonces en dos: 1. Nucleólos equicorporales (igual tamaño entre los nucleolos de un pronúcleo) en ambos pronúcleos. 2. Nucleólos equicorporales en el pronúcleo masculino y no equicorporales (diferente tamaño entre los nucleólos de un pronúcleo) en el femenino. 3. Nucleólos equicorporales en el pronúcleo femenino y no equicorporales (diferente tamaño entre los nucleólos de un pronúcleo) en el masculino. 4. Nucleólos no equicorporales en ambos pronúcleos.																				
TAMAÑO PRONUCLEAR: Equivalencia entre el tamaño pronuclear dentro del cigoto. Se divide entonces en dos: 1. Equicorporales (de igual tamaño entre los pronúcleos del ovocito fertilizado). 2. No equicorporales (de diferente tamaño entre los pronúcleos del ovocito fertilizado).																				
SITUACION PRONUCLEAR: Relación que guardan los pronúcleos entre ellos. 1. Conglomerados. 2. Dispersos.																				

PARÁMETROS DEL CIGOTO

Conteste en el cuadro que corresponde a cada caso lo que se solicita: porcentaje, número total, medida o el número de una de las opciones que se dan. Si cree que alguna de las definiciones no se aplica a la imagen que observa favor de poner NA (no aplica)

CONCEPTOS	CASOS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
ALINEACIÓN DEL CUERPO POLAR: Localización en grados de una línea imaginaria trazada en la unión pronuclear en relación con un eje que pase de la mitad del cigoto al cuerpo polar.																				
CLASIFICACIÓN DE SCOTT: 1. Igual número de nucleolos alineados en la unión pronuclear; de 3 a 7 en cada pronúcleo, de igual tamaño y con una diferencia menor de uno entre los dos. 2. Igual número de nucleolos dispersos en los pronucleos; de 3 a 7 en cada pronúcleo, de igual tamaño y con una diferencia menor de uno entre los dos. 3. Alineación nucleolar en la unión pronuclear de al menos de uno de los pronucleos, igual o diferente numero de nucleolos e igual o diferente tamaño. 4. Pronucleos de diferente tamaño, o separados, o nucleolos dispersos con diferencia mayor a uno entre los dos.																				

GRACIAS POR SU AYUDA

PARAMETROS DEL EMBRION EN EL DIA DOS

CONCEPTOS	CASOS																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
NÚMERO DE BLASTÓMEROS: blastómeros observados en el segundo día después de la fertilización.																				
NÚMERO DE BLASTÓMEROS NUCLEADOS: Número de blastómeros con presencia de núcleo en su interior.																				
NÚMERO DE BLASTÓMEROS MONONUCLEADOS: blastómeros con presencia de un solo núcleo.																				
NÚMERO DE BLASTÓMEROS MULTINUCLEADOS: blastómeros con presencia de múltiples núcleos.																				
FRAGMENTACION: Dividiendo el embrión en cuadrantes. Mencione el número de cuadrantes con presencia de fragmentos.																				
GROSOR DE LA ZONA PELUCIDA: Cuantificación del ancho de la zona pelucida. En mm																				
TAMAÑO DE BLASTÓMERAS: 1. Equicorporal: Blastómeras de igual tamaño. 2. No equicorporales: Blastómeros de diferente tamaño.																				
CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA: 1. Embrión con 4 blastómeros equicorporales con adecuado contacto entre las células, sin blastómeros multinucleadas y con <10% de fragmentación. 2. Embrión con 4 blastómeros simétricas con 10 a 20 % de fragmentación o con falta de adecuado contacto entre las células sin blastómeros multinucleados. 3. De 2 a 3 blastómeros, ó 4 blastómeros con 20-30% de fragmentación, ó blastómeros asimétricas; ninguno multinucleado. 4. Más de 4 blastómeros ó 2 a 4 blastómeros con > de 30% de fragmentación ó blastómeros asimétricas ó blastómeros multinucleados. 5. Menos de dos blastómeros con fragmentación severa ó con la mitad de los blastómeros multinucleados.																				

