

TRABAJO FIN DE MÁSTER

En

**Biología y Tecnología Aplicada a
la Reproducción Humana Asistida.**

**Revisión de la evolución de los
Criterios ASEBIR de valoración
morfológica de oocitos, embriones
tempranos y blastocistos humanos.**

Autor: Paula Borja Jiménez

Tutor: Raquel Herrer Saura

Villaviciosa de Odón, Octubre 2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
PALABRAS CLAVE.....	2
ABSTRACT	2
KEY WORDS	3
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	4
1. Clasificación ASEBIR.....	5
2. Revisión crítica de los criterios ASEBIR y su evolución.....	6
2.1 Ovocitos.....	7
2.2 Fecundación.....	9
2.3 D+2 y D+3.....	11
2.4 D+4.....	19
2.5 D+5 y D+6.....	21
3. Time-Lapse.....	23
4. Campos a desarrollar.....	28
4.1 Aspectos morfológicos ovocitarios.....	28
4.2 ¿Es importante valorar al embrión en D+2 y D+3 o una única valoración en D+5 es suficiente si transferimos en blastocisto?	29
4.3 Colapso de blastocisto.....	29
4.4 Valoración de embriones criopreservados	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFÍA	32

RESUMEN

- Antecedentes: Uno de los principales objetivos de la Reproducción Asistida es la transferencia de un solo embrión con mayor probabilidad de implantación, con el fin de obtener un recién nacido vivo sano. Los criterios de valoración morfológica son la herramienta fundamental para seleccionar dicho embrión.
- Objetivos: Realizar una revisión de los Criterios ASEBIR y su evolución.
- Métodos: Revisión de los Cuadernos ASEBIR de embriología clínica y revistas científicas (MEDRE, Reproductive BioMedicine Online, Fertility and Sterility y Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.)
- Resultados: La 3ª edición de los Criterios ASEBIR recoge todos los aspectos a valorar en el desarrollo embrionario. Además, la incorporación del Time-Lapse mejora la evaluación embrionaria y posterior categorización.
- Conclusiones: La categorización embrionaria ASEBIR (A, B, C, D) refleja el potencial de implantación de los embriones correctamente, aunque el desarrollo embrionario es un proceso dinámico en continuo cambio, que se adapta a las nuevas tecnologías, como el Time-Lapse.

PALABRAS CLAVE

Criterios ASEBIR, selección embrionaria, desarrollo embrionario, morfología embrionaria, morfocinética, Time-Lapse.

ABSTRACT

- Background: One of the main objectives of Assited Reproduction is the transfer of a single embryo with a higher probability of implantation, in order to obtain a healthy live newborn. Morphological criteria are the fundamental tool to select the embryo.
- Objectives: Review of the ASEBIR criteria and their evolution.
- Methods: Review of ASEBIR Notebooks of clinical embryology and scientific journals (MEDRE, Reproductive BioMedicine Online, Fertility and Sterility y Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción.)
- Results: The 3rd edition of ASEBIR criteria includes all aspects to assess embryonic development. In addition, the incorporation of Time-Lapse improves embryonic evaluation and subsequent categorization.

- Conclusions: The ASEBIR embryo categorization (A, B, C, D) reflects the implantation potential of embryos correctly, although embryonic development is a dynamic process in constant change, which adapts to new technologies, such as Time-Lapse.

KEY WORDS

ASEBIR criteria, embryo selection, embryo development, embryo morphology, morphokinetics, Time-Lapse.

INTRODUCCIÓN

La clasificación embrionaria comenzó con la valoración morfológica del ovocito que se ha estudiado desde el comienzo de la Reproducción Asistida, y la valoración del embrión temprano (entre 2 y 8 células), porque se realizaban las transferencias en D+2 y D+3, sin llevar el cultivo hasta blastocisto, que se incorporó más tarde.

La valoración ovocitaria es importante para obtener de una cohorte de ovocitos solo los maduros, y poder valorar las diferentes alteraciones o dismorfismos que puedan presentar, aunque no todos afecten a su calidad.

En la valoración del preembrión en D+2 y D+3 para su transferencia se valoraban aspectos tan cruciales como el número de células, el ritmo de división, el tipo fragmentación y la simetría. Otros valores son: la multinucleación, aspecto del citoplasma, las vacuolas y la zona pelúcida. Más tarde se incorporó el cultivo hasta el estadio de blastocisto (D+5).

La clasificación embrionaria del blastocisto comenzó en 1998 con Gardner y Schoolcraft, quienes establecieron una evaluación morfológica de este estadio embrionario. Para clasificar el blastocisto se valoraban 3 parámetros morfológicos: la expansión de blastocele, la forma, tamaño y grado de compactación de la masa celular interna y la cohesión del trofoectodermo.

La bibliografía científica que habla de parámetros morfológicos de gametos y embriones es muy extensa. Numerosas clasificaciones de cada estadio embrionario han sido publicadas para hallar los valores predictivos de implantación, gestación y recién nacido vivo. La clasificación ASEBIR surge como respuesta a la necesidad de

unificación de los criterios embrionarios morfológicos de gametos y embriones, obteniendo así un idioma común para todos los laboratorios FIV de España.

La principal diferencia de la categorización ASEBIR con anteriores clasificaciones es que estos criterios no son estáticos, sino que se basan en la evolución dinámica del embrión, ya que tienen en cuenta su evolución desde el estadio de ovocito hasta blastocisto. Es decir, estos criterios valoran todos los aspectos morfológicos desde el ovocito hasta el estadio de blastocisto, incluyendo la fecundación, D+2, D+3 y D+4.

La introducción de incubadores con tecnología Time-Lapse supuso la incorporación de una nueva clasificación morfocinética para valorar el desarrollo embrionario, donde se tienen en cuenta tanto los parámetros morfológicos clásicos como el tiempo en el que se producen. Además, aparecen nuevos aspectos hasta entonces difíciles de valorar, como la aparición y desaparición de pronúcleos (PN), el tiempo exacto de división temprana, la valoración de divisiones irregulares, la aparición de vacuolas o el tiempo de expansión del blastocisto, entre otros.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es realizar una revisión de los Cuadernos ASEBIR de valoración embrionaria, publicados en 2007, 2008 y 2015, mostrando la evolución de la embriología con la incorporación de nuevas tecnologías que permiten seguir conociendo el desarrollo de los embriones. A su vez, revisar la bibliografía más actual en búsqueda de nuevos planteamientos a los últimos criterios ASEBIR de 2015.

MÉTODOS

Comparación de los Cuadernos de Embriología Clínica de ASEBIR. Además, se ha realizado una búsqueda de artículos en relación con los parámetros de valoración morfológica, cinética embrionaria y Time-Lapse en diferentes revistas científicas (MEDRE, Reproductive BioMedicine Online, Fertility and Sterility y Revista de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción).

RESULTADOS

1. Clasificación ASEBIR.

Numerosas sociedades científicas de todo el mundo han trabajado intensamente para homogeneizar los criterios de clasificación morfológica de gametos y embriones. En España, **ASEBIR** (Asociación para el Estudio de La Biología de la Reproducción) constituyó en 2004 la comisión “Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de ovocito a blastocisto”, con el fin de establecer un lenguaje común a todos los laboratorios de FIV nacionales.

Los inconvenientes derivados de que cada laboratorio tuviese un idioma propio a la hora de hablar de morfología embrionaria son:

- Incapacidad de realizar estudios multicéntricos.
- No poder valorar informes clínicos entre distintos laboratorios.
- Imposibilidad de comparar datos bibliográficos, al no tener los mismos patrones de valoración.
- Los parámetros embrionarios evaluados se ven afectados, igual que los puntos de corte entre las distintas categorías y el algoritmo que delimita cada categoría de calidad embrionaria.

Por ello existía la necesidad de llegar a un consenso para crear unos criterios unificados sobre la clasificación embrionaria que pudieran ser utilizados por todos los profesionales de todas las clínicas. Las herramientas empleadas por la comisión ASEBIR fueron: una revisión bibliográfica exhaustiva de cada parámetro morfológico, además de la experiencia de los miembros del grupo. Los embriones se clasificaron en función de categorías, y no en caso a un score.

El resultado de este trabajo se publicó en 2007 en el Cuaderno de Embriología Clínica, “Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos”, que tuvo una segunda edición en 2008. En 2015 se publicó la tercera y última versión, donde se incluyeron las últimas revisiones y actualizaciones.

Los criterios ASEBIR son de plena importancia para el trabajo del embriólogo, ya que su principal objetivo es transferir embriones con mayor potencial de implantación para

alcanzar las mejores tasas de recién nacido vivo, por ello es necesario evaluar la calidad y el desarrollo embrionario.

La clasificación ASEBIR se basa en 4 categorías que hacen referencia al potencial de implantación esperado para cada embrión:

- Categoría A: máxima capacidad de implantación, embrión óptimo.
- Categoría B: alta capacidad de implantación, buena calidad embrionaria.
- Categoría C: capacidad implantación media, embrión de calidad regular.
- Categoría D: mínima capacidad de implantación, mala calidad embrionaria.

