	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 1 de 7

## 1. OBJETIVO

Evaluar el éxito de las técnicas de fertilización In vitro convencional o Inyección Intracitoplasmática, determinando si se produjo fecundación de los óvulos.

## 2. ALCANCE

Desde el momento de inseminar o microinyectar óvulos hasta las 19 horas pos inseminación

## 3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo está orientado para el personal profesional del laboratorio de Embriología.

## 4. RESPONSABLE

- Embriólogo

## 5. DEFINICIÓN

Habitualmente se ha considerado la observación del estadio de cigoto como una herramienta útil sólo para identificar fallos o alteraciones de la fecundación. Sin embargo, el proceso de fecundación supone una serie ordenada de cambios morfológicos que afectan notablemente al aspecto celular y que pueden dar información de utilidad.

Antes de la transferencia de embriones, es importante determinar si los óvulos fueron correctamente fecundados, de modo a asegurar que los embriones transferidos son diploides y de la mejor calidad posible.

Considerándose un óvulo correctamente fecundado cuando a las 16-20h después de la inseminación/inyección se logra observar bajo el microscopio de luz invertida la presencia de 2 pronúcleos en el Ooplasma y simultáneamente 2 corpúsculos polares en el espacio perivitelino. El día de la validación de la fecundación es considerado como día 1 (D1) de cultivo.

## 6. SIGLAS


FIV - Fertilización In vitro

ICSI – Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoide

ZP – Zona Pelúcida

CP – Corpúsculo Polar

PN – Pronúcleo

	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 2 de 7

CPN – Cuerpo Precursor de Nucléolo

## 7. TIPO DE MUESTRA

Óvulos después de 16-20h, preferiblemente 17h de cultivo luego de la inseminación.

## 8. INFORMACIÓN GENERAL

### 8.1 Manipulación de los Gametos

- Un cigoto o óvulo fecundado es muy sensible a variaciones de temperatura y pH, es muy necesario que todas las actividades que se desarrollen fuera de la incubadora sean realizadas con máximo cuidado y rapidez.
- Trabajar siempre en superficies térmicas.
- Todos los procedimientos en que se tenga que llevarse a cabo cambios de medios o placas, deben ser realizados con máxima atención, teniendo muy en cuenta la numeración de los óvulos o cigotos y la identificación de la paciente.

## 9. MATERIAL NECESARIO

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puntas de Pipetas 0.2 - 200µl</li> <li>• Puntas de Stripper 135 ò 175 µm</li> <li>• Placas de Petri 35mm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cámara de Flujo Laminar con Superficie Térmica</li> <li>• Incubadora 37°C, 5% O<sub>2</sub> y 6.5% CO<sub>2</sub></li> <li>• Incubadora 37°C y 6.5% CO<sub>2</sub></li> <li>• Micropipeta Stripper</li> <li>• Micropipeta 20-200 µl</li> <li>• Microscopio Óptico Invertido</li> <li>• Estereomicroscopio con Superficie Térmica</li> <li>• Lápiz de Punta de Diamante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Global Total</li> <li>• Lite Oil</li> </ul>


**Tabla 1.** Materiales necesarios para la realización de este procedimiento.

## 10. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Tapabocas
- Gorro desechable

## 11. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO


### 11.1. Día anterior

	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 3 de 7

1. Preparar cajas de cultivo de 35 mm que contengan medio Global Total y que sean congruentes con el número de óvulos inseminados o inyectados. Identificar la placa con el nombre de la paciente como lo indica el "IT Preparación de Medios y Reactivos".

