

## **Trabajo de Fin de Máster en Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida**

La importancia de una correcta valoración morfológica  
embrionaria

Autor: Carmen María Sánchez Sánchez  
Tutor: Irene Rubio Palacios  
Cotutor: Ana Isabel Rodríguez

Alcobendas, septiembre 2023.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1- RESUMEN</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>2- INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>3</b>  |
| 2.1-EVALUACIÓN OVOCITO (D+0).....   | 5         |
| 2.1.1 Complejo cúmulo-corona radiata-ovocito (COC) .....  | 6         |
| 2.1.2 Agrupación de orgánulos/granulosidad en el centro del ovocito .....   | 6         |
| 2.1.3 Agregación de retículo endoplasmático liso (AREL).....  | 7         |
| 2.1.4 Vacuolas .....  | 7         |
| 2.1.5 Inclusiones citoplasmáticas .....   | 8         |
| 2.1.6 Restos celulares en el espacio perivitelino .....   | 8         |
| 2.1.7 Anomalías de la zona pelúcida .....   | 8         |
| 2.1.8 Espacio perivitelino aumentado y debris .....   | 9         |
| 2.1.9 Alteraciones del primer corpúsculo polar.....   | 9         |
| 2.2- EVALUACIÓN ZIGOTO D+1 .....  | 10        |
| 2.2.1 Evaluación de los corpúsculos polares: .....  | 11        |
| 2.2.2. Evaluación de los pronúcleos .....   | 11        |
| 2.2.3. Halo citoplasmático .....  | 13        |
| 2.2.4. División temprana .....  | 13        |
| 2.3- EVALUACIÓN D+2 Y D+3 .....   | 14        |
| 2.3.1 Fragmentación celular .....   | 16        |
| 2.3.2 Número y grado de multinucleación .....   | 16        |
| 2.4- EVALUACIÓN ESTADO DE MÓRULA Y BLASTOCISTO D-4, D-5 Y D-6 .....   | 17        |
| 2.4.1 Grado de expansión del blastocele .....   | 18        |
| 2.4.2 Zona pelúcida .....   | 19        |
| 2.4.3 Trofoectodermo .....  | 20        |
| 2.4.4 Masa celular interna .....  | 20        |
| 2.4.5 Fragmentación y vacuolización .....   | 21        |
| 2.4.6 Categorización de la calidad embrionaria de D+5 y D+6.....  | 21        |
| 2.5- DIFERENTES MÉTODOS DE CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA .....  | 22        |
| 2.5.1 Criterio de clasificación de los blastocistos según el grado de expansión y extrusión de la zona pelúcida:..... | 23        |
| 2.5.2 Criterio de clasificación de los blastocistos según la Masa Celular Interna .....                               | 24        |
| 2.5.3 Criterio de clasificación de los blastocistos según el Trofoectodermo .....                                     | 24        |
| <b>3- OBJETIVOS</b> .....   | <b>24</b> |
| <b>4- MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....  | <b>25</b> |
| <b>5- RESULTADOS</b> .....  | <b>25</b> |
| 5.1 Evaluación de los estudios .....  | 25        |
| 5.2 Resumen de estudios seleccionados.....  | 29        |
| <b>6- ARGUMENTACIÓN CRÍTICA/DISCUSIÓN</b> .....   | <b>31</b> |
| <b>7- CONCLUSIONES</b> .....  | <b>34</b> |
| <b>8- BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>36</b> |

## **1- RESUMEN**

Elegir al embrión con más posibilidades de implantación, es uno de los objetivos principales de la Reproducción Asistida (RA) y para esa elección, la herramienta principal es mediante los criterios de valoración morfológica. El objetivo principal de esta revisión bibliográfica es establecer esas características morfológicas e identificar las características favorables, las desfavorables y saber en base a ellas cómo clasificar los embriones de una cohorte en función a sus posibilidades de éxito. En cuanto a los métodos, se ha recopilado la información más relevante sobre el tema en cuestión en revistas científicas (Reproductive BioMedicine, Human reproduction, Biology of Reproduction, Fertility and Sterility, Ginecología y obstetricia) y la tercera edición del cuaderno ASEBIR. Basándose en los resultados y en la revisión, se puede concluir que realizar una correcta valoración morfológica embrionaria es indispensable para elegir al embrión de mejor calidad.