Se han obtenido buenos resultados a la hora de implantar este método de valoración embrionaria de ASEBIR. Esta clasificación tiene un valor pronóstico en embriones tempranos para la tasa de recién nacido vivo y de implantación, ya que aumentan gradualmente según la categoría embrionaria. Estas tasas son máximas en embriones de categoría A (21,7 y 25,3%, respectivamente) y mínimas en la categoría D (7,1 y 9,7%, respectivamente) (p-valor < 0,05) (1).

2. Revisión crítica de los criterios ASEBIR y su evolución.

La evaluación de la **morfología** y ahora de la **cinética embrionaria** desde la incorporación del **Time-Lapse**, un sistema formado por una incubadora con un microscopio integrado y cámaras que captan imágenes de los embriones cada cierto intervalo de tiempo en diferentes planos durante el cultivo embrionario, es de plena importancia para la transferencia de un solo embrión de óptima calidad y máxima capacidad de implantación, así como para la reducción de los embarazos múltiples.

Los criterios ASEBIR desde su creación en 2004 han ido modificando su clasificación en función de la mejora del desarrollo embrionario in vitro, debido fundamentalmente a la mejora de los equipos y medios de cultivo utilizados; y, por otro lado, en algunos aspectos ha introducido la valoración cinética de los sistemas Time-Lapse.

La valoración de los ovocitos es el primer punto en los cuadernos ASEBIR, sigue por orden cada estadio de la evolución embrionaria, desde el ovocito hasta blastocisto.

2.1 Ovocitos.

En la 3ª edición se añaden tanto aclaraciones como actualizaciones que han sido valoradas en diferentes estudios realizados sobre los distintos parámetros que son evaluados.

- Citoplasma

El **citoplasma** de los ovocitos debe tener un aspecto claro; sin embargo, hay ovocitos que presentan un citoplasma heterogéneo, aunque no se conoce la relevancia biológica que tiene sobre el desarrollo. Actualmente no se considera un dimorfismo que tenga relevancia en el desarrollo, sino un tipo de variabilidad fenotípica entre citoplasmas de ovocitos. Existen evidencias que apoyan el aspecto claro del citoplasma: los ovocitos con citoplasma oscuro generan solamente un 8,3% de embriones de buena calidad (2) y hay autores que afirman que un citoplasma granular en la parte central del ovocito está relacionado con un bajo potencial de implantación.

- Agregación de retículo endoplasmático liso (AREL)

La presencia de **AREL**, una inclusión citoplasmática derivada de la acumulación de sáculos del retículo endoplasmático liso, es una anomalía severa asociada a un alto porcentaje de abortos espontáneos (58,3%) y complicaciones obstétricas en el embarazo (33,3%).

Son escasos los embriones que se desarrollan hasta el estadio de blastocisto y contienen AREL. No obstante, los ovocitos que presentan AREL son limitados (1,8%) (3).

En la última edición se añade la recomendación del consenso de Estambul de no microinyectar ovocitos que presenten AREL, en cambio, hay autores que afirman que estos ovocitos sí deben microinyectarse. Aunque solo un 10% de los ciclos en los que no se rompe el AREL durante el proceso puede tener una fecundación normal, y se han registrado nacimientos de niños sanos en estos ciclos (2).

- Vacuolas

Las **vacuolas** son inclusiones citoplasmáticas rellenas de líquido y rodeadas de membrana, se consideran un dimorfismo de los ovocitos. Actualmente no se conoce la repercusión de la presencia de pequeñas vacuolas (5-14 µm) y escasas en número. En

cambio, sí se conoce que la presencia de grandes vacuolas está asociado a un fracaso de la fecundación (4).

- Zona pelúcida

La **zona pelúcida** que rodea al ovocito es una matriz de glicoproteínas que permanece hasta el estadio de blastocisto. Esta matriz sufre cambios en la apariencia de la bicapa y en el grosor, desde D+0 hasta D+5. En la tercera edición del Cuaderno se han ampliado los días, ya que en la 2º edición solo aparecían los cambios hasta D+2.

Con la incorporación de la luz polarizada como herramienta, se ha detectado que los ovocitos en los que el estrato interno de la zona pelúcida tenga una falta de refringencia y posea variaciones de espesor e intensidad estarán relacionados con bajas tasas de implantación.

- Espacio perivitelino

El **espacio perivitelino** está ubicado entre el ovocito y la zona pelúcida.

Un ovocito con el espacio perivitelino aumentado se relaciona con una sobremaduración ovocitaria. Además, se asocia con una baja tasa de fecundación, pero no parece influir sobre la calidad del embrión. En cambio, cuando aparecen en este espacio restos celulares, en la 3º edición sí se ha relacionado con menores tasa de implantación (5,7% respecto a 11,5% sin restos celulares, p-valor= 0,05) (5), al contrario de la 2º edición donde no se había encontrado aún esta relación.

- Alteraciones del primer corpúsculo polar

En la segunda edición se expone que la morfología del primer **corpúsculo polar** podría tener una relación con las tasas de implantación y embarazo. En la tercera edición, se añade que los ovocitos con un corpúsculo polar grande no deben ser inseminados por el riesgo de aneuploidías.

- Complejo cúmulo-corona radiata-ovocito (COC)

La madurez del ovocito se mide a través del grado de madurez del **COC**. En la tercera edición se aclara que no existe una relación entre la morfología del COC y el posterior desarrollo embrionario.

El consejo de Estambul establece una gradación binaria (0 o 1) para evaluar este complejo, siendo 1 un óptimo COC con una corona con forma radiada y un cumulus extendido.

En las recomendaciones de ASEBIR en la 3ª edición se añade que la morfología de un ovocito puede manifestar anomalías, por lo que se desaconseja inseminar ovocitos gigantes ya que pueden ser diploides. Además, se adjuntan recomendaciones a tener en cuenta como condiciones desfavorables del ovocito: 1º corpúsculo polar gigante, vacuolización excesiva y ovocitos gigantes.

En la tercera edición se establece la definición morfológica de **ovocito maduro óptimo**, como aquel que debe tener una forma circular, rodeado por una zona pelúcida uniforme y clara con grosor de 20 µm, citoplasma sin inclusiones y translúcido, con un corpúsculo polar de dimensiones correctas.

El artículo de Coello Perles y colaboradores, publicado en 2017 estudió si las anomalías morfológicas de los ovocitos afectaban al embrión, con ovocitos vitrificados que fueron valorados antes con microscopio. Obtuvieron la tasa de supervivencia de 81,4% frente a 86,4% (95% IC= 0,8-2,5), la tasa de fecundación de 69,8% respecto a 66,9% (95% IC= 0,6-1,4) y la tasa de llegada a blastocisto de 54,5% ante 60,5% (95% IC= 0,5-2,7) de ovocitos normales y ovocitos dismórficos, respectivamente. No siendo significativas estas diferencias, por lo que concluyeron que estas anomalías presentes en los ovocitos no afectaban al embrión (6). Por lo tanto, actualmente todos los parámetros ovocitarios no se valoran en la práctica clínica, por lo que no se tienen en cuenta en la categorización del embrión.

2.2 Fecundación.

Los parámetros de valoración embrionaria tienen unos determinados márgenes de tiempo, pero el estadio **tiempo-dependiente** más importante es la fecundación.

La franja horaria establecida para valorar a los cigotos es esencial, ya que si es inadecuada los **pronúcleos** (PN) podrían desaparecer y ese ovocito se interpretaría como no fecundado y podría haber evolucionado hasta formar un embrión.

La valoración de la fecundación se basa en la extrusión del segundo **corpúsculo polar** y la aparición de los dos pronúcleos, el masculino y el femenino.

- Corpúsculos polares (CP)

La extrusión del segundo CP es imprescindible en la fecundación, por esta razón en la 3° edición se incluye más información en la evaluación de la fecundación con respecto a los CP.

Se evalúa la localización de los CP respecto a los PN, se aclara que la decumulación mecánica de los ovocitos para una ICSI puede desplazar los CP. Los PN se encuentran alineados con el 2° CP y, además, se sitúan ecuatorialmente al eje polar que marcará el plano de la primera división mitótica.

- Pronúcleos (PN)

La visualización de la aparición de los PN es clave para valorar la fecundación, por ello en la 3° edición se ajusta el rango horario a 16-18 horas posinseminación (2). En la anterior edición el rango era más amplio (16-22 horas) (7). La reducción del tiempo se debe a la existencia en algunos embriones de una desaparición temprana de los PN.

Aunque los PN pueden permanecer hasta las 24-28 horas tras la inseminación, si desaparecen antes de las 20 horas se considera una desaparición muy temprana y se está valorando la importancia de este suceso.

En la última edición se recomienda descartar los ovocitos fecundados procedentes de ICSI que presenten un PN y dos CP. En la anterior edición ya se explicaba que estos embriones si evolucionan el porcentaje de diploidía es solo del 20%, por lo que es mejor descartarlos.

Estas actualizaciones vienen de la mano del Time-Lapse, pudiendo observar el desarrollo embrionario como una película y no sólo una única observación.

- División temprana

La **división temprana** tiene lugar cuando la primera división celular se produce entre las 25-27 horas pos-ICSI o 27-29 horas pos-FIV; en la tercera edición se añade la franja horaria específica para FIV.

En la 2° edición la información disponible de este parámetro era limitada, porque se estudiaba junto con otros parámetros, por lo que obtenían conclusiones contradictorias y no se podía establecer el valor de su observación.

