



Microscopia de luz polarizada para evaluación de ovocitos como factor pronóstico en la evolución de un ciclo de reproducción asistida

González-Ortega C,¹ Cancino-Villarreal P,¹ Alonzo-Torres VE,¹ Martínez-Robles I,¹ Pérez-Peña E,² Gutiérrez-Gutiérrez AM¹

Resumen

ANTECEDENTES: en técnicas de reproducción asistida la identificación de los mejores embriones para transferir es decisiva. En la última década se han evaluado varios criterios morfológicos para ovocitos y embriones en relación con su potencial para predecir la viabilidad. La introducción de la microscopia de luz polarizada permite la visualización del huso meiótico y de las diferentes capas que conforman la zona pelúcida en ovocitos humanos con base en su birrefringencia de una manera no invasiva. Se reportan resultados contradictorios respecto del valor predictivo en ciclos de ICSI.

OBJETIVO: examinar la capacidad predictiva de la visualización del huso meiótico y la birrefringencia de la zona pelúcida en relación con la calidad ovocitaria y los resultados de ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio prospectivo y observacional efectuado para evaluar la visualización del huso meiótico, la birrefringencia de la zona pelúcida y correlacionar estos elementos con los resultados de ICSI.

RESULTADOS: se incluyeron 94 ciclos y se analizaron 903 ovocitos que se compararon mediante visualización del huso meiótico y birrefringencia de la zona pelúcida en mujeres de diferentes edades: se encontró que ambos disminuyen conforme más edad se tiene. La tasa de fertilización fue significativamente mayor en ovocitos con huso meiótico visible *versus* no visible (81.3 vs 64%; $p < 0.0001$). La calidad embrionaria también fue significativamente mayor (47.4 vs 39%; $p < 0.01$). Se observó mayor fertilización en ovocitos con birrefringencia positiva vs birrefringencia negativa (77.5 vs 68.5%; $p = 0.005$) sin diferencias significativas en la calidad embrionaria. Los ovocitos de ciclos gestantes tuvieron mayores valores de birrefringencia de la zona pelúcida y huso meiótico visible que los ciclos no gestantes ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES: la microscopia de polarización mejora la selección de ovocitos lo que se traduce en desarrollo de embriones con mayor potencial de implantación. Su utilidad, aunada a métodos de selección espermiática, cultivo a blastocisto y transferencias diferidas contribuye a transferir menos embriones y acercarse a la transferencia de un solo embrión sin disminuir las tasas de recién nacidos únicos.

PALABRAS CLAVE: microscopia de polarización, birrefringencia, huso meiótico, zona pelúcida.

¹ Química farmacobióloga, Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida, León, Guanajuato, México.

² Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida de Occidente, Guadalajara, Jalisco, México.

Recibido: enero 2016

Aceptado: febrero 2016

Correspondencia

QCB Claudia González Ortega
Plaza las Américas 115
37160 León, Gto. México
gonclau7@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como

González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Alonzo-Torres VE, Martínez-Robles I, Pérez-Peña E, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Microscopia de luz polarizada para evaluación de ovocitos como factor pronóstico en la evolución de un ciclo de reproducción asistida. Ginecol Obstet Mex. 2016 abr;84(4):217-227.

Ginecol Obstet Mex. 2016 Apr;84(4):217-227.

Polarized light microscopy for evaluation of oocytes as a prognostic factor in the evolution of a cycle in assisted reproduction

González-Ortega C,¹ Cancino-Villarreal P,¹ Alonzo-Torres VE,¹ Martínez-Robles I,¹ Pérez-Peña E,² Gutiérrez-Gutiérrez AM¹

Abstract

BACKGROUND: Identification of the best embryos to transfer is a key element for success in assisted reproduction. In the last decade, several morphological criteria of oocytes and embryos were evaluated with regard to their potential for predicting embryo viability. The introduction of polarization light microscopy systems has allowed the visualization of the meiotic spindle and the different layers of the zona pellucida in human oocytes on the basis of birefringence in a non-destructive way. Conflicting results have been reported regarding the predictive value in ICSI cycles.

OBJECTIVE: To assess the predictive ability of meiotic spindle and zona pellucida of human oocytes to implant by polarized microscopy in ICSI cycles.

MATERIAL AND METHODS: Prospective and observational clinical study. 903 oocytes from 94 ICSI cycles were analyzed with polarized microscopy. Meiotic spindle visualization and zona pellucida birefringence values by polarized microscopy were correlated with ICSI cycles results.