### **PALABRAS CLAVE**

Ovocito, calidad embrionaria, cigoto, mórula, blastocisto

### **ABSTRACT**

Selecting the embryo with the best possibilities of implantation is one of the main purposes of assisted reproduction and the principal instrument for this process is the morphological evaluation criteria. The principal target of this bibliographic review is establishing the morphological criteria and identify the most favourable and unfavourable features and decide when to discard them. In terms of methods, the most relevant information on this topic has been obtained from scientific journals (Reproductive BioMedicine, Human reproduction, Biology of Reproduction, Fertility and Sterility, Gynaecology and obstetrics) and the third edition of the ASEBIR journal. Based on the results and the review, the conclusion can be reached that performing a correct embryo morphological assessment is indispensable for choosing the best quality embryo.

### **KEY WORDS**

Oocyte, embryo quality, zygote, morula, blastocyst

## 2- INTRODUCCIÓN

Existen evidencias científicas suficientes que avalan que las posibilidades de gestación en la mujer dependen tanto de la receptividad del endometrio como de la calidad embrionaria (ASEBIR, 2015).

En la actualidad a pesar de la multitud de avances científicos para lograr un consenso común en cuanto a los criterios de la valoración embrionaria, no hay un acuerdo aceptado para todos (ASEBIR, 2015). A medida que las condiciones de cultivo embrionario han ido mejorando gracias a la investigación, a los avances en los medios de crecimiento comerciales y a la modernización de los incubadores y otras tecnologías de laboratorio, hemos conseguido que cada vez sean más los estadios embrionarios que pueden llegar a ser observados *in vitro*. Ello ha hecho necesario contar con parámetros de valoración de la calidad desde la etapa de ovocito hasta los embriones en etapa de blastocisto.

¿Cuál es el criterio más comúnmente extendido? Sin duda, el morfológico. El motivo es sencillo y es que sólo es necesario un profesional experimentado para ello. Los embriólogos extraen los cigotos y embriones en momentos puntuales durante los días en los que se encuentran en cultivo en el laboratorio de Fecundación In Vitro (FIV); colocan las placas que los contienen bajo el microscopio invertido y evalúan los diferentes parámetros que luego, bajo un orden jerárquico, transforman en un valor indicativo de menor o mayor calidad. De esa sencilla y rápida manera, al término del cultivo se puede deducir cuáles de los embriones tienen un mayor potencial de implantación.

En un principio se analizaba la morfología del embrión del día 2 (D+2) y 3 (D+3) de cultivo, y el blastocisto en los días 5 o 6 (D+5 o D+6), pero estudios posteriores revelaron la importancia en la valoración de la morfología durante los estadios de ovocito D+0, cigoto y primera división celular (D+1) y mórula (D+4) (ASEBIR, 2015).

Además del método convencional de valoración morfológica, se han ido buscando otros métodos complementarios que puedan aportar un valor diferencial a la hora de tomar decisiones (Cinamodo, y otros, 2022). Las nuevas tecnologías como el time-lapse, la metabolómica, el diagnóstico genético preimplantacional o la respirometría, entre otros, han ido aportando nueva información, modificando algunos criterios de la evaluación embrionaria clásica (ASEBIR, 2015).

El Time-lapse: Es una técnica de seguimiento del desarrollo embrionario que utiliza una cámara especializada para capturar imágenes en intervalos regulares durante todo el proceso. (Gardner & Balaban, 2016)

La Metabolómica: se utiliza para analizar los metabolitos presentes en los medios de cultivo utilizados para el desarrollo embrionario. Al analizar estos metabolitos, se pueden obtener indicadores sobre la calidad y el potencial de viabilidad de los embriones. (Scott, 2008)

Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP): Implica la extracción de una o unas pocas células del embrión en desarrollo y su posterior análisis genético para identificar posibles alteraciones genéticas o cromosómicas en embriones antes de su transferencia al útero. (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022)

Respirometría: Se utiliza para evaluar la viabilidad y la capacidad metabólica de los embriones. Mide la actividad metabólica de los embriones y proporciona información sobre su capacidad para producir energía y mantener un adecuado equilibrio bioenergético (Scott, 2008)