En la última edición ya obtenemos más información de la división temprana, como que se espera en el 50% de los ciclos de Reproducción Asistida, por lo que algún embrión de la cohorte realiza una división temprana a las 26 ± 1 horas; parece ser que con el aumento de la edad materna esta posibilidad decrece.

La división temprana tiene más relevancia en la evaluación de la tasa de implantación de embriones de peor calidad. Por ejemplo, embriones de categoría C en D+3 tienen una tasa de implantación del 25,7% con división temprana y de 14,9% sin este fenómeno. Por lo tanto, este parámetro se debe tener en cuenta en la transferencia cuando los embriones no son de buena calidad (2).

Embriones que realizan la primera división antes de las 24,5 horas tienen mejor desarrollo en los días 2 y 3, por lo que tendrán mayor probabilidad de llegar a blastocisto (17%); frente a embriones que realizan la división antes de las 23 horas que la probabilidad de llegar a blastocisto es menor (4%) (8).

Este parámetro es empleado como secundario para poder decidir entre embriones de calidad semejante, se recomienda elegir un embrión que tenga 2 blastómeros iguales, sin multinucleación ni fragmentación a las 26 horas tras la inseminación. Respecto a la multinucleación se aconseja no escoger a igualdad de calidad aquellos embriones que hayan presentado esta característica.

Con la incorporación del Time-Lapse se valora un parámetro que sí influye negativamente en la implantación, la **división directa** a 3 células. Al embrión se le otorgaría la categoría D con mal pronóstico reproductivo. Este criterio se añade en las recomendaciones de la 3ª edición para descartar un embrión.

2.3 D+2 y D+3.

Los intervalos de tiempo de observación se reducen en la 3ª edición. En D+2 disminuye de 44-47 a 43-45 horas y en D+3 de 67-71 a 67-69 horas posinseminación (2) (7). No se conoce con seguridad la razón del cambio en los tiempos de división, aunque se ha relacionado con posibles factores intrínsecos del ovocito, pero las nuevas publicaciones avalan este desarrollo más rápido de los embriones probablemente por la mejora de medios de cultivo, incubadores y medios de trabajo.

Los parámetros evaluados en este estadio de D+2 y D+3 son:

-Número de células y ritmo de división

- Porcentaje y tipo de fragmentación celular
- Tamaño de los blastómeros estadio-específico
- Visualización de núcleos y grado de multinucleación
- Diferentes anomalías citoplasmáticas entre las que se encuentran el anillo acitoplasmático, la presencia de vacuolas y el pitting
- Forma del blastómero
- Zona pelúcida
- Grado de compactación/adhesión temprana

En la 3° edición del Cuaderno se revisan y actualizan los siguientes parámetros de valoración embrionaria en D+2 y D+3:

- Número de células y ritmo de división

El número de células se valora en D+2 y D+3 contando los blastómeros que tiene el embrión. A parte se evalúa el **ritmo de división** del embrión en D+3 valorando cómo han evolucionado las divisiones, ya que estos parámetros morfológicos tienen alto valor predictivo para estimar el porcentaje de recién nacidos vivos.

En la 3° edición se establece que los embriones que presenten 7 u 8 células en D+3 y procedan de 4 células en D+2 serán óptimos y con mayor potencial de implantación, basándose tanto en el número de células como en el ritmo de división. Además, se ha observado que en D+3 embriones que presentan ≤ 6 células o ≥ 9 células presentan un aumento en las tasas de aneuploidías (2).

Actualización de los ritmos de división, de mayor potencial de implantación a menor.

CATEGORÍA	2° Edición	3° Edición
A	4 células → 7-8 células	4 células → 7-9 células
B	2 ó 5 células → ≥ 7 células 4 células → ≥ 9 células	5 células → > 6 células 4 células → > 9 células
C	2 ó 4 células → 6 células 6 células → ≥ 8 células 3 células → ≥ 6 células	2 células → 4 -9 células
D	>6 células → Cualquier valor Cualquier valor → ≤ 5 células De D+2 a D+3 solo aumenta 1 célula	4 células → 6 células 3 células → >4 células No división o incremento de 1 célula de D+2 a D+3

Tabla 1. Comparación de los ritmos de división de los embriones de la 2º y 3º edición del Cuaderno ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos.

Se conoce que hay ciertos embriones con un desarrollo acelerado en D+3 con 10 o más células, por lo que se esperaría un mal pronóstico y un alto porcentaje de aneuploidías. Sin embargo, estudios demuestran que estos embriones llegan al estadio de blastocisto con buena morfología, óptima calidad y el porcentaje de aneuploidías no se ve alterado por este rápido desarrollo. Se obtuvo un 44,8% de aneuploidías para embriones con menos de 10 células en D+3 y un 43,9% para embriones con un desarrollo acelerado, con un p-valor de 0,523, sin diferencias significativas (9).

- Porcentaje y tipo de fragmentación celular

En la 3º edición se define fragmento celular como una fracción de citoplasma delimitado por una membrana sin núcleo, procedente de un blastómero y con un diámetro <45 µm en D+2 y <40 µm en D+3.

La **fragmentación celular** es común en los embriones humanos y es valorada con el porcentaje de volumen que ocupa y el tipo. La fragmentación es de tipo I cuando aparece menos del 5% y normalmente asociada a una célula, el tipo II es fragmentación asociada a una zona determinada, normalmente cercana al espacio perivitelino, el tipo III son fragmentos distribuidos por todo el embrión, el tipo IV son fragmentos grandes que se puede confundir con blastómeros y el tipo V son fragmentos necróticos con gránulos.

En la edición de 2008 se establece como parámetro para la categorización embrionaria la fragmentación “tipo IV”, para descartar embriones cuya implantación es prácticamente nula. En la última edición se ha eliminado el concepto de fragmentación “tipo IV” de la valoración embrionaria porque es un dato que puede generar confusión. Además, se conoce que un embrión de calidad A, B o C no puede presentar ese porcentaje de fragmentación, se relaciona con la categoría D.

Una fragmentación extendida por todo el volumen embrionario genera un aumento en el porcentaje de anomalías cromosómicas (80%), en comparación con embriones que presentan fragmentación concentrada en un área concreta (57%) en estadio de 8 células con un p-valor < 0,03 (10).

Se concluye que la fragmentación es un parámetro morfológico necesario para el pronóstico del potencial de implantación, junto con el número de blastómeros y el ritmo de división, evaluables en D+2 y D+3 (10).

En la 3ª edición se desaconseja la transferencia o congelación de embriones con más de un 50% de fragmentación, debido a que su tasa de implantación se considera nula.

- Tamaño de los blastómeros estadio-específico

Uno de los aspectos más importantes de la última edición del 2015 es la introducción del término **estadio-específico** para hablar de simetría. Así el embrión estadio-específico es aquel cuyas células tienen un tamaño conforme a su ciclo de división, y embrión no estadio-específico, en el que el tamaño de sus células no es compatible con su ciclo de división.

Embriones clasificados en la misma categoría y sin otra característica que les diferencie, se recomienda elegir preferentemente aquellos que sean estadio-específicos.

Embriones asimétricos que alcancen el estadio de blastocisto se espera que tengan una calidad subóptima y alto porcentaje de aneuploidías. Sin embargo, aunque la calidad no sea óptima el porcentaje de aneuploidías no aumenta en embriones no simétricos, se realizó un estudio en el que los resultados del porcentaje de aneuploidías no eran significativos (44,7% frente 46,7% de los asimétricos, p-valor =0,54) (11).

- Visualización de núcleos y grado de multinucleación.

En la valoración morfológica de los embriones es muy importante considerar la visualización de los núcleos, ya que un embrión con un único núcleo por blastómero predice un buen potencial de implantación.

En la última edición, uno de los cambios primordiales es que los embriones óptimos con 4 células que presenten 1 célula con binucleación se clasifican como tipo C. En cambio, en la edición anterior cualquier tipo de multinucleación es considerada tipo D.

Se define la **multinucleación** como la presencia de más de un núcleo en al menos uno de los blastómeros del embrión, y se valora durante del desarrollo embrionario desde 2 células hasta D+3. La multinucleación es frecuente, pero la incidencia varía incluso entre observadores.

Existen 2 tipos de multinucleación: la binucleación (bn) que consiste en la presencia de 2 núcleos por célula y la multi/micronucleación (mn) que presentan más de 2 núcleos por célula. Los embriones con células binucleadas tienen mayor tasa de implantación (25%) que aquellos con células micronucleadas (10,1%) con un p-valor de 0,038 (12).

La incidencia esperada para la multinucleación está entre el 15% y el 20%, pero ésta disminuye de D+2 (26,2%) a D+3 (11,4%).

La presencia de blastómeros multinucleados en estadio D+2 y D+3 indica un mal pronóstico para la llegada a blastocisto, ya que la probabilidad de obtener un blastocisto de buena calidad derivado de un embrión con multinucleación en D+2 es inferior al 5% (13).