RESULTS: Meiotic spindle visualization and birefringence values of zona pellucida decreased in a direct basis with increasing age. In patients aged over the 35 years, the percentage of a visible spindle and mean zona pellucida birefringence was lower than in younger patients. Fertilization rate were higher in oocytes with visible meiotic spindle (81.3 % vs 64%; $p < 0.0001$), as well as embryo quality (47.4 % vs 39%; $p = 0.01$). Fertilization rate was higher in oocytes with positive values of birefringence (77.5 % vs 68.5% $p = 0.005$) with similar embryo quality. Conception cycles showed oocytes with higher mean value of zona birefringence and visible spindle vs no-conception cycles ($p < 0.05$).

CONCLUSIONS: Polarized light microscopy improves oocyte selection, which significantly impacts in the development of embryos with greater implantation potential. The use of polarized light microscopy with sperm selection methods, blastocyst culture and deferred embryo transfers will contribute to transfer fewer embryos without diminishing rates of live birth and single embryo transfer will be more feasible.

KEY WORDS: Polarization microscopy; birefringence; spindle; zona pellucida

¹Química farmacobióloga, Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida, León, Guanajuato, México.

²Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida de Occidente, Guadalajara, Jalisco, México.

Correspondence

QCB Claudia González Ortega
Plaza las Américas 115
37160 León, Gto. México
gonclau7@yahoo.com.mx



ANTECEDENTES

La selección de embriones con mayor potencial de implantación ha sido uno de los mayores retos en reproducción asistida, por su repercusión en las tasas de recién nacidos únicos sanos. Al inicio, la transferencia de múltiples embriones se utilizó para maximizar las tasas de embarazo, desafortunadamente también las de embarazos múltiples. En la actualidad se han propuesto varios métodos para identificar al mejor embrión a transferir y muchos de ellos se basan en la búsqueda de factores pronósticos relacionados con las características morfológicas y funcionales de los gametos. Por lo que hace a los espermatozoides se han propuesto: la inyección intracitoplasmática de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI),¹ la utilización de columnas de anexina (MACS), la selección de espermias con ácido hialurónico (PICS), entre otras.

Para seleccionar los mejores ovocitos y poder predecir la calidad ovocitaria, la tasa de fertilización y el desarrollo embrionario, la mayor parte de las evaluaciones toman en cuenta el tamaño, la forma del cuerpo polar, granularidad citoplasmática, dismorfismos ovocitarios extra e intracelulares, grosor y coloración de la zona pelúcida y el aspecto del espacio perivitelino.² Sin embargo, el valor predictivo del criterio utilizado en estos estudios sigue siendo motivo de controversia.

La microscopia de polarización³ es una técnica no invasiva para evaluar ovocitos humanos. El análisis por imagen del huso meiótico con la microscopia de luz polarizada mejora el estudio no invasivo de la arquitectura de los ovocitos humanos vivos sin afectar su viabilidad.^{3,4} Esta técnica no requiere preparación previa, como fijación o tinción. Permite visualizar y medir estructuras birrefringentes dinámicamente en células vivas. Cuando dos rayos de luz polari-

zada pasan a través de estructuras filamentosas sumamente ordenadas, como el huso meiótico compuesto por microtúbulos, éstas sufren una desaceleración y el cambio resultante se mide y cuantifica.³ Este valor es directamente proporcional a la densidad de los microtúbulos.⁵

La capa interna de la zona pelúcida es la que emite la mayor cantidad de birrefringencia. Ésta es una propiedad óptica inherente de las moléculas altamente ordenadas, como los microtúbulos del huso meiótico y las glicoproteínas filamentosas que forman la estructura trilaminar de la zona pelúcida. Cuando estas estructuras se iluminan con la luz polarizada del microscopio, se visualizan como estructuras brillantes. El reflejo luminoso se mide y cuantifica con un sistema de cómputo de análisis de imagen.⁴

Los estudios publicados de microscopia de polarización con ovocitos con huso meiótico visible o con birrefringencia en el mismo o en la capa interna de la zona pelúcida en ciclos de ICSI, son contradictorios respecto del valor predictivo. Algunos muestran incremento en las tasas de fertilización,^{6,7} calidad embrionaria,^{8,9,10} formación de blastocistos,^{6,9} y de embarazo,^{9,10,11} mientras que otros no encuentran diferencias o sólo en alguno de los parámetros analizados.^{7,8,12-15}

Esta controversia se explica, en parte, por la naturaleza sumamente dinámica del huso meiótico durante la maduración del ovocito. En un estudio realizado por Montag se examinó la transición de metafase I a metafase II en ovocitos humanos mediante *time lapse*,¹⁶ y se observó que algunos ovocitos clasificados como metafase II, basados en la presencia del primer cuerpo polar por microscopia de luz convencional, al observarlos con microscopia de polarización estaban en telofase I temprana, con una parte del huso meiótico aún unido al cuerpo polar y al ooplasma. Este estudio también reveló que, por un tiempo considerable, el huso meiótico

desaparece en la telofase I y se vuelve a formar alrededor de 40-60 minutos más tarde, lo que explica los resultados contradictorios asentados en la bibliografía. Es importante considerar la susceptibilidad del huso meiótico según las condiciones externas, como: temperatura, pH y daño mecánico debido al pipeteo agresivo durante la denudación del ovocito.⁷ En estudios basados en la evaluación de la estructura del huso meiótico es indispensable el estricto control de tales variables.⁶