Sin embargo, aún queda bastante por estudiar dentro de estos campos como para que se puedan aplicar de manera rutinaria en los laboratorios de RA (ASEBIR, 2015) (Scott, 2008). La mayoría de las clínicas de Reproducción Asistida siguen seleccionando los embriones de la transferencia en función de las características morfológicas mediante microscopía óptica (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). La existencia de numerosas variaciones en los sistemas de clasificación hace que las comparaciones entre clínicas de reproducción sean complicadas; es indispensable tener un consenso internacional sobre la evaluación morfológica; por eso las diferentes sociedades internacionales de reproducción asistida convocaron un simposio en el año 2010 en Estambul, para alcanzar unos parámetros morfológicos comunes para la clasificación de ovocitos, cigotos y embriones (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

La tercera edición del Cuaderno de Embriología de ASEBIR será clave para esta revisión bibliográfica que irá centrada principalmente en los diferentes parámetros morfológicos dependiendo del estadio embrionario. Es importante mencionar que esta revisión

bibliográfica irá centrada principalmente en analizar cómo se utilizan y combinan para obtener una valoración de la calidad de la cohorte.

Una vez analizados los datos morfológicos, es necesario poder seleccionar los embriones a través de una clasificación; existen dos opciones al respecto: la primera consiste en una valoración por categorías y la otra opción mediante una puntuación; la primera es la más extendida en España, fundamentalmente porque es la que se refleja en los cuadernos de ASEBIR, además la segunda opción es más complicada al tener que consensuar una ponderación para cada uno de los parámetros (ASEBIR, 2015) (Urman & Balabal, 2006).

## 2.1-EVALUACIÓN OVOCITO (D+0)

La calidad del ovocito en D+0 es probablemente el factor limitante más importante en la fertilidad femenina, desempeñando un papel fundamental en la fecundación y el desarrollo embrionario (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022).

La calidad del ovocito no solo está influenciada por el genoma nuclear y el mitocondrial, también lo está por el microambiente del propio ovario y por el folículo preovulatorio durante la transcripción y la traducción, que produce la madurez citoplasmática. Partiendo de esta premisa, podemos aventurar que los factores que más impacto tienen sobre la calidad ovocitaria son:

- La edad: nacemos con un número predeterminado de folículos antrales de manera que a medida que transcurre el tiempo y avanza nuestra edad cronológica, se deterioran las características fisiológicas de esos potenciales ovocitos y aumenta la cantidad de posibles errores genéticos acumulados en ellos (Rienzi, Balaban, Ebner, & Mandelbaum, 2012).
- La aplicación de protocolos de estimulación ovárica: la administración de hormonas exógena que se lleva a cabo para obtener un mayor número de ovocitos y así aumentar el rendimiento del ciclo de Reproducción Asistida (RA) evita la selección ovocitaria que suele ocurrir durante el normal desarrollo del ovocito para su ovulación natural, permitiendo madurar a muchos ovocitos de, a veces, calidad comprometida (ASEBIR, 2015) (Rienzi, Balaban, Ebner, & Mandelbaum, 2012). De hecho, algunos estudios reportan que alrededor de un 60-70% de los ovocitos durante la estimulación ovárica tienen características morfológicas anormales (ASEBIR, 2015) (Rienzi, Balaban, Ebner, & Mandelbaum, 2012).

- La técnica de inseminación: los ovocitos que se fecundan mediante técnicas *in vitro* pueden hacerlo gracias a una FIV convencional (depositándolos en gotas con espermatozoides previamente capacitados) o mediante la inyección intracitoplasmática de espermatozoides o ICSI (en la que se selecciona un espermatozoide y se activa para depositarlo después en el interior de cada ovocito). En el caso de los ovocitos destinados a la FIV convencional, se deben utilizar conservando las células de la granulosa que los rodean para que haya una correcta interacción con los espermatozoides, de forma que no hay muchos parámetros que evaluar. Sin embargo, para la ICSI deben decumularse previamente (eliminar las células de la granulosa adyacentes) para valorar su estado madurativo; sólo aquellos que se encuentren en la fase de Metafase II están en el momento óptimo para ser fecundados y terminar su arresto meiótico. El hecho de decumularlos nos permite además su correcta evaluación morfológica, que a menudo nos da pistas de la calidad con la que contamos de partida (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022).