Munuera Puigvert y colaboradores, propusieron clasificar los embriones con multinucleación en distintos grupos, porque hay embriones que excluyen estas células multinucleadas de su desarrollo; es decir, son capaces de autocorregirse. Se separaron los embriones en 3 grupos:

- 1- Embriones que no excluyen ninguna célula del desarrollo a blastocisto (n= 65)
- 2- Embriones que excluyen las células multinucleadas, pero no las células hijas derivadas de células multinucleadas (n= 49)
- 3- Embriones que excluyen todas las células con multinucleación (n= 19)

Los resultados obtenidos en este estudio concluyen que aquellos embriones que eliminan las células multinucleadas reparando su desarrollo poseen mayores tasas de implantación, embarazo clínico y nacido vivo (63,2%, 78,9% y 50% respectivamente) frente a los otros dos grupos, cuyas tasas fueron para el grupo 1 de 56,9%, 47,7% y 22%, respectivamente y para el grupo 2 de 36,7%, 30,6% y 20,8%, respectivamente. Aunque solo se obtienen diferencias significativas (p-valor < 0,05) para la tasa de nacido vivo del grupo 3 frente al 1 y 2 (14).

Las causas de la multinucleación no están claras, pero se puede asociar a alteraciones en el proceso de citocinesis (cariocinesis sin citocinesis), generando blastómeros multinucleados. Otras causas propuestas son fallos en la segregación de los cromosomas, rotura del material genético y errores en el empaquetamiento durante la mitosis por migración incorrecta en la anafase mitótica (13).

En la 3ª edición se expone la recomendación del consenso de Estambul de valoración embrionaria, que recomienda elegir embriones sin multinucleación para la transferencia, aunque se han publicado nacimientos de niños sanos procedentes de embriones con multinucleación.

- Anillo acitoplasmático

El **anillo acitoplasmático** aparece en el contorno de los blastómeros del embrión como un aro translúcido con el citoplasma retraído.

Los embriones que presentan esta anomalía en sus blastómeros se considera que poseen un potencial de implantación menor o que acabarán degenerándose, debido a que las células pierden la capacidad de dividirse. Esta pérdida la función de división se relaciona con la pérdida de proteínas regulatorias y mitocondrias que serán eliminadas por la célula como fragmentos.

- Vacuolas

Las vacuolas son inclusiones citoplasmáticas rellenas de líquido que surgen espontáneamente o por la unión de vesículas ya existentes del REL y/o aparato de Golgi.

Las vacuolas presentan diferentes tamaños, en la 2ª edición se establecía la diferencia en los 5 µm, aquellas con este diámetro serán vacuolas pequeñas. En la última edición se añade un nuevo valor, 14 µm, para diferenciar las pequeñas vacuolas con un diámetro entre 5-14µm y grandes vacuolas con un diámetro mayor de 14 µm.

La **vacuolización espontánea** durante el desarrollo embrionario es menor en D+2 y D+3 (2%), aumentando en D+4 (10,9%), cuando ocurre la compactación embrionaria, lo que provoca una mala calidad embrionaria. En D+5 las vacuolas tienden situarse en el trofoectodermo, ya que la vacuolización sobre la masa celular interna sería muy grave para el desarrollo embrionario, se piensa que es una estrategia del embrión para minimizar el efecto. Una vacuolización extensa por todo el embrión perjudica su desarrollo espacial (4).

El Grupo de Interés de Embriología ASEBIR estudió a través de encuestas cómo afecta la formación de vacuolas a los embriones. En el estudio, aunque se dispuso de pocos casos, se concluyó que cuando el embrión tiene un desarrollo embrionario óptimo y las

vacuolas están presentes en la mitad o menos de los blastómeros la tasa de implantación no se altera. Recomiendan que los embriones que presenten vacuolas grandes en más de la mitad de sus blastómeros no se transfieran, ni se congelen ya que su tasa de implantación es prácticamente inexistente (2).




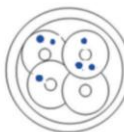
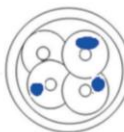
A	B	C	D	
Ausencia de vacuolas	≤ 50% de blastómeros con vacuolas pequeñas (≤ 5 -14 μm)	≤ 50% de blastómeros con vacuolas grandes (> 14 μm)	> 50% de blastómeros con vacuolas pequeñas (≤ 5 -14 μm)	> 50% de blastómeros con vacuolas grandes (> 14μm)*
				

Figura 1. Categorización de las diferentes posibilidades de aparición de vacuolas en un embrión en desarrollo. Adaptado de *Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 3º edición*. (p.57),2015

- Pitting o moteado

El **pitting citoplasmático** se presenta en el embrión como pequeñas hendiduras de 1,5μm en la zona cortical.

En la última edición este parámetro se vinculaba con un buen desarrollo embrionario, pero posteriormente se han realizado estudios en los que no se ha encontrado diferencias significativas (p-valor > 0,05) que relacionen la presencia o ausencia de pitting con las tasas de embarazo clínico (36,4% frente 33,8%), ni de implantación (17,3% frente a 17%), respectivamente (15), por lo que no tiene un valor pronóstico en el desarrollo embrionario. Existen trabajos que relacionan el pitting con unas condiciones de cultivo desfavorables, que provocarían un estrés fisiológico en los embriones.

- Forma del blastómero

Un **blastómero** irregular puede indicar una división de éste o una anomalía morfológica.

Esta característica, al igual que en la 2º edición, en esta última sigue sin incluirse entre los criterios de categorización de los embriones, porque su relación con el potencial implantatorio es difícil de valorar.

- Zona pelúcida

Una **zona pelúcida** sana debe tener un contorno redondeado, sin doble capa por tabicación interna, ausencia de bultos y una apariencia transparente. En cuanto al grosor, que no es homogéneo, se actualizan las medidas en la última edición, de $17\ \mu\text{m}$ como aparecía en la 2º a $19,5 \pm 2,2\ \mu\text{m}$ (2).

En la 3º edición se hace una distinción entre anomalías que afectan a la tasa de implantación reduciéndola por dificultades a la hora de la eclosión del embrión; y dismorfismos definidos como alteraciones de la normalidad que no afectan a las tasas embrionarias.

Se ha detectado que a causa del adelgazamiento del estrato más externo del embrión en D+3, su zona pelúcida es más fina ($15,2 \pm 2,9\ \mu\text{m}$) en comparación con la del oocito tanto maduro ($19,5 \pm 2,2\ \mu\text{m}$) como inmaduro ($20,4 \pm 2,4\ \mu\text{m}$), este adelgazamiento puede deberse a que el embrión crezca y aumente su diámetro (2). Se recomienda realizar una observación de la zona pelúcida prestando especial atención al color y grosor, porque a veces sí tiene repercusión sobre algunos ciclos. Aunque actualmente no existe una clara evidencia en los estudios como para aconsejar la medición del su grosor.

La aparición de nuevas tecnologías, como la luz polarizada, ha ayudado a estudiar la zona pelúcida en profundidad. Una buena predicción en cuanto al desarrollo del embrión hasta blastocisto y a la implantación es observar en la zona pelúcida su estrato interno muy ordenado.

La influencia de las alteraciones en la zona pelúcida sobre la clasificación del embrión, es nula mientras sean consideradas como leves, en cambio aquellas alteraciones como un grosor excesivo, presencia de septo, forma ovalada y color oscuro, sin presencia de otras alteraciones morfológicas le otorgan al embrión la categoría B.

Como conclusión a los parámetros evaluados en D+2 y D+3, se elimina de recomendaciones favorables la presencia de moteado en D+3 y en las desfavorables se añaden los embriones que presenten más de 2 anomalías referentes a la categoría D o que no hayan efectuado una división celular en 24 horas.

En los cuadernos ASEBIR encontramos esquemas para el trabajo diario en el laboratorio, donde se exponen los parámetros de valoración embrionaria en D+2 y D+3 y podemos ver la evolución y los cambios desde la 2º edición a la última.

La observación del preembrión se ha de realizar en el margen horario indicado en el texto. Tablas IV y V

CALIDAD	Día transferencia	Nº de células (→ indica paso de D+2 a D+3)	% fragmentación	Semejanza de tamaño*	Multinucleación	Citoplasma	Zona pelúcida
A	D+2	- 4	- ≤ 10%	Iguales o semejantes	No	No vacuolas	Normal
	D+3	- 4 → 7-8	- No tipo IV				
B	D+2	- 2 ó 5** - 4 (si frag. 11%-25%)	- ≤ 25				
	D+3	- 4 → 7-8 (si frag. 11%-25%) - 4 → ≥ 9 - 2 ó 5 → ≥ 7	- No tipo IV				

* El patrón de semejanza o igualdad entre blastómeros sólo es valorable en estadios de 2, 4, 8 y 16 células.

** Con preferencia a 5 células.

CALIDAD	Día transferencia	Nº de células (→ indica paso de D+2 a D+3)	% fragmentación	Multinucleación	Citoplasma	Siempre que exista
C	D+2	- 2, 4 ó 5 (si frag. 26%-35%) - 3* ó 6**	- ≤ 35% - No tipo IV	No	No o escasas vacuolas	- Desigualdad en el tamaño celular. - Vacuolas escasas - Zona pelúcida anormal sin eclosión asistida***
	D+3	- 2 ó 4 ó 5 → ≥ 7 (si frag. 26%-35%) - 6 → ≥ 8 - 2 ó 4 → 6 - 3* → ≥ 6				
D	D+2	- 1 ó ≥ 6 - 3 (células semejantes)				- Multinucleación. - Vacuolas abundantes. - Fragmentación >35. - Fragmentación tipo IV. - Anillo acitoplasmático D+3
	D+3	- 1 ó > 6 → cualquier valor - cualquier valor → <6 - De D+2 a D+3 sólo ha aumentado 1 célula				

* 1 célula grande y 2 pequeñas.