El objetivo de este estudio fue: examinar la capacidad predictiva del huso meiótico y los valores de birrefringencia de la capa interna de la zona pelúcida en relación con la calidad ovocitaria y su correlación con los resultados de ICSI.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo y observacional del análisis de ciclos de ICSI. La estimulación ovárica se efectuó con FSH recombinante (Gonal-F; Serono, México) y se inició el segundo día de la menstruación con 300 UI subcutáneas diarias. Todos los ciclos se realizaron con un protocolo flexible de antagonistas de la GnRH (Cetrotide; Serono, México). Cuando dos folículos alcanzaban 14 mm de diámetro se iniciaba la aplicación diaria subcutánea. La monitorización del desarrollo folicular se efectuó con ultrasonidos vaginales. El disparo de la ovulación se realizó cuando se detectó, al menos, 1 folículo de 20 mm de diámetro con hGC recombinante (Ovidrelle; Serono, México); 36 h después se efectuó la aspiración folicular por medio de punción transvaginal guiada por ultrasonido.

Después de identificar los complejos ovocito-corona-cúmulus se lavaron en HTF con hepes (Lifeglobal) complementado al 5% de HSA y conservados en un ambiente de 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% N₂, a 37 °C. Dos horas después de la captura ovular se removieron las células

del cúmulus con 80 UI/mL de hialuronidasa (invitrocare) y pipeteo mecánico; los ovocitos se evaluaron para su maduración como: 1) Vesícula germinal (VG), con una VG intacta; 2) Metafase I (MI) con ausencia de vesícula germinal o del primer cuerpo polar (CP) y 3) Metafase II, con el primer cuerpo polar. Los ovocitos se mantuvieron en medio global (Lifeglobal) complementado con 5% de HSA y se colocaron en la incubadora durante una hora antes de evaluar la existencia (Figura 1) o no (Figura 2) del huso meiótico, medir la birrefringencia de la zona pelúcida y catalogarla como positiva o negativa (Figuras 3 y 4).

Visualización del huso y medición de la birrefringencia de la zona pelúcida

Para evaluar la existencia o no del huso meiótico y medir la birrefringencia de la zona pelúcida se colocaron individualmente solo los ovocitos en estadio de MII en gotas de 5 mL de HTF con hepes (Lifeglobal) en una placa con fondo de cristal (FluoroDish) cubierta con parafina líquida, al menos una hora después de decumularse. Las imágenes se analizaron con un microscopio invertido (Olympus IX71, Tokio, Japón) equipado con un programa de imágenes (OCTAX EyeWare with PolarAide). Para la medición fue indispensable mantener un estricto control de la temperatura de la platina térmica del microscopio invertido a 37°C.

Para valorar la existencia o ausencia del huso meiótico fue necesario utilizar micropipetas de *holding* y de ICSI para rotar el ovocito hasta colocarlo con el cuerpo polar a las 6 horas, hasta corroborar la presencia (Figura 1) o ausencia del huso meiótico (Figura 2). Inmediatamente después se midió la birrefringencia de la capa interna de la zona pelúcida con la función automática del programa de cómputo, que calcula en tiempo real la puntuación de la birrefringencia de la capa interna de la zona pelúcida basada



en su intensidad y distribución en 180 puntos distintos (Figuras 3 y 4).

Para determinar la capacidad predictiva de la microscopia de polarización en los ovocitos estudiados se consideraron los siguientes parámetros:

- 1) Presencia o ausencia del huso meiótico y su correlación con la tasa de fertilización y buena calidad embrionaria de los ovocitos micro-inyectados (n= 903).
- 2) Visibilidad o no del huso meiótico en mujeres de diferentes grupos de edad (menores de 30, 30-35, 36-40 y mayores de 40 años) y su correlación con los resultados de embarazo e implantación.
- 3) Valores de birrefringencia de la zona pelúcida en mujeres de diferentes grupos de edad (menores de 30, 30-35, 36-40 y mayores de 40 años) y su correlación con los resultados de embarazo e implantación.
- 4) Mediciones de birrefringencia de la zona pelúcida y su correlación con la tasa de