A continuación, se mostrarán los principales parámetros evaluados en estadio de ovocito D+0:

#### 2.1.1 Complejo cúmulo-corona radiata-ovocito (COC)

El grado de madurez de este complejo ha sido utilizado como indicador de madurez ovocitaria, aunque es bastante cuestionable (especialmente en los ciclos estimulados), debido a las diferencias de sensibilidad de las células del COC inducida por las gonadotropinas. Por lo tanto, se utiliza un sistema de graduación binaria (0 o 1), dónde el 1 es un buen cumulus extendido y una corona con forma radiada (ASEBIR, 2015) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Hay estudios que relacionan una buena calidad del COC con muy buenas tasas de éxito reproductivo (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (Urman & Balabal, 2006).

#### 2.1.2 Agrupación de orgánulos/granulosidad en el centro del ovocito

Son alteraciones morfológicas citoplasmáticas que al microscopio óptico se observan como granulosidades oscuras en el centro del ovocito (ASEBIR, 2015) (S.Meriano, Alexis, Visram-Zaver, Cruz, & F.Casper, 2001). En general se ha aceptado que el citoplasma del ovocito ha de ser claro; (se sabe que solo el 8,3% ovocitos con citoplasma

oscuro formaran embriones de calidad aceptable) (ASEBIR, 2015), de modo que encontrar citoplasmas con abundante granulosidad sería un factor de mal pronóstico.

### 2.1.3 Agregación de retículo endoplasmático liso (AREL)

Es otra alteración citoplasmática en la que se observa una especie de elipse en el centro del citoplasma *figura 1*; la elipse tiene dimensiones parecidas a las del pronúcleo (ASEBIR, 2015) (S.Meriano, Alexis, Visram-Zaver, Cruz, & F.Casper, 2001). Alrededor de un 10% de los ovocitos tienen esta alteración, pero lo importante es que, si durante la ICSI no se rompe, la fecundación puede ser normal (ASEBIR, 2015) (Shaw-Jackson, Beirs, Thomas, Rozenberg, & Autin, 2014). Muchos autores, incluido el consenso de Estambul, no recomiendan la utilización de estos ovocitos para los procesos de Reproducción Asistida, ya que hay estudios que asocian esta alteración con complicaciones obstétricas, sin embargo, algunos autores sí que recomiendan su utilización cuando no hay más ovocitos disponibles (siempre evitando su rotura durante la ICSI) (Shaw-Jackson, Beirs, Thomas, Rozenberg, & Autin, 2014).



*Figura 1. Presencia de AREL (R) y pequeñas vacuolas (V) en el ovocito. Obtenida de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos 3a Edición· 2015.*

### 2.1.4 Vacuolas

Se considera la alteración citoplasmática más frecuente y evidente; las vacuolas pueden presentar diferentes tamaños (ASEBIR, 2015). Cuando las vacuolas son de pequeño tamaño (5-10  $\mu\text{m}$  de diámetro) (véase también en *figura 1*) apenas tienen consecuencias biológicas, sin embargo, las de gran tamaño ( $> 14 \mu\text{m}$  de diámetro) se han asociado a

fracasos en la fecundación y menores tasas de blastocisto (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

#### 2.1.5 Inclusiones citoplasmáticas

Se presentan como cuerpos refringentes compuestos de lípidos y gránulos de pequeño tamaño, no está claro si su presencia afecta o no a la fecundación o a la calidad embrionaria (ASEBIR, 2015).

#### 2.1.6 Restos celulares en el espacio perivitelino

Es una alteración extracitoplasmática dónde se observan detritus en el espacio perivitelino (ASEBIR, 2015). Algunos autores la han relacionado con una menor tasa de implantación, sin embargo, en la actualidad la presencia de detritus no parece que afecte a la calidad embrionaria ni a las tasas de fecundación y por lo tanto no se deben de descartar estos ovocitos (ASEBIR, 2015) (Paes de Almeida Ferreira Braga, y otros, 2010).

#### 2.1.7 Anomalías de la zona pelúcida

La zona pelúcida (ZP) es una matriz glicoproteica sulfatada que se encuentra rodeando al ovocito, desde las primeras etapas de la foliculogénesis; sirve como un “guardián” molecular al proporcionar especificidad de especie durante la unión de los gametos, y después de que el ovocito sea fecundado por un espermatozoide, la liberación del contenido enzimático de los gránulos corticales en el espacio perivitelino (PVS) produce el endurecimiento de la ZP para evitar la poliespermia (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022).