** Con preferencia a 6 células.

*** Si la única alteración es la ZP anormal se considerará preembrión de calidad C. Si se realiza eclosión asistida pasa a calidad B.

Grado	Día	Nº de células (“→” paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
A	D+2	4	≤10%	estadio-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
B	D+2	5	>10-25%	4→7 células NO estadio-específico en D+3	NO	≤50% células con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
C	D+2	2, 3, 6	>25-35%	2, 4, 8 células NO estadio-específico	1 cél. bn D+2, o bien 1-2 cél. bn D+3 y el resto como Grado A ⁽¹⁾	≤50% células con vacuolas grandes
	D+3	6, 11, 12 2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10				
D	D+2	3 (NO estadio-específico), > 6	>35%	3 células No estadio-específico en D+2	Cualquier otro tipo de multinucleación	>50% células con Vacuolas pequeñas, o bien Grave alteración citoplasm. ⁽²⁾
	D+3	3 - 5, 1 más que en D+2				

Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24h; >50% de fragmentación; Vacuolas grandes en >50% de las células; Combinación de >2 anomalías propias de grado D⁽³⁾

Figuras 2 y 3. Comparación de los esquemas de valoración embrionaria en D+2 y D+3 de la 2º (Fig 2.) y 3º (Fig 3.) edición de los Criterios ASEBIR. Adaptado de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 2º y 3º edición. (p.44) 2008 (p.54) 2015.

2.4 D+4.

A diferencia de la primera edición, en la tercera se separa la valoración en D+4 con respecto al D+5 y D+6.

En la última edición se establecen los tiempos de 90-94 horas posinseminación para evaluar en estadio D+4, en lugar de las 94-98 horas en la edición anterior (2).

En los parámetros valorados en D+4 en la tercera edición se añaden la división celular, adhesión celular y fragmentación y vacuolización. La compactación es el único parámetro que se valora en la segunda edición.

- División celular

En D+4 un embrión con un correcto desarrollo tiene que haber comenzado la cuarta ronda de divisiones mitóticas, ósea que tiene que estar formado por más de 8 células.

- Adhesión celular

Este proceso es el comienzo de la compactación, en el que podemos diferenciar cada célula por separado, pero sus membranas ya poseen zonas de contacto intercelular.

Se conoce que en estadio D+3 puede aparecer la **adhesión temprana** y que será beneficioso para el embrión si posee 7 u 8 células. Este proceso se piensa que podría estar afectado por los medios de cultivo y protocolos empleados.

- Compactación

El embrión aparece como una masa de células en la que no se pueden distinguir las células entre sí. Una adecuada **compactación** es señal de la activación del genoma embrionario, comenzando la polarización embrionaria al aumentar la adhesión intercelular.

Se diferencian dos grados de compactación en esta edición:

-Compactación parcial: no afecta a todas las células del embrión. Hay embriones que descartan células durante la compactación y dependiendo del número de células excluidas así será el tamaño de la mórula.

-Compactación total, afecta a todas las células. Es completa cuando se observa como una masa multicelular con todas las células compactas e incompleta cuando las células no están en el mismo grado de compactación y se puede diferenciar aún algunos blastómeros.

En D+4, este parámetro es el único que se valora en la 2ª edición. Según las evidencias bibliográficas hasta ese momento no se conocía la relación entre la compactación y la probabilidad de implantación. En la última edición ya se establece que este fenómeno es el comienzo de la polarización embrionaria.

- Fragmentación y vacuolización

Ambos parámetros se relacionan con la apoptosis, aunque aún no existen evidencias en la literatura que los relacionen con fallos de implantación, pero es un parámetro a tener en cuenta ya que los blastómeros que entran en apoptosis son excluidos de la masa que forma el embrión.

En la tercera edición se hace referencia a las transferencias en D+4 como alternativa a D+5, ya que estudios recientes indican que no afectaría a las tasas de embarazo clínico. Aunque la principal causa de que no se realicen las transferencias en D+4 es la falta de criterios morfológicos que predigan el embarazo (2).

En la edición de 2008 no aparece ningún esquema de valoración embrionaria para D+4. En cambio, en la 3º edición si aparece un esquema para valorar la calidad del embrión en D+4.

D+3	Características morfológicas D+4	D+4
A	Cavitación temprana Compactación total y >8 células	A
	Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
B	Cavitación temprana Compactación total y >8 células Compactación parcial (1-2 cél. excluidas)	B
	Compactación parcial (>2 cél. excluidas) No compactación (> 8 cél.)	C
C	Cavitación temprana Compactación total y ≥8 células	C
D	Compactación parcial	D
	Cualquier característica	

Cualquier embrión que presente en D+4:

- Fragmentación celular >35%
- Excesiva vacuolización.
- ≤8 células sin signos de compactación o con compactación de <50% del embrión.

→ D

Embriones excluidos de la clasificación por probabilidad de implantación prácticamente nula: Falta de división en 24 horas y embriones que presentan una combinación de >2 características propias de la categoría D.

Figura 4. Esquemas de valoración embrionaria en D+4 de la 3º edición de los Criterios ASEBIR. Adaptado de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 3º edición. (p.61) 2015

2.5 D+5 y D+6

En D+5 se amplía el intervalo de observación de 4 a 8 horas, se observa el embrión entre las 112-120 horas.

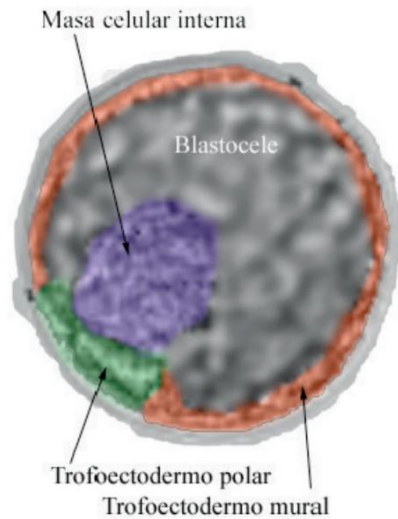


Figura 5. Esquema blastocisto humano. Adaptado de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 3ª edición. (p.57) 2015

En D+5 o D+6 un embrión con buen desarrollo y buen pronóstico para la implantación, llegará a formar un blastocisto. En este estadio podemos distinguir varias partes: **blastocele**, zona pelúcida, **masa celular interna** (MCI) y **trofoectodermo** (TE) polar y mural.

Tradicionalmente se realizaba la transferencia en D+3, pero tras múltiples estudios se ha demostrado que la transferencia en D+5 tiene mayores ventajas (16). En la tercera edición se exponen las principales razones de los beneficios de la **transferencia** en estadio de blastocisto como son: una mejor concordancia entre el endometrio y el desarrollo del embrión, en esta etapa se simula mejor el momento de la implantación natural y una reducción de las gestaciones múltiples. Aunque hay autores que también exponen algunas desventajas, como podría ser una mayor incidencia de

gemelos monocigóticos y mayores riesgos obstétricos y perinatales. Pero es innegable que el cultivo y transferencia de blastocistos ha aumentado las tasas embarazo clínico 43,2% frente a un 37,2% en estadios más tempranos (95% IC 1,14-1,47) (16).

Existen embriones que no alcanzan el estadio de blastocisto hasta D+6 o D+7 porque su desarrollo es más lento, y sus tasas de implantación esperadas son más bajas.

En cuanto a los aspectos valorados en D+5 y D+6, se añade en la 3ª edición:

En relación a la MCI en la 2ª edición se definía como el parámetro más importante para definir la calidad del embrión. Sin embargo, en la 3ª edición se actualiza esta información otorgándole mayor importancia a la morfología del trofoectodermo.

Se realizó un estudio para comparar las tasas de implantación de embriones cuya calidad es otorgada basándose en la valoración de la MCI y embriones valorados por el TE. Para los primeros las tasas fueron del 63% en la categoría A, para la B de 58% y para la C de 0%, pero los resultados no fueron significativos (p-valor= 0,15); sin embargo, para embriones valorados por el TE, se obtuvieron tasas de 67% para la categoría A, 51% para la B y 25% para la C (p-valor< 0,001). Se demuestra que existe una relación positiva entre las tasas de implantación y recién nacido vivo con la

morfología del trofoectodermo y no existiendo esta relación con la masa celular interna (17).

La expansión del blastocele del blastocisto es un parámetro complicado de valorar porque depende del tiempo, y más durante las fases de colapso que sufre. La expansión podría deberse a un evento de maduración trofoblástica, en el que entre las células trofoblásticas habría un paso de agua a través de acuaporinas y un gradiente de iones de sodio favorecido por bombas sodio/potasio-ATP que tendrían una configuración hacia el interior del blastocele.

En la 2º edición encontramos un esquema de la calidad de los blastocistos en D+5 y D+6 y en la 3º edición aparecen 2 esquemas, uno donde valoramos la evolución de D+4 a D+5 y otro de la evolución hasta D+6.