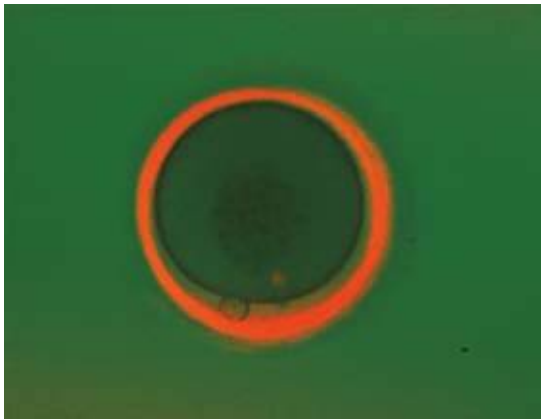


Figura 1. Huso meiótico visible.



Figura 3. Birrefringencia positiva de la zona pelúcida.

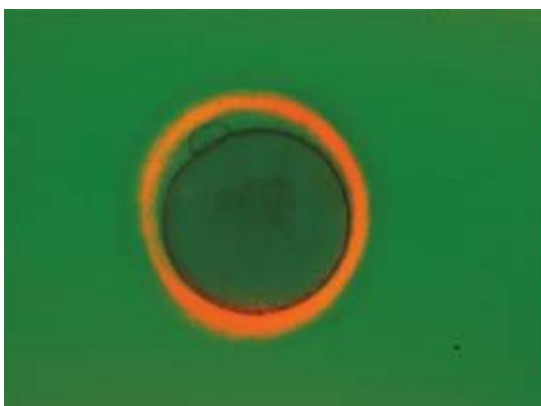


Figura 2. Huso meiótico no visible.



Figura 4. Birrefringencia negativa de la zona pelúcida.

fertilización y buena calidad embrionaria de todos los ovocitos microinyectados (n=903).

- 5) Comparar la visualización del huso meiótico y los valores de birrefringencia en ciclos gestantes y no gestantes.

ICSI, cultivo y transferencia embrionaria

El ICSI se realizó según nuestra técnica descrita previamente¹⁷ con el cuerpo polar colocado a las 6 horas, excepto los óvulos en los que el huso meiótico no estaba adyacente al cuerpo polar. En esos casos se rotaron para evitar el daño del huso. Los ovocitos inyectados se cultivaron individualmente en microgotas de 20 mL de *global* (Lifeglobal) cubiertas con parafina líquida e incubados en un ambiente de 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% N₂ a 37 °C. La fertilización se evaluó entre 16 y 18 horas después del ICSI y los ovocitos con 2 pronúcleos y extrusión del segundo cuerpo polar se consideraron con fertilización normal. La calidad embrionaria se evaluó en día 2 y 3 y se registraron los siguientes parámetros: número de blastómeras, porcentaje de fragmentación, variación en la simetría de las blastómeras y multinucleación. De acuerdo con este criterio, los embriones se consideraron de buena calidad cuando tuvieron cuatro blastómeras simétricas en día 2 y de 6 a 8 en día 3 y menos de 20% de fragmentación en ambos días, así como ausencia de multinucleación. En todos los casos la transferencia embrionaria se efectuó en día 3.

Soporte de fase lútea

En caso de embarazo se indicó la administración de progesterona intramuscular en dosis de 50 mg al día con inicio a las 24 horas de haber realizado la aspiración folicular y manteniendo el soporte hasta las 9-12 semanas de gestación. Se consideró un grosor endometrial de al menos 8 mm para considerarlo adecuado para la transferencia embrionaria.

El embarazo clínico se definió como: gonadotropina coriónica humana positiva y la existencia de, al menos, un saco gestacional con latido cardíaco fetal por ultrasonido. Se definió como aborto a la pérdida del embarazo antes de las 24 semanas de gestación.

La tasa de implantación se calculó con el número de sacos gestacionales implantados dividido entre el número total de embriones transferidos.

Las variables continuas se presentan como la media \pm desviación estándar (DE) y sus diferencias se analizaron con t de Student pareada. Las variables categóricas se presentan como porcentajes y sus diferencias se analizaron con una tabla de contingencia 2x2 con χ^2 . Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El análisis se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism software versión 6.0.

RESULTADOS

Se analizaron los ovocitos y los resultados de 94 pacientes aptas para ICSI por diversas indicaciones; solo se incluyeron ciclos con óvulos propios y se excluyó la donación de óvulos.

1) Evaluación de la visibilidad del huso meiótico en mujeres de diferentes grupos de edad (menores 30, 30-35, 36-40 y mayores de 40 años) y su correlación con los resultados de embarazo e implantación.