BIBLIOGRAFÍA

1. Centers for Disease Control and Prevention. 2001 Assisted Reproductive Technology (ART) Report: Assisted Reproductive Technology and Success Rates. Accessed June 25, 2005. Obtenido de: <http://www.cdc.gov/reproductivehealth/ART01/index.htm>
2. Speroff L. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 7ma. Edición Filadelfia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. p. 233-248.
3. Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. Hum Reprod 2007;22:230-40.
4. Veeck L. Oocyte assessment and biological performance. Ann N Y Acad Sci. 1988;541:259-74.
5. Scott L, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfer the day following oocyte retrieval. Hum Reprod 1998; 13:1003-13.
6. 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: 1318-23.
7. Larsen R, Kronenber H, Melmed S, Polonsky K. Williams Textbook of Endocrinology, 10a. Edición. Filadelfia: Editorial Saunders; 2003. p.1250-1296.
8. Talbot P. Sperm penetration through oocyte investments in mammals. Am J Anat. 1985;174:331-46.
9. Rankin T, Dear J. The zona pellucida: using molecular genetics to study the mammalian egg coat. Rev Reprod 2000;5:114–21.
10. Levron J, Willadsen S, Munne S, Cohen J. Formation of male pronuclei in partitioned human oocytes. Biol Reprod 1995;53:209-13.
11. Scott L. Analysis of fertilization. En Gardner D, Weissman A, Howles C, Shoham Z. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. 2° ed. Filadelfia: Taylor & Francis Group, 2004: 201-10.
12. Nagy Z. Evaluación del cigoto humano. Anomalías en la fecundación. Factores predictivos de la implantación. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Reproducción humana. Madrid 2° ed. Editorial McGraw – Hill Interamericana, 2002: 455-62.
13. Cobo A, Romero J, Herrer R, Pérez – Cano I, Remohí J. Laboratorio de fecundación in vitro. En: Remohí J, Romero J, Pellicer A, Simón C, Navarro J. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 1° ed. Editorial McGraw – Hill Interamericana, 2000: 207-30.

14. Levron J, Munne S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. *Biol Reprod* 1995;52:653-7.
15. Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1998;4:842-55.
16. Sadowy S, Tomkin G, Munne S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. *Zygote* 1998;6:137-41.
17. 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: 2394-403.
18. Gámiz P, Rubio C, De los Santos J, Mercader A, Simón C, Remohí J, Pellicer A. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage – stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 2413-9.
19. Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* 2003; 80: 341-9.
20. Scott L. The biological basis of non – invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 237-49.
21. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Wiesinger R, Puchner M, Tews G. Presence, but not type or degree of extensión, of a cytoplasmic halo has a significant influence on preimplantation development and implantation behaviour. *Hum Reprod* 2003;18:2406-12.
22. Garello C, Baker H, Rai J, Montgomery S, Wilson P, Kennedy C, Hartshorne G. Pronuclear orientation, polar body placement, and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection and in Vitro fertilization: further evidence for polarity in human oocytes?. *Hum Reprod* 1999;14:2588-95.
23. Kattera S, Chen C. Developmental potential of human pronuclear zygotes in relation to their pronuclear orientation. *Hum Reprod* 2004; 19: 294-9.
24. Eggcyte, Database for Clinical Embryology 1995 to 2000, Art Inst of NY & NJ, Livingston, New Jersey, Tomkin G, Cohen J.
25. Magli C, Gianaroli L, Ferraretti A, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril* 2007;87:534-41.
26. Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod* 2002;17:1513-8.
27. Krizanovská K, Ulcová-Gallová Z, Bouse V, Svábek L, Rokyta P, Rokyta Z. Análisis of the zona pellucida in human oocytes and embryos in an assisted reproduction program. *Ceska Gynekol* 2002;67:197-202 (resumen).