CALIDAD	Organización en blastocisto	Zona pelúcida	MCI	Tamaño MCI *	trofoectodermo	Grado de expansión **
Blastocisto A	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 µm2- 1900 µm2	Epitelio homogéneo Células elípticas	El blastocele ocupa todo el volumen del preembrión
Blastocisto B	En D+5	Afinada en D+5	Oval y compactada en D+5	3800 µm2- 1900 µm2	Epitelio irregular	
Blastocisto C	En D+6			< 1900 µm2	Epitelio homogéneo Células elípticas	
Blastocisto D	En D+6			< 1900 µm2	Epitelio irregular Células escasas	

* 3.800 µm2 es comparable al tamaño de un blastómero de un preembrión en estadio de 4 células.

** Blastocisto colapsado: es un mecanismo natural que tiene lugar en el estadio de blastocisto y que, si ocurre, habrá que observarlo de nuevo. No hará cambiar la categoría asignada al preembrión.

Tabla VI. Tabla de asignación de la calidad del blastocisto en función de las variables consideradas.

D+4	D+5				D+5	D+6			
	Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR		Grado de expansión	MCI	Trofoectodermo	ASEBIR
Mórula compacta	Desde: "Iniciando la expansión"	A	A	A	Desde: "Iniciando la expansión"	A	A	B	B
			B	B			C	C	
			C	C			D	D	
			D	D			A	B	
			B	B			C	C	
	Hasta: "Ecllosionando"	B	A	A	Hasta: "Ecllosionando"	B	A	B	B
			B	B			C	C	
			C	C			D	D	
			D	D			A	B	
			A	A			B	B	
Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	C	B	B	Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)	C	C	C	C	
		C	C			D	D		
		D	D			A,B,C o D	D		
Mórula no compacta	Mórula	D	A,B,C o D	D	Mórula	D	Excluidos	D	

Figuras 6 y 7. Esquemas de valoración de los blastocistos. Adaptado de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 2º y 3º edición. (p.45) 2008 y (p.69 y 70) 2015.

3. Time-Lapse.

Desde el comienzo de la Reproducción Asistida la valoración del desarrollo embrionario *in vitro* se ha realizado a través de observaciones morfológicas puntuales al

microscopio, extrayendo los embriones del incubador en determinadas franjas horarias para valorar diferentes eventos del desarrollo.

La aparición del **Time-Lapse** supuso una revolución en la forma de evaluar el desarrollo de los embriones, combinando la valoración morfológica y la **cinética**. Este nuevo método está compuesto por un incubador que incorpora un microscopio y un sistema de captura de imágenes en determinados intervalos de tiempo (periodos de 5-20 minutos) y en múltiples planos, hasta 11.

Las principales ventajas del Time-Lapse son:

- La reducción de la manipulación de los embriones al mínimo, ya que al no sacarlos del incubador se evita una exposición a condiciones subóptimas, como la luz, y la variación de temperatura, humedad y CO₂, mejorando así las condiciones de cultivo.
- Permite evaluar a los embriones con mayor objetividad y exactitud, pudiendo seleccionar mejor aquellos embriones con mayor potencial de implantación, porque se obtiene una película de todos los eventos del desarrollo embrionario, facilitando así la detección de anomalías.
- Gracias al Time-Lapse se pueden descubrir eventos del desarrollo embrionario que no se detectaban con la valoración convencional por microscopio. Se observa así la posible desaparición temprana de los pronúcleos, la duración de cada ciclo celular, posibles divisiones irregulares, si el embrión excluye células en su desarrollo, la formación y reabsorción de fragmentos, si algún fragmento es tan grande que se puede confundir con una célula, las contracciones del blastocisto, la simetría, la formación de la MCI y la multinucleación.

Con la aparición del Time-Lapse se inició una nueva forma de evaluar a los embriones teniendo en cuenta parámetros **morfocinéticos**, los cuales comienzan con la inyección intracitoplasmática del espermatozoide que es el tiempo de inicio del desarrollo (t0):

- Extrusión del segundo corpúsculo polar (tPB2)
- Aparición y desaparición de los pronúcleos (tPNa/tPNf)
- Divisiones celulares desde 2 hasta 9 células o más
 - El tiempo desde la desaparición de los PN hasta la primera división mitótica se denomina t1.
 - El tiempo de paso de 2 a 3 células, de 3 a 4 células, etc. (t2, t3, t4...)

- Duración del primer, segundo y tercer ciclo celular (cc1, cc2 y cc3)
- Sincronía del segundo y tercer ciclo celular (s2 y s3)
- Compactación: inicio (tSC) y fin (tMf/p)
- Blastulación (tSB)
- Blastocisto (tByz): “y” hace referencia a la MCI y “z” al TE.
- Inicio de la expansión del blastocisto (tEyz)
- Blastocisto hatching (tHnyz)
- Blastocisto hatched (tHDyz)

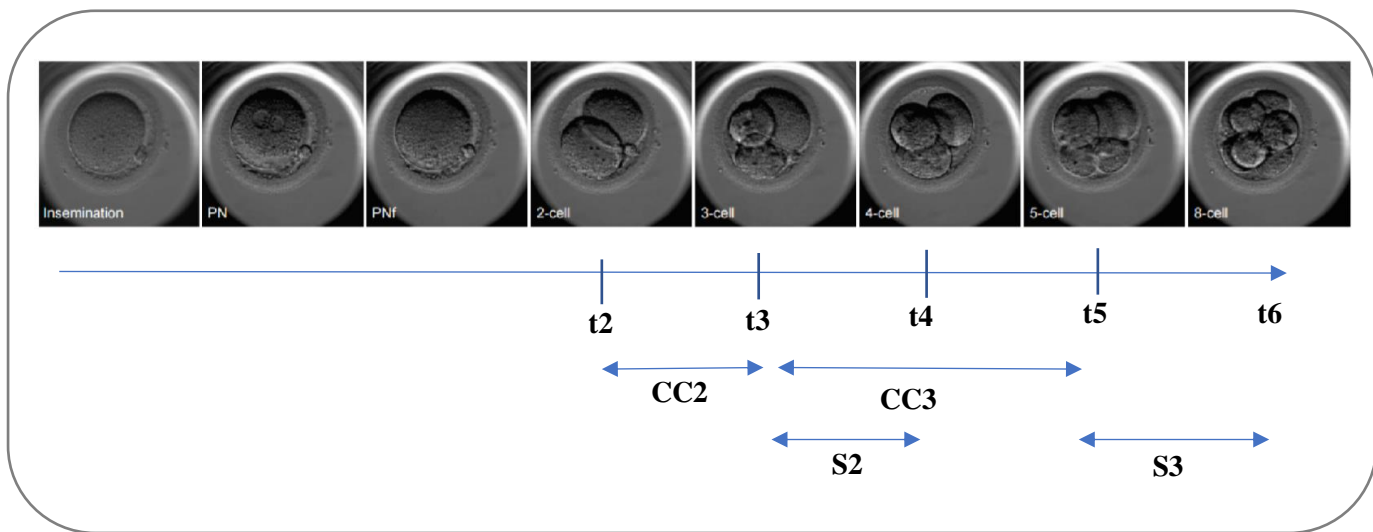


Figura 8. Parámetros morfocinéticos del desarrollo embrionario.

Sin embargo, aunque esta tecnología ha supuesto una revolución para la embriología también presenta limitaciones. Los principales inconvenientes de este método son, por ejemplo, la calidad de la imagen, que influye en la posterior interpretación, la imposibilidad de girar el embrión durante la observación, lo que impide la observación de algunas estructuras porque el embrión es tridimensional, la aparición de burbujas que impiden la visualización del embrión y el posible movimiento de los embriones dentro del pocillo en el incubador.

Tanto el incubador convencional como el Time-Lapse son métodos de cultivo válidos. De hecho, hasta la aparición del Time-Lapse se obtenían buenas tasas con un incubador convencional realizando las observaciones al microscopio. Pero el hecho de contar con esta nueva tecnología mejora las condiciones de cultivo. Por otro lado, se pueden evaluar algunos parámetros que no se observan al microscopio para poder elegir entre 2 embriones de igual calidad. Se ha visto que la valoración morfológica más la cinética

aumenta la capacidad del embriólogo de seleccionar los embriones con mejores posibilidades de llegar a blastocisto de un $18,3 \pm 23,3\%$ a $68,2 \pm 1,7\%$ (18). Otro factor importante a tener en cuenta es que la subjetividad en cuanto a la clasificación disminuye y aumenta la homogeneidad de clasificación entre embriólogos.

Múltiples estudios han comparado la eficacia de ambos métodos, el cultivo tradicional en el incubador con una evaluación morfológica y el Time-Lapse con la evaluación morfocinética.

Park y colaboradores compararon la tasa de implantación, el desarrollo embrionario y calidad morfológica y no encontraron diferencias significativas entre ambos métodos. En cambio, si obtuvieron mayores tasas en cultivo con Time-Lapse de embarazo clínico ($65,7\%$ frente a 39% , $p < 0,001$), embarazo en curso ($55,7\%$ respecto a $31,3\%$, $p < 0,001$) y de nacidos vivos ($45,7\%$ ante $28,4\%$, $p = 0,01$). Con el cultivo en Time-Lapse obtuvieron peor calidad en D+3 y mayor tasa de aborto ($33,3\%$ respecto a $10,2\%$, $p = 0,01$) (18).