Al comparar la visualización del huso meiótico en mujeres de diferentes grupos de edad se encontró que disminuye a mayor edad; en mujeres menores de 30 años se detectó el huso meiótico en 84% de los ovocitos, en mujeres de 30-35 años 69%, en el grupo de 36-40 el 57%, mientras que en mujeres mayores de 40 años solo fue visible en 42.8%. La incidencia de huso meiótico indetectable se incrementa a mayor edad de la



mujer y las tasas de embarazo e implantación disminuyen (Cuadro 1).

2) *Correlación entre la presencia o ausencia del huso meiótico con la tasa de fertilización y buena calidad embrionaria de todos los ovocitos microinyectados.*

El huso meiótico se detectó en 63% de los ovocitos MII microinyectados (n=903). Después del ICSI, la tasa de fertilización fue significativamente mayor en ovocitos con huso meiótico visible (81.3%) comparado con ovocitos sin huso meiótico detectable 64%; ($p<0.0001$). La calidad embrionaria también fue significativamente mayor con huso meiótico visible que con huso meiótico no visible (47.4 vs 39%), $p=0.01$ (Cuadro 2).

3) *Correlación de los valores de birrefringencia de la zona pelúcida en mujeres de diferentes grupos de edad (menores de 30, 30-35, 36-40*

y mayores de 40 años) y su correlación con los resultados de embarazo e implantación.

Al comparar los valores de birrefringencia en mujeres de diferentes grupos de edad se encontró que éstos disminuyen conforme avanza la edad, en mujeres menores de 30 años la media de birrefringencia fue de 12.9 ± 11.49 , en mujeres de 30-35 años 9.6 ± 13.2 ; en el grupo de 36-40 de 6.39 ± 11.81 y en mujeres mayores de 40 años de 3.01 ± 9.3 ; los valores disminuyen conforme avanza la edad así como también las tasas de embarazo e implantación (Cuadro 3).

4) *Valores de birrefringencia de la zona pelúcida con la tasa de fertilización y buena calidad embrionaria de todos los ovocitos microinyectados*

Cuando comparamos las tasas de fertilización de los ovocitos con base en su birrefringencia, encontramos mayores tasas de fertilización en ovocitos con birrefringencia positiva vs birre-

Cuadro 1. Visibilidad del huso meiótico en mujeres de diferentes grupos de edad (menos de 30, 30-35, 36-40 y mayores de 40 años) y su correlación con los resultados de embarazo e implantación.

Grupos de edad	Huso meiótico visible	Tasa de embarazo	Tasa de implantación
<30	32/38 (84%)	8/15 (53.3%)	11/38 (29%)
30-35	54/78 (69%)	16/32 (50%)	16/78 (20.5%)
36-40	58/101 (57%)	21/39 (53.8%)	24/101 (23.7%)
>40	9/21 (42.8%)	2/8 (25%)	2/21 (9.5%)

Cuadro 3. Correlación de los valores de birrefringencia de la zona pelúcida en mujeres de diferentes grupos de edad (menores de 30, 30-35, 36-40 y mayores de 40 años) y su correlación con los resultados de embarazo e implantación.

Grupos de edad	Valor de birrefringencia (x)	Tasa de embarazo	Tasa de implantación
<30	12.97 ± 11.49	8/15 (53.3%)	11/38 (29%)
30-35	9.57 ± 13.19	16/32 (50%)	16/78 (20.5%)
36-40	6.39 ± 11.81	21/39 (53.8%)	24/101 (23.7%)
>40	3.01 ± 9.3	2/8 (25%)	2/21 (9.5%)

Cuadro 2. Correlación entre la presencia o ausencia del huso meiótico con la tasa de fertilización y buena calidad embrionaria de todos los ovocitos microinyectados.

Huso meiótico (n=903)	%	Fertilización (%)	Buena calidad embrionaria	(x) edad
Visible	569/903 (63%)	463/569 (81.3%) $p<0.0001$	270/569 (47.4%) $P=0.01$	33.8 ± 4.28
No visible	334/903 (36.9%)	215/334 (64%)	131/334 (39%)	34.74 ± 3.97

fringencia negativa (77.5 vs 68.5% $p=0.005$); sin encontrar diferencias significativas en los dos grupos en la calidad embrionaria $p=0.77$ (Cuadro 4).

5) El análisis comparativo de los ciclos gestantes y no gestantes

El análisis cuantitativo de birrefringencia de la zona pelúcida y visualización del huso meiótico fue mayor en los ovocitos de ciclos gestantes vs no gestantes con una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$). La edad materna, número de óvulos obtenidos, tasas de fertilización, división embrionaria y el número de embriones transferidos fueron comparables en ambos grupos. Únicamente se encontró diferencia significativa en el número de ovocitos en metafase II y el número de cigotos por paciente ($p<0.05$) en el grupo de pacientes que lograron embarazo. Estos resultados arrojaron una correlación positiva entre el huso meiótico visible, mayores valores de birrefringencia de la zona pelúcida y tasas de embarazo (Cuadro 5).