28. Sandalinas M., Sadowy S., Calderon G., Escudero T., Alikani M., Cohen J., Munné S. Survival of chromosome abnormalities to blastocyst stage. Hum.Reprod. ESHRE Abstracts. Bologna. 2000.
29. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi J, Mack C, Scott R. Human embryo fragmentation in Vitro and its implications for pregnancy and implantation 1999;71:836-42
30. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. Hum Reprod 1999;14:429-47.
31. Remohí J, Cobo A, Romero J, Pellicer A, Simón C. Manual práctico de esterilidad y reproducción humana. 2ª. Edición. Madrid: Mc Graw Hill; 2005. p. 336-46.
32. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. Hum Reprod 1987; 2: 705-8.
33. 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: 123-6.
34. Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Hum Reprod 1997; 12: 800-4.
35. Gardner DK, Vella P, Lane M. Culture and transfer of blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfer. Fertil Steril 1998; 69: 84-8.
36. Gianaroli I, mAGLI M, Ferraretti A, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. Hum Reprod 2007;22:241-9.
37. Nicoli A, Valli B, Di Girolamo R, Di Tommaso B, Gallinelli A, La Sala G. Limited importance of pre embryo pronuclear morphology (zygote score) in assisted reproduction outcome in the absence of embryo cryopreservation. Fertil Steril 2007 in press.
38. Arroyo G, Veiga A, Santaló J, Barri P. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring. J Assist Reprod Genet 2007;24:173-81.
39. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, Royere D. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential. A prospective study based on 4042 embryos. Hum Reprod 2007;22:1973-81.
40. Zaino RJ, Kauderer J, Trimble CL, Silverberg SG, Curtin JP, Lim PC, Gallup DG. Reproducibility of the diagnosis of atypical endometrial hyperplasia: a Gynecologic Oncology Group study. Cancer 2006;106:729-31.

41. Ertan F, Ertan T, Kiziltan G, Uygucgil H. Reliability and validity of the geriatric depression scale in depression in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:1445-7.
42. Reijman M, Hazes J, Pols H, Bernsen R, Koes B, Bierma-Zeinstra S. Validity and reliability of three definitions of hip osteoarthritis: cross sectional and longitudinal approach. *Ann Rheum Dis* 2004;63:1427-33.
43. Hesselgard K, Larsson S, Romner B, Strömblad L, Reinstrup P. Validity and reliability of the behavioural observational pain scale for postoperative pain measurement in children 1-7 years of age. *Pediatr Crit Care Med* 2007;8:102-8.
44. Baxter B, Mayer J, Shipley S, Catherino W. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril* 2006;86:1608-15.
45. Arce J, Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgård L, Sorensen P. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. *Hum Reprod* 2006;21:2141-8.
46. Trochim W. Measurements. *Research Methods Knowledge Base*. Obtenido en: <http://www.socialresearchmethods.net/kb/intval.php>
47. Cañedo L. *Investigación clínica*. México: Editorial Interamericana; 1987. p.113-24
48. Sánchez R, Echeverri J. Validación de escalas de medición en salud. *Rev. salud pública* 2004;6:302-318.
49. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics*. 6ta. Edición. Belmont: Thomson Brooks/Cole; 2006. p.441-6.
50. Universidad de Cádiz. *Guía para el análisis de datos. Análisis de correlación lineal*. Cádiz;2002.p.323-335. Obtenido de: <http://www2.uca.es/serv/ai/formacion/spss/Imprimir/17corlin.pdf>
51. Dawson B, Trapo R. *Basic and clinical biostatistics*. 4ta. Edición. Nueva York: Editorial Mc Graw Hill; 2004. p. 287-99.
52. Barroso G. Contribution of the male gamete to fertilization and embryogenesis. En Kruger T, Oehninger S. *Male Infertility: Diagnosis and Treatment*. Londres; Editorial Informa; 2007. p. 49-61.
53. Wiker S, Malter H, Wright G, Cohen J. Recognition of paternal pronuclei in human zygotes. *J In Vitro Fert Embryo Transf*. 1990;7:33-7.