Es interesante estudiar la refringencia y la birrefringencia de la zona pelúcida con luz polarizada; se ha respaldado la idea de que la magnitud del retraso de la luz de las capas internas de la ZP puede ser una medida no invasiva de la calidad de los ovocitos (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022). Los materiales biológicos que presentan un buen ordenamiento o una buena alineación presentan altas propiedades birrefringentes y, en el caso de los ovocitos, se han asociado a mayores tasas de implantación y de formación a blastocisto (ASEBIR, 2015) (Raju, Prakash, Krishna, & Madan, 2007). La utilización de luz polarizada en los ovocitos parece ser bastante prometedora como posible evaluación no invasiva, sin embargo, la falta de ensayos clínicos hace que su uso en la clínica no esté tan generalizado (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022).

### 2.1.8 Espacio perivitelino aumentado y debris

La ausencia de granularidad del espacio perivitelino se ha asociado a una buena calidad ovocitaria (Paes de Almeida Ferreira Braga, y otros, 2010); otros autores la han relacionado como un fenómeno fisiológico, a veces relacionado con altas dosis de gonadotropinas, que no parece afectar a las tasas de fecundación y división celular (Urman & Balabal, 2006). Por el contrario, en algunos estudios se especifica que un espacio perivitelino aumentado está relacionado con una sobremaduración y bajas tasas de fecundación (ASEBIR, 2015).

Los que sí se sabe con certeza es que los ovocitos en metafase II con apariencia citoplasmática normal a veces pueden presentar características extracitoplasmáticas no deseadas como un aumento del espacio perivitelino, detritus perivitelinos y fragmentación del primer corpúsculo polar, sin que ello implique explícitamente una mala calidad ovocitaria (S.Meriano, Alexis, Visram-Zaver, Cruz, & F.Casper, 2001).

### 2.1.9 Alteraciones del primer corpúsculo polar

Algunos autores afirman que no parece que exista relación entre la fragmentación del primer corpúsculo polar (CP) con una mala calidad embrionaria (*figura 2*) (ASEBIR, 2015), sin embargo, otros autores discrepan y lo describen como una alteración extracitoplasmática no deseada (S.Meriano, Alexis, Visram-Zaver, Cruz, & F.Casper, 2001).

El corpúsculo polar es consecuencia de una correcta maduración ovocitaria durante la ovogénesis en el aparato reproductor femenino, desde el punto de vista cromosómico, se considera como una imagen especular del ovocito maduro, de ser cromosómicamente anormal (tener cromosomas adicionales) es de esperar que sea de un tamaño mayor al habitual (ASEBIR, 2015). De momento hoy en día se sigue manteniendo que los ovocitos con un gran CP o CP gigante no deberían ser inseminados debido a su gran relación con aneuploidías, suelen ser ovocitos con más cromosomas adicionales (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (ASEBIR, 2015).

Los ovocitos realmente maduros que presentan el primer corpúsculo polar se encuentran en meiosis II (MII) con las cromátidas alineadas en la placa ecuatorial, por eso una verdadera maduración ovocitaria en MII podría confirmarse con la presencia del huso

meiótico, que se sitúa debajo del primer CP, pero para su correcta visualización se debería de usar luz polarizada (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022).

La evaluación morfológica del primer corpúsculo polar puede utilizarse para determinar la edad post ovulatoria del ovocito y por lo tanto predecir el desarrollo embrionario junto con su potencial de implantación (Urman & Balabal, 2006). Actualmente el uso de luz polarizada ha ayudado a obtener más información respecto al tamaño y a la morfología de los CP; se ha podido constatar que una gran mayoría de ovocitos que presentan CP no han madurado totalmente, (ASEBIR, 2015). La utilización de luz polarizada en los ovocitos fue bastante prometedora en su momento como posible evaluación no invasiva, ya que permitía determinar la ubicación exacta del huso meiótico; de esta manera se podía evitar acercarse a él con la aguja de microinyección en el momento de depositar el espermatozoide en el interior del ovocito. Sin embargo, la falta de ensayos clínicos y el tiempo que ocupa la realización de la técnica hace que su uso en la clínica no esté generalizado (Sciorio, Miranian, & Smith, 2022).