DISCUSIÓN

Los parámetros confiables para evaluar la calidad de los ovocitos y mejorar el pronóstico del desarrollo embrionario son en la actualidad algunos de los tópicos más importantes en reproducción asistida. La mayoría de los estudios publicados en la bibliografía se enfocan a marcadores morfológicos del ovocito: tamaño y forma del cuerpo

Cuadro 5. Comparación de los ciclos gestantes y no gestantes

	Ciclos con embarazo	Ciclos sin embarazo	p
Núm. de ciclos	47	47	
Edad materna (x)	35.2 \pm 4.02	34.9 \pm 4.74	Ns
Núm. de ovocitos/paciente (x)	12.78 \pm 6.8	10.8 \pm 6.38	Ns
Ovocitos MII	9.53 \pm 4.85	7.55 \pm 4	<0.05
Ovocitos fertilizados	8.04 \pm 4.36	6.38 \pm 3.43	<0.05
Tasa de fertilización	85.39 \pm 15.89	85.83 \pm 12.52	Ns
Tasa de división	96 \pm 8.46	92.4 \pm 15.85	Ns
Embriones transferidos (x)	2.8 \pm 0.39	2.65 \pm 0.56	Ns
Birrefringencia (x)	11.5 \pm 11.95	6.1 \pm 10.61	<0.05
Huso meiótico visible (x)	88/125 (70.4%)	65/113 (57.5%)	<0.05

polar, inclusiones intracitoplasmáticas como las vacuolas, granularidad, cuerpos refráctiles, espacio perivitelino, apariencia y coloración de la zona pelúcida,^{1,2} etc. Sin embargo, los resultados de estos estudios no son concluyentes. Desde la década pasada, el huso meiótico ha sido intensamente investigado como un posible factor predictivo para selección de ovocitos. La mayoría de los estudios iniciales fueron realizados con microscopia de fluorescencia,⁵ aunque esta técnica ofrece información detallada acerca de los cromosomas y huso meiótico, su uso clínico es limitado por ser una técnica invasiva incompatible con la viabilidad ovular.

Liu y sus colaboradores⁵ observaron que los ovocitos con ausencia de huso meiótico con microscopia de polarización presentaban husos

Cuadro 4. Valores de birrefringencia de la zona pelúcida con la tasa de fertilización y buena calidad embrionaria de todos los ovocitos microinyectados.

Birrefringencia	Cantidad de óvulos analizados (n=903)	Tasa de fertilización	Buena calidad embrionaria	(x) Edad
Positiva	658/903 (72.8%)	510/658 (77.5%) $p=0.005$	294/658 (45%) ns	33.8 \pm 4.28
Negativa	245/903 (27.1%)	168/245 (68.5%)	107/245 (44 %)	35.25 \pm 3.5



desensamblados y cromosomas desalineados cuando se observaban por microscopia confocal, por lo tanto, el uso de microscopia de polarización resulta una herramienta útil para evaluar la normalidad del huso meiótico,¹⁸ lo cual es de suma importancia ya que éste desempeña un papel importante en la meiosis por controlar el movimiento de los cromosomas a través de sus diferentes estadios. Varios autores señalan que la desorganización del huso meiótico da lugar a una inadecuada segregación cromosómica lo que resulta en aneuploidías.¹⁹

La morfología y cinética del huso meiótico varían por factores como edad materna, temperatura y la manipulación del cultivo in vitro. La temperatura es un importante parámetro que afecta la integridad del huso durante su manejo y cultivo de ovocitos in vitro. La exposición prolongada a bajas temperaturas puede desorganizar la estructura del huso meiótico. Esto ha sido confirmado en un reporte realizado por Wang y su grupo.²⁰ Otro estudio reciente de Sun y sus coautores²¹ reporta que el huso meiótico de ovocitos humanos madurados in vitro es también sensible a temperaturas mayores de 37°C. Estos resultados indican que cuando los ovocitos son manipulados in vitro, es indispensable un riguroso control de la temperatura a 37 °C para mantener la integridad del huso y futuro desarrollo embrionario. Para obtener datos confiables, en nuestro estudio se llevó a cabo un estricto control de la temperatura durante el análisis.