#### **11.2. Día 1 - FIV**

1. Escribir en el formulario FIV/ICSI de la paciente las iniciales del biólogo, día y hora en que se realiza la validación de la fecundación del caso.
2. Hacer el montaje de la punta de stripper de 135 ò 175 µm, siempre dentro de la cabina de flujo laminar.
3. Retirar de la incubadora las placas de FIV con la identidad de la paciente y colocarla en la superficie térmica de la cámara de flujo laminar bajo el estereoscopio.
4. Con el fin de liberar los óvulos de las células de la granulosa, aspirar y soltar los mismos repetidamente con la pipeta stripper. Este paso se realizará en la misma gota de inseminación donde se encuentra cada óvulo. Lavar las estructuras en la gota central de la placa de FIV.
5. Pasar las estructuras ya denudadas a una placa de cultivo con medio Global Total preparada el día anterior, de forma ordenada y con mucho cuidado; lavarlos cada uno en la gota central de la placa de CIV y colocarlos de uno en uno en cada microgota, de acuerdo con la posición de observación asignarle la numeración correspondiente. Por último, comprobar al microscopio invertido que ninguna estructura fue dejada en la placa de FIV.
6. Evaluar al microscopio invertido, en una amplitud de 40X, la presencia de 2 PN en el ooplasma del cigoto y 2 CP en el espacio perivitelino, y realizar una observación más detallada (presencia de vacuolas, más de 2 PN y apariencia de estos, evaluación de los cuerpos precursores de nucléolo, presencia de halo citoplasmático, etc.). Clasificar los cigotos de acuerdo con las tablas de referencia para el tamaño y la posición relativa de los PN y los CPN, valorar la presencia de división temprana y registrar en el protocolo de la paciente todas las observaciones. También evaluar la tabla 2 y 3 de recomendaciones de cultivo en función del número de corpúsculos y pronúcleos.
7. Si en la evaluación se llegan a encontrar estructuras no fecundadas en los diferentes estadios (MII, MI y vesícula germinal) proceder a descartarlos de la placa de CIV y hacer el debido reporte en el protocolo de la paciente.
8. En cada observación es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso.

	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 4 de 7

9. Evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles progresivos existentes en las gotas de inseminación, bajo la luz del microscopio invertido, en una amplitud de 40X y registrar en el formulario de la paciente.
10. Devolver las placas de cultivo conteniendo los cigotos a la incubadora previamente asignada a la paciente.

### 11.3. Día 1 – ICSI

1. Dado que los óvulos ya están desnudos, basta con evaluar la presencia de 2 PN y 2 CP, al microscopio invertido como ya se ha mencionado anteriormente y hacer una evaluación morfológica del cigoto. Apuntar cualquier anomalía presente, siempre acompañada del formato de la paciente.
2. Si en la evaluación se llegan a encontrar estructuras no fecundadas proceder a descartarlos de la placa de CIV y hacer el debido reporte en el protocolo de la paciente, también evaluar la tabla 2 y 3 de recomendaciones de cultivo en función del número de corpúsculos y pronúcleos.
3. En cada observación es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso.
4. Devolver las placas de cultivo conteniendo los cigotos a la incubadora previamente asignada a la paciente.

## 12. REFERENCIAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE LOS ZIGOTOS

Los óvulos fecundados para ser considerados óptimos serían aquellos esféricos, con 2 CP alineados a 2 PN centrales de igual tamaño y número. Los parámetros por tener en cuenta en la evaluación del cigoto para que sigan su cultivo o sean decidido descartarlos son:

- **Favorables:**

La presencia de halo.

División temprana.

- **Desfavorables:**


Cualquier estado diferente de 2PN + 2CP.

Un solo precursor de nucléolo en alguno de los PN.

Pronúcleos separados o de tamaño desigual.

División directa a 3 células (si se dispone de tecnología Time-Lapse).

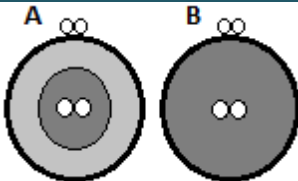
- **Descartar:**

	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 5 de 7

1PN + 1CP.

2PN + 1CP.

Más de 2PN.