Kalleas y colaboradores realizaron un estudio cultivando embriones con bajo nivel de oxígeno en Time-Lapse y sistema convencional, comparando las tasas de nacidos vivos. Obtuvieron buenos resultados con Time-Lapse, la tasa de nacidos vivos aumentó (43% ante $34,5\%$, 95% IC= $0,96-2,13$), la tasa de pérdida temprana del embarazo disminuyó ($5,8\%$ frente a $13,8\%$, 95% IC= $0,19-0,74$) y aumentó la proporción de embriones de 4 y 8 células en D+2 y D+3 (18).

Numerosos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de desarrollar un modelo para predecir los blastocistos con mayor potencial de implantación basándose en la morfocinética.

En 2011 Meseguer y colaboradores establecieron un primer modelo para estudiar la probabilidad de implantación de los embriones analizando la morfocinética. Examinaron los datos morfocinéticos y la implantación era conocida, por lo que establecieron 10 categorías basándose en características embrionarias: análisis morfológico, ausencia de anomalías en el desarrollo, t5, duración s2 y de cc2. Sin embargo, los autores concluyeron que el modelo no era válido, porque no predecía correctamente el potencial de implantación embrionario. Posteriormente en 2015, se estudió un nuevo modelo basado en el anterior de 2011 y concluyeron que la variable más importante para establecer una probabilidad de implantación fue t3, después cc2 y

por último t5; por lo que s2 pasó a ser irrelevante. La división directa de 1 a 3 células, la falta de simetría en 2 células y la multinucleación en 4 células, se sostuvieron como los criterios de descarte.

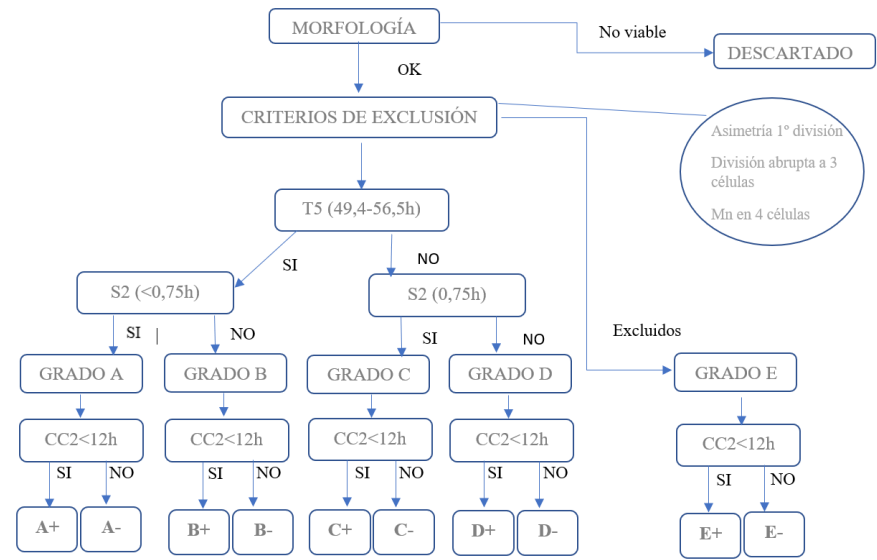


Figura 9. Algoritmo de selección embrionaria de Meseguer (2011)

La aparición de los parámetros morfocinéticos ha supuesto una revolución en la embriología por la posibilidad de conocer en profundidad el desarrollo embrionario, además, poder crear algoritmos para elegir el embrión con mayor probabilidad de implantación. Asimismo, se han propuesto modelos para discriminar entre embriones aneuploides y euploides, para pacientes con un mal pronóstico a los que se les indicaría un diagnóstico genético preimplantacional.

En 2013 Campbell y colaboradores establecieron uno de los primeros modelos para discriminar entre embriones con riesgo de aneuploidía. En el estudio se analizaron embriones a los cuales se les realizaba la biopsia para realizar un diagnóstico genético preimplantacional. Observaron que los parámetros inicio de compactación (tSC), blastulación (tSB) y blastocisto completo (tB) eran más tardíos en los blastocistos con aneuploidías, y no hallaron diferencias significativas en relación a la multinucleación, la división irregular y los primeros ciclos celulares (18).

Kramer y colaboradores analizaron el desarrollo embriológico basándose en el modelo de Campbell. Sin embargo, no obtuvieron los mismos resultados. No pudo diferenciar a los embriones con aneuploidía, porque los valores de formación y expansión del

blastocite no coincidían con los expuestos. También encontraron gran variabilidad entre los tiempos de desarrollo embrionario entre los pacientes (18).

Los autores concluyen que el Time-Lapse y la morfocinética no se pueden emplear como método predictivo del riesgo de aneuploidía embrionaria.

4. Campos a desarrollar.

Como ya conocemos, el desarrollo embrionario es **dinámico**, y la velocidad de división varía a medida que los recursos técnicos aumentan en el laboratorio. El sistema ASEBIR es una clasificación basada en **categorías**, por lo que es necesario una revisión periódica de los parámetros fundamentales para su continua actualización. Por otro lado, el Time-Lapse continúa ayudando a conseguir una mejor definición de los parámetros clásicos, y a la introducción de otros nuevos (aparición de vacuolas, contracción de blastocistos, etc.)

4.1 Aspectos morfológicos ovocitarios.

Actualmente la evaluación de los ovocitos no es relevante para la categorización del embrión, pero al ser esta evaluación embrionaria dinámica, en la cual se valora todos los eventos desde la fecundación hasta D+5, ¿no sería necesaria una evaluación de los ovocitos antes de microinyectarlos para obtener aún más información de cada embrión?

En la clasificación ASEBIR no se incluye la **morfología ovocitaria**, porque en las múltiples publicaciones científicas que abordan este tema no se han encontrado resultados concluyentes. La última edición de 2015 solamente recomienda excluir de la microinyección los ovocitos gigantes. No obstante, habría que hacer una valoración de los ovocitos y anotar aquellas características que pudieran ser relevantes a la hora de elegir entre varios embriones en D+5 con igual categoría, ya que se revisa todo el desarrollo embrionario, debería evaluarse el aspecto del ovocito del cual deriva el embrión.

Habría que tener en cuenta si el ovocito poseía AREL, ya que el Consenso de Estambul recomienda no microinyectarlos, pero en el caso de hacerlo hay que evitar su rotura, ya que es una anomalía severa relacionada con abortos espontáneos y complicaciones obstétricas es un aspecto a tener en cuenta si se valora el desarrollo embrionario.

En el caso de las vacuolas, primero es un campo a seguir investigando ya que no se conoce la repercusión en el desarrollo embrionario de que el ovocito posea vacuolas

pequeñas y escasas. En cambio, si se conoce que la presencia de grandes vacuolas conlleva un fracaso en la fecundación, por lo que es otro aspecto al valorar todo el desarrollo.

La presencia de restos celulares en el espacio perivitelino, que se asocia a menores tasas de implantación.

En el caso del corpúsculo polar, a veces se observa fragmentado y se podría confundir con un corpúsculo múltiple, que conlleva una menor viabilidad.

Un aspecto que no se valora en los cuadernos ASEBIR son las **ondas citoplasmáticas**, que barren el ovocito anticipando la aparición de los pronúcleos. Estas ondas indicarían el comienzo de la activación ovocitaria debido al calcio. Este suceso se cree que es necesario para una correcta fecundación y su desarrollo embrionario posterior. Es un parámetro en el que habría que seguir profundizando y estudiando.

4.2 ¿Es importante valorar al embrión en D+2 y D+3 o una única valoración en D+5 es suficiente si transferimos en blastocisto?

Con la reciente incorporación de la tecnología Time-Lapse, se ha introducido una nueva forma de evaluar a los embriones, la morfocinética, que nos permite visualizar todos los acontecimientos que conlleva el desarrollo de un embrión.

La valoración durante todo el desarrollo embrionario nos aporta mayor información de los embriones, es necesaria una evaluación dinámica. Ante la posibilidad de tener que elegir entre varios embriones para la transferencia debemos revisar todo el desarrollo y elegir aquel con los parámetros más adecuados y sin alteraciones, aquel que tenga la mayor probabilidad de **implantación**. El único beneficio que supondría una única observación en D+5 es evitar la manipulación del embrión y exponerlo a condiciones subóptimas para su desarrollo, pero este inconveniente no supone un problema para el Time-Lapse.

Todos los parámetros morfocinéticos sirven al embriólogo para predecir qué embrión tendrá más posibilidades de llegar a blastocisto, y mayor probabilidad para implantar.

4.3 Colapso de blastocisto.

Los blastocistos realizan **colapsos**, de hecho, se han visualizado dos tipos, uno más débil en el que las células del trofoectodermo se alejan menos del 50% de la zona

pelúcida; y un colapso fuerte en el que la separación era mayor al 50%. No obstante, no todos los blastocistos realizan un colapso, se ha comprobado que un 55,4% realizan este fenómeno (19).