La microscopia de luz polarizada para la selección no invasiva de ovocitos ha demostrado ser una herramienta altamente predictiva de calidad en ovocitos humanos, aunque aún hay resultados contradictorios publicados.²²

La birrefringencia del huso meiótico se ha sugerido como predictor de calidad embrionaria.²³ Sin embargo, en ningún estudio se ha estandarizado el momento óptimo de la observación, lo cual re-

sulta de gran importancia debido a que el huso es una estructura altamente dinámica. Sin embargo, algunos estudios han revelado que la mayoría de los husos son visibles a las 39-40 horas después de la aplicación de la HCG y son significativamente menos visibles si la evaluación se realiza una hora antes o después del lapso señalado.²⁴ Con base en ello en nuestro estudio evaluamos la presencia o no del huso meiótico a las 39 horas después de la aplicación de la HCG.

El porcentaje de visualización del huso meiótico en ovocitos madurados in vivo varía entre 63 y 91%.^{12,15} Nuestros resultados muestran 63%. Las diferencias pueden deberse a las variaciones en la población de pacientes o a los protocolos de estimulación ovárica, aunque un aspecto importante es la forma en que se realiza la visualización del huso meiótico. Rienzi en el 2004¹⁵ reportó que la rotación de los ovocitos mejora la detección del huso meiótico, incluso en aquellos ovocitos en los que el huso meiótico no es muy visible, lo que también realizamos en nuestro estudio.

En la mayor parte de las publicaciones, los ovocitos MII con un huso meiótico visible durante la ICSI reportan una tasa de fertilización significativamente mayor como se muestra en el metanálisis de Petersen y su grupo²² y se confirma también en nuestro estudio. Hay observaciones contradictorias con respecto a la visualización del huso meiótico en ovocitos y la subsecuente calidad embrionaria. En unos estudios los ovocitos con huso meiótico visible produjeron significativamente más embriones de buena calidad en día 3 o 5^{7,9,10} que en ovocitos con huso meiótico indetectable, mientras que otros no encontraron esta correlación.^{8,14} En el presente estudio sí observamos mayor tasa de embriones de buena calidad en embriones procedentes de ovocitos con huso meiótico visible, aunque esta correlación no se observó en ovocitos con valores positivos

de birrefringencia en la zona pelúcida. Los resultados contradictorios podrían deberse a los diferentes sistemas de clasificación embrionaria utilizados en los laboratorios de FIV, que son subjetivos y dependientes del criterio del embriólogo que realiza el análisis. Esta nueva tecnología, por ser más objetiva y cuantificable, podría ser de gran utilidad para mejorar la selección de ovocitos en los casos en los que se obtiene un gran número de ellos y por cuestiones éticas e inclusive legales no se fertilizan todos.

La asociación entre tasas de embarazo y presencia o no del huso meiótico se ha revisado con resultados igualmente contradictorios. En un estudio realizado por Chamayou y sus coautores¹³ no encontraron ninguna correlación, mientras que otros mostraron tasas de embarazo e implantación significativamente mayores al transferir únicamente embriones originados de ovocitos con huso meiótico visible.¹² El número de pacientes incluidas en el último estudio fue muy bajo y el metanálisis de Petersen confirma la ausencia de esta correlación.²²

Aunque las bases fisiológicas de estas diferencias observadas en la zona pelúcida aún no se logran explicar completamente, una alta birrefringencia de la capa interna de la zona pelúcida se considera una indicación de una óptima formación de las estructuras ordenadas de las biomoléculas que conforman la zona pelúcida durante la maduración del ovocito. Además de la calidad intrínseca propia de los ovocitos también podría reflejar las condiciones a las que el ovocito fue expuesto durante el desarrollo folicular y maduración. Un ovocito con una alta y uniforme zona birrefringente sugiere haber estado expuesto a mejores condiciones comparado con un ovocito con una estructura "desordenada" de la zona pelúcida, o que de acuerdo con la calidad de cada uno es el grado de tolerancia a las condiciones *in vitro*.

Este estudio comparó los ciclos gestantes y no gestantes y se encontraron mayores valores de birrefringencia de la zona pelúcida y huso meiótico visible en el grupo de pacientes que lograron el embarazo. Otro hallazgo al analizar por grupos de edad fue que la visibilidad del huso meiótico fue disminuyendo a mayor edad de las pacientes, de la misma forma que los valores de birrefringencia, tasas de embarazo e implantación. En este estudio los embriones que se transfirieron se seleccionaron solo con base en la morfología embrionaria sin tomar en cuenta la visualización del huso ni los valores de birrefringencia de la zona pelúcida, por lo que en la mayoría de los casos se realizaron transferencias mixtas. Por esto se considera que un estudio futuro prospectivo, controlado y aleatorizado será más concluyente.

CONCLUSIONES

Nuestro estudio apoya el uso de la microscopia de luz polarizada para mejorar la selección de ovocitos lo que permite desarrollar embriones con mayor potencial de implantación; esto representa una herramienta muy útil para transferir cada vez menos embriones y acercarnos más a la transferencia de un solo embrión.