Estructura en el Zigoto	Observación
<b>Pronúcleos</b>	Número Simetría: Iguales / Desiguales Localización en citoplasma: Centrales o no Posición de los pronúcleos: Adyacentes / Separados
<b>Cuerpos Precursores Nucleares</b>	Número Tamaño de CPN: Simétricos, Asimétricos o Anormales Alineación de nucléolos: Alineados / Disperso
<b>Corpúsculos Polares</b>	Número Apariencia Localización respecto a los pronúcleos
<b>Halo</b>	


A - Presente / B – Ausente

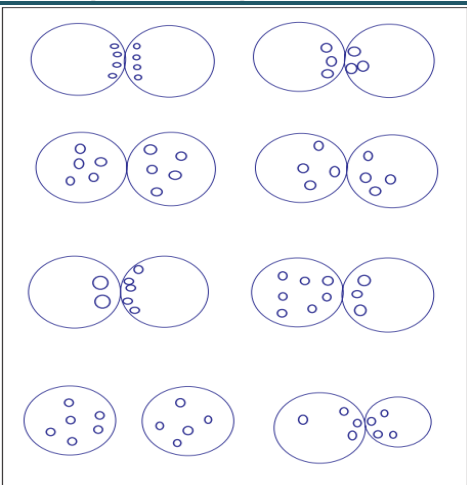
**Tabla 2.** Parámetros en la evaluación y clasificación del cigoto

Relación Nº PN-CP	FIV	ICSI
2 PN + 2 CP	Continuar	
1 PN + 1 CP	Descartar	
1 PN + 2 CP	Si evoluciona, diploidía	80% Descartar. Si evoluciona, 20% diploidía
2 PN + 1 CP	Descartar*	
> 2PN	Descartar	

**Tabla 3.** Recomendaciones de cultivo en función del número de corpúsculos y pronúcleos.

\*En caso de encontrar 2 PN + 1 CP es preciso descartar el cigoto dado que si no es partenogénesis existe riesgo de diginia, con las implicaciones correspondientes de riesgo fetal (Carceller, 2004).


	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 6 de 7

Categoría	Clasificación	Descripción / Esquema
1	Simétricos (3-7 CPN)	
2	Asimétricos (4-10 CPN)	
3	Anormales (1 o 0 CPN)	

**Tabla 4.** Sistema de clasificación de los pronúcleos. (Scott, 2003; Estambul congreso 2011).

### 13. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

- Fallo de fecundación en FIV convencional: si, después de 17 a 20 horas de la inseminación, no se observan los PN, podremos considerar que el óvulo no ha sido fecundado. Para determinar las posibles causas en casos de ausencia total de fecundación después de FIV convencional:
  - Examinar la supervivencia de los espermatozoides en las gotas de inseminación.
  - Verificar la existencia de espermatozoides agarrados a ZP, aunque no sea un parámetro altamente correlacionado con fallas de fecundación totales.
  - Evaluar la morfología de los óvulos, el estado de maduración de estos (VG, MI y MII), así como las características del CP y la existencia de óvulos atrésicos, degenerados, etc.
  - Registrar la posible contaminación en las gotas de inseminación, por levaduras o bacterias que pueden afectar la viabilidad de los espermatozoides y los óvulos y, por consiguiente, la fecundación.
- Falla de fecundación después de ICSI: aunque los casos de fallos totales de fecundación después de ICSI son menos frecuentes, también pueden ocurrir y son

	<b>EVALUACIÓN FECUNDACIÓN</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-027	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 7 de 7

en su mayoría debidos a una falla de la activación del óvulo como consecuencia de una calidad ovocitaria comprometida. Como, por ejemplo, en el caso de los óvulos obtenidos a partir de mujeres con baja respuesta a la estimulación ovárica, lo que puede ocurrir en cerca del 7% de los casos.

- Sin embargo, problemas de naturaleza técnica relacionados con la microinyección o la inyección de espermatozoides de viabilidad dudosa, también pueden dar lugar a fallas de fecundación después de ICSI. Si el índice de fallos de fecundación después de ICSI es superior al 1.5% la eficacia de la técnica debería ser cuestionada.

#### 14. CONTROL DE CALIDAD

- Todas las superficies en las que se trabaja con los cigotos deben estar a temperaturas cercanas a los 37°C, pero no superior a esta.
- Todas las incubadoras deben haber sido monitorizadas para los parámetros CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y Temperatura.
- Todos los equipos utilizados (incubadoras, filtros de cámaras de flujo laminar, estereoscopio, microscopios, etc.) deberán someterse a una revisión / calibración anual por representantes acreditados.