Se ha estudiado si existe una relación entre el colapso del blastocisto y su capacidad para implantar. No se encontraron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de colapso con la capacidad de implantar. Sin embargo, el colapso era algo superior cuando no había implantación. La causa de este resultado puede deberse al gasto energético que supone al blastocisto la reexpansión. No obstante, sí se encontraron diferencias significativas en cuanto al tipo de colapso, ya que existía una mayor implantación con colapsos débiles que fuertes. La razón podría ser que los colapsos débiles faciliten la eclosión del blastocisto y, al contrario, los fuertes suponen un alto gasto de energía que dificultaría la eclosión y la implantación.

También se estudió la relación del colapso con los parámetros morfocinéticos. Los embriones que desarrollaban un colapso fuerte presentaban un menor tiempo de división celular, una reducción en la sincronía entre blastómeros y ciclos celulares más cortos, todo lo contrario, a los embriones con colapsos débiles. Lo que hace pensar que los embriones con colapso fuerte presentarían peor calidad y por ello un peor desarrollo embrionario (19).

Se conoce que el colapso es frecuente en embriones humanos, pero está poco estudiado, especialmente en cómo afecta al desarrollo del embrión. Se necesitan más estudios para conocer si realmente este parámetro podría ser utilizado como criterio en la valoración de los embriones, y si podría ser un factor pronóstico de la implantación.

4.4 Valoración de embriones criopreservados

Los criterios ASEBIR de valoración morfológica son válidos para embriones en fresco, pero no para aquellos que se congelan, por lo que, ¿sería necesario unos criterios para **embriones criopreservados**?

La transferencia de embriones congelados es frecuente en los laboratorios, por lo que se debería establecer un criterio que aunara la tasa de supervivencia con la clasificación embrionaria tras la desvitrificación.

CONCLUSIONES

La principal labor del embriólogo es transferir un embrión con el mayor potencial de implantación, que será aquel con un desarrollo óptimo y sin anomalías. Por ello, la utilización de los criterios ASEBIR en la práctica clínica diaria es de plena importancia para escoger entre una cohorte de embriones aquel con mayores posibilidades de implantar y llevar un recién nacido vivo a los hogares, ya que ese es el fin de la Reproducción Asistida. Además, son numerosos los artículos que se basan en la clasificación ASEBIR para definir sus grupos de estudio en cuanto a calidad embrionaria, lo que amplía las posibilidades de realizar estudios multicéntricos con resultados fiables.

Las principales conclusiones que se extraen de la revisión de los Criterios ASEBIR son:

1. La matriz de la zona pelúcida de los ovocitos sufre cambios en apariencia y grosor, se ha ampliado en la última edición los días de los cambios hasta D+5, no solo hasta D+2.
2. Menores tasas de implantación cuando el ovocito presenta restos celulares en el espacio perivitelino, en la 2ª edición no aparecía.
3. En la última edición se excluyen los ovocitos gigantes.
4. Modificación en los tiempos de observación:
 - a) Aparición de los PN, se ajusta a las 16-18 horas.
 - b) En D+2 reducción a las 43-45 horas y en D+3 a las 67-69 horas.
 - c) En D+4 se actualiza a las 90-94 horas.
 - d) En D+5 el rango está en 112-120 horas.
5. Modificación del número de células en las categorías embrionarias en D+2 y D+3, aquel embrión que proceda de 4 células en D+2 y presente 7-8 en D+3, será óptimo.
6. Un fragmento celular tendrá un diámetro de $<45\mu\text{m}$ en D+2 y $<40\mu\text{m}$ en D+3, y se desaconseja la transferencia o vitrificación de embriones que presenten un 50% fragmentación.
7. Introducción del concepto estadio-específico para hablar de simetría embrionaria.
8. En la última edición se clasifican como tipo C, aquellos embriones de 4 células con 1 célula multinucleada.

9. Se establece una medición para diferenciar el tamaño de las vacuolas, a partir de 14µm son consideradas grandes.

10. En la valoración del blastocisto la evaluación del TF está por encima de la MCI.

En relación al Time-Lapse, ha supuesto una revolución para la embriología, permitiendo mantener las condiciones de cultivo en los incubadores sin la necesidad de sacar los embriones de sus condiciones de cultivo. Además, ha permitido conocer todos los pasos desarrollo embrionario y las anomalías que pueden desarrollarse, ampliando así el conocimiento sobre la embriología. Asimismo, ha permitido la creación de modelos para predecir embriones con el máximo potencial de implantación y riesgo de aneuploidías.

Es cierto que aún quedan muchos campos en los que seguir investigando y realizando estudios como puede ser el colapso embrionario, o algún parámetro que pueda predecir el riesgo de aneuploidías embrionarias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pons M C, De los Santos M J, Múgica A, Vilches M A, Arroyo G, González B, Moragas M, García-Cerrudo E, Figueroa M J, Prados F, Busquets A, Hurtado de Mendoza M V. Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR: estudio multicéntrico para la validación del criterio ASEBIR de valoración morfológica de embriones tempranos en día+3 y su asociación con la tasa de nacido vivo, MEDRE. 2014; 1, 50-55.
2. Hurtado Mendoza M V, Ten J, Arroyo G, de los Santos M J, Pons M C, Cuadros J, Prados F, Gonzalez B, Mugica A, Vilches M A, Rives N, Cuevas I, Figueroa M J, Cuadros M, Busquets A, Calderón G, Moragas M, Torelló J. Cuadernos de embriología clínica III. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 3 th. 2015.
3. Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommerguber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum, Reprod BioMed Online. 2008; 16(1), 113-118.
4. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, Tews G. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development, Fertili Steril. 2005; 83(6), 1635-1640.

5. Farhi J, Nahum H, Weissman A, Zahalka N, Glezerman M, Levran D. Coarse granulation in the perivitelline space and IVF-ICSI outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2002; 19(12), 545-549.
6. Coello Perles A, Sánchez Chiva E, Campos Lozano P, Vallejo Villanueva B, Serrano Notorio J, Meseguer Escrivá M, Cobo Cabal, A. Impacto de la morfología ovocitaria en la supervivencia, fecundación y desarrollo embrionario en ciclo de vitrificación de ovocitos, *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2017;22 (2), 156.
7. Ardoy M, Calderón G, Cuadros J, Figueroa M J, Herrero R, Moreno J M, Ortiz A, Prados F, Rodríguez L, Santaló J, de los Santos M J, Ten J, Torelló M J. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica. II Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2 th. 2008
8. Martínez Moro A, Uriarte Beitia N, García Blanco J, Cuadros Vargas M, López Yáñez L. Relación entre la división temprana, desarrollo embrionario y calidad en estadio de blastocisto en sistemas time-lapse, *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2015;20(2), 221.
9. Rodríguez Arnedo A, Ten Morro J, Tió Marquina M C, Blanca Ordoñez H, Díaz Martínez M C, Lledó Bosch B, Llácer Aparicio J, Bernabéu Pérez R. ¿Existe una relación entre las divisiones embrionarias aceleradas en día 3 y el porcentaje de aneuploidías?, *Rev Asoc Est Biol Rep,* 2015;20(2), 137-138.
10. Magli M C, Gianaroli L, Ferraretti A P, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement, *Fertil Steril.* 2007;87(3), 534-541.
11. Blanca Ordoñez H, Ten Morro J, Rodríguez Arnedo A, Tió Marquina M C, Guerrero Villena J, Díaz Martínez M D, Ochando Sánchez I, Cascales Romero L, Llácer Aparicio J, Bernabéu Pérez R. La asimétrica embrionaria en día 2 y día 3 de desarrollo no aumenta la tasa de aneuploidías, *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2015;20(2), 244.
12. Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin C A. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. *Reprod Biomed Online.* 2004;9, 511-520.
13. Yakin K, Balaban B, Urman B. Impact of the presence of one or more multinucleated blastomeres on the developmental potential of the embryo to the blastocyst stage. *Fertil Steril.* 2005;83 (1), 243-245.

14. Munuera Puigvert A, Almenara Fuentes L, Novo Bruña S, Solans Pomares M, Castelló Zupanc C, López-Teijón Pérez M. Embriones capaces de excluir células multinucleadas durante la blastulación incrementan su potencial reproductivo, *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2019;24(2), 129-130.
15. Rienzi L, Ubaldi F, Minasi M G, Iacobelli M, Martínez F, Tesarik J, Greco E. Blastomere cytoplasmic granularity is unrelated to developmental potential of day 3 human embryos, *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(8), 314-317.
16. Glujovsky D, Farquhar C. Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms?, *Fertil Steril.* 2016;106(2), 244-250.
17. Hill M J, Richter K S, Heitmann R J, Graham J R, Tucker M J, DeCherney A H, Browne P E, Levens E D. Trophoctoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers, *Fertil Steril.* 2013;99(5), 1283-1289.
18. Minasi M G, Greco P, Varricchio M T, Barillari P, Greco E. The clinical use of time-lapse in human-assisted reproduction, *Ther Adv Reprod Health.* 2020;14, 1-15.
19. Navarro A, Royo S, Abad L, Olmedo C, Barea M, Cuevas I. ¿Podemos usar el colapso del blastocisto como marcador de la tasa de implantación?, *Rev Asoc Est Biol Rep.* 2020; 25(1), 21-27.