REFERENCIAS

1. González-Ortega C, Cancino-Villarreal P, Pérez-Torres A, Vargas-Macié MA, Martínez-Garza SG, Pérez-Peña E, Gutiérrez-Gutiérrez AM. Inyección intracitoplásmica de espermatozoides morfológicamente seleccionados (IMSI) vs inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI) en pacientes con falla repetido a ICSI. *Ginecol Obstet Mex* 2010;78:652-659.
2. Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis M, et al. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1999;72: 240-244.
3. Oldebourg R. A new view on polarized microscopy. *Nature* 1996;381:175-208.
4. Keefe D, Liu L, Wang W, Silva C. Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF. *RBM Online* 2003;7:24-29.



5. Liu L, Trimarchi JR, Oldenbourg R, Keefe DL. Increased birefringence in the meiotic spindle provides a new marker for the onset of activation in living oocytes. *Biol Reprod* 2000;63:251-258.
6. Montag M, van der Ven H. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. *RBM Online* 2008;17:454-460.
7. Wang W, Meng L, Hackett R, Keefe D. Developmental ability of human oocytes with or without birefringent spindles imaged by Polcoscope before insemination. *Hum Reprod* 2001;16:1464-1468.
8. Cohen Y, Malcov M, Schwartz T, Mey-Raz N, Carmon A, Cohen T, Lessing J, Amit A, Azem F. Spindle imaging: a new marker for optimal timing of ICSI? *Hum Reprod* 2004;19:649-654.
9. Moon J, Hyun C, Lee S, Son W, Yoon S, Lim J. Visualization of the metaphase II meiotic spindle in living human oocytes using the Polcoscope enables the prediction of embryonic developmental competence after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18: 817-820.
10. Rama Raju G, Prakash G, Krishna K, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using Polscope imaging. *RBM Online* 2007;14:166-174.
11. Shen Y, Stalf T, Mehnert C, De Santis L, Cino I, Tinneberg H, Eichenlaub-Ritter U. Light retardance by human oocyte spindle is positively related to pronuclear score after ICSI. *RBM Online* 2006;12:737-751.
12. Madaschi C, de Souza Bonetti T, de Almeida Ferreira Braga D, Pasqualotto F, Iaconelli AJ, Borges EJ. Spindle imaging: a marker for embryo development and implantation. *Fertil Steril* 2008;90:194-198.
13. Chamayou S, Ragolia C, Alecci C, Storaci G, Maglia E, Russo E, Guglielmino A. Meiotic spindle presence and oocyte morphology do not predict clinical ICSI outcomes: a study of 967 transferred embryos. *RBM Online* 2006;13:661-667.
14. Woodward B, Montgomery S, Hartshorne G, Campbell K, Kennedy R. Spindle position assessment prior to ICSI does not benefit fertilization or early embryo quality. *RBM Online* 2008; 16:232-238.
15. Rienzi L, Ubaldi F, Martínez F, et al. Relationship between meiotic spindle location with regard to polar body position and oocyte developmental potential after ICSI. *Hum Reprod* 2003;18:1289-1293.
16. Montag M, Schimming T, Van der Ven et al. Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *RBM Online* 2006; 12: 442-446.
17. Gutiérrez G AM, González OC, Cancino VP, Tovar CG, Garza MA, Pérez-Peña E. En: Delgado UJ, Fernández del Castillo C. *Ginecología y Reproducción Humana. Temas seleccionados. Capítulo: Micromanipulación de Gametos. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia* 2006;381-393.
18. Trimarchi JR, Karin RA, Keefe DL. Average spindle retardance observed using the polscope predicts cell number in day 3 embryos. *Fertil Steril* 2004;82 (Suppl. 2): S268.
19. Pickering SJ, Johnson MH, Brude PR, Houliston E. Cytoskeletal organization in fresh aged and spontaneously activated human oocytes. *Hum Reprod* 1988;3: 978-989.
20. Wang W, Keefe DL. Prediction of chromosome misalignment among in vitro matured human oocytes by spindle imaging with the polscope. *Fertil Steril* 2002;78:1077-1081.
21. Sun XF, Wang WH, Keefe DL. Overheating is detrimental to meiotic spindles within in vitro matured human oocytes. *Zygote* 2004;12:65-70.
22. Petersen C, Oliveira J, Mauri A, Massaro F, Baruffi R, Pontes A, Franco JJ. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. *RBM Online* 2009;18:235-243.
23. De Santis L, Cino L, Rabellotti E et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *RBM Online* 2005; 11, 36-42.
24. Kilani S, Cooke S, Chapman M. The change of the meiotic spindle over time—a possible marker to optimise ICSI? *The Australian and New Zealand J Obstet Gynaecol* 2006;46 (s2), A14.