*Figura 2. Corpúsculo polar fragmentado en la primera imagen y en la segunda se observa corpúsculo polar doble. Obtenida de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos 3a Edición · 2015*

## 2.2- EVALUACIÓN ZIGOTO D+1

La presencia de dos núcleos haploides una vez fecundado el óvulo por el espermatozoide, da lugar a una nueva estructura celular denominada cigoto o zigoto. La división de este

zigoto produce dos células simétricas denominadas primeras blastómeras (Cruz Lantigua, 2011)

La fusión del gameto masculino y femenino genera una secuencia importante de acontecimientos estructuro-temporales, Este hecho conlleva la aparición de un par de pronúcleos (PN), uno por cada gameto (ASEBIR, 2015). La valoración de la adecuada fecundación del zigoto debería basarse en la presencia de 2 PNs y 2 CPs (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

A continuación, se nombran los principales parámetros evaluados en el estadio de D+1.

### 2.2.1 Evaluación de los corpúsculos polares:

Según ASEBIR no existen evidencias en relación con el número y con la apariencia de corpúsculos polares (CPs) con la llegada a blastocisto, sin embargo, es importante la observación del número y aspecto de los CPs junto con el número de PNs para la evaluación de la ploidia (ASEBIR, 2015). Una evaluación correcta de la fecundación sería la de los ovocitos que deben presentar 2 PNs y que hayan extruido el segundo CP (Raju, Prakash, Krishna, & Madan, 2007).

También tiene cierta relevancia la localización de los CPs que debe ser comparada con la localización de los PNs. Los PNs deben aparecer alineados con el segundo CP; después los PNs se centran ecuatorialmente al eje polar, determinado así dónde se hará la división meiótica (ASEBIR, 2015) Este parámetro dependerá mucho del momento de la evaluación y de la perspectiva tridimensional, de ahí que se le dé una relevancia relativa.

### 2.2.2. Evaluación de los pronúcleos

Es crucial ser cautos con los márgenes de tiempo adecuados para que no se produzcan fallos en la interpretación (ASEBIR, 2015). Hoy en día gracias al time-lapse la valoración es mucho más precisa (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Los márgenes de tiempo oscilan entre 16-22 horas tras ser inseminados. Aproximadamente a las 9-10 horas post inseminación aparecen los PN y comienza su movimiento hacia la zona central del zigoto: La presencia de estos pronúcleos puede constatarse hasta las 24-28 horas post inseminación (aunque, en ausencia de tecnología TL se procura evaluar entre las 16 y 18 horas post inseminación),

y es en esa franja en la que se debería observar la presencia de 2 CPs Y 2 PNs para dar un ovocito por correctamente fecundado (ASEBIR, 2015)

Se deben descartar los ovocitos fecundados que presentan solo un PN y 2 CPs (Raju, Prakash, Krishna, & Madan, 2007) (ASEBIR, 2015). según el consejo del ASEBIR, sin embargo, si hubiese 2 PNs y un solo CP sería la decisión del laboratorio el continuar o no con el desarrollo *in vitro* (se podría asumir que el primero en ser extruido se ha fragmentado y ha dejado de ser visible) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (ASEBIR, 2015). Cuando se observan 3PN debe descartarse el embrión sin lugar a duda, ya que será triploide. También se deben descartar ovocitos fecundados que presenten 2 PN de tamaño normal y más micronúcleos de menor tamaño. La no presencia de PN cuando el ovocito fecundado presenta 2CP podría sugerir un caso de fecundación muy temprana o al contrario, tratarse de PN de aparición tardía (ASEBIR, 2015); de encontrarse estos cigotos en un sistema TL, debe de realizarse una observación exhaustiva debido a la posibilidad de que se dé uno de estos dos fenómenos.

Además de tener en cuenta el número de CPs y PNs, existe una puntuación de los pronúcleos que proporciona información adicional durante la evaluación posfecundación. Hay tres categorías: simétrica, no simétrica y anormal, en esta última categoría se incluyen los PN sin CP “pronúcleos fantasmas” y los que tienen un solo CP “pronúcleos diana”, ambos asociados a resultados anormales en experimentos con animales (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

En el ovocito fecundado también se debe de examinar la apariencia de los PN y de los precursores nucleolares (NPB) (ASEBIR, 2015) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Se debe de valorar la simetría de los PN, la posición y la localización en el citoplasma. Los NPB se valora el número, la simetría (deben de tener un tamaño similar) y la localización (alineados en la membrana o en la mitad próxima al PN) (ASEBIR, 2015) (Chen & Suresh Kattera, 2006). Lo ideal es que haya de 5 a 7 NPB, con una distribución similar. Cualquier desigualdad en el número y la distribución de los NPB se consideraría como anormal, por eso es importante a la hora de su evaluación rotar el cigoto para asegurarse una evaluación óptima (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group

of Embryology, 2011). Actualmente no existe un consenso en cuanto a la clasificación según su aspecto; sin embargo, existen tres categorías morfológicas que parecen tener relación con la aparición de aneuploidías embrionarias y con bajas tasas de implantación, las cuales son: presentar un solo precursor nucleolar en un pronúcleo, tener los pronúcleos separados y que tengan un tamaño desigual (ASEBIR, 2015) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Con el uso de la tecnología time-lapse se ha podido hacer un seguimiento continuo del embrión desde las primeras horas, y eso ha permitido la correcta diferenciación de ovocitos con un solo pronúcleo de los ovocitos correctamente fecundados, de fenómenos como la asincronía de su aparición o dar explicación a casos de aparente fallo de fecundación, donde lo que ha ocurrido es una desaparición temprana de los pronúcleos de la cohorte (ASEBIR, 2015).

### 2.2.3. Halo citoplasmático

El Halo citoplasmático es un área cortical con apariencia más clara en parte o todo el citoplasma. Los cigotos que lo presentan evolucionan como embriones de mejor calidad (60,9%) que los cigotos sin halo (52,2%); sin embargo, no es un criterio de exclusión (ASEBIR, 2015).

### 2.2.4. División temprana

La primera división celular produce dos células simétricas o lo denominado “primeras blastómeras”. Es aconsejable realizar la observación de este parámetro entre las 25 y 27 horas post-ICSI (lo que no suele ser habitual en los laboratorios de FIV salvo que sea contar con tecnología time-lapse (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011) (Chen & Suresh Kattera, 2006). Es recomendable seleccionar al embrión que a las 26 horas post inseminación presenta blastómeros de un tamaño similar y no presente fragmentación ni multinucleación (ASEBIR, 2015) (Chen & Suresh Kattera, 2006)

La frecuencia de la división temprana nos dice que se espera que alrededor del 50% de los ciclos presenten al menos 1 embrión con divisiones a las 26 +/- 2 horas y esta probabilidad disminuye conforme aumenta la edad de la paciente (ASEBIR, 2015). Hay múltiples artículos en la literatura que aseguran que los cigotos que se dividen de manera

precoz en el día 1, están asociados a una mayor tasa de implantación y de embarazo que los cigotos que no lo hacen precozmente (Chen & Suresh Kattera, 2006)

Es importante realizar una única observación de la morfología pronuclear a la hora de comprobar la fecundación (ASEBIR, 2015) (Chen & Suresh Kattera, 2006). Normalmente los cigotos que presentan división temprana se caracterizan porque los nucleolos se unen para dar lugar a estructuras menos numerosas, pero de mayor tamaño; el tamaño, por lo tanto, indica la progresión del desarrollo y la edad de los cigotos (Chen & Suresh Kattera, 2006).

ASEBIR aconseja utilizar la división temprana como un parámetro secundario, únicamente para decidir a los embriones que tienen una calidad similar (ver *Tabla 1*) (ASEBIR, 2015). Algunos autores concluyen que, en términos de implantación, es mejor utilizar la evaluación de la morfología pronuclear a la división temprana (Chen & Suresh Kattera, 2006).

| FAVORABLE                                 | DESFAVORABLE   | A DESCARTAR                           |
|---|--|---------------------------------------|
| La presencia de halo<br>División temprana | Estado diferente a 2PN + 2CP<br>Un solo precursor nucleolar en uno de los PN<br>PN separados o de diferente tamaño<br>División directa a 3 células | 1PN + 1CP<br>2 PN + 1CP<br>Más de 2PN |

*Tabla 1: elaboración propia, información obtenida según los criterios de ASEBIR.*

Dentro de la división temprana se ha descrito un fenómeno llamado la división directa; consiste en la división de 1 a 3 células del cigoto en menos de 5 horas y ha sido relacionado de forma negativa con respecto a la implantación, por lo que se considera como un pronóstico desfavorable y deberían de descartarse estos embriones (ASEBIR, 2015)

### 2.3- EVALUACIÓN D+2 Y D+3

Los intervalos de tiempo de observación post-inseminación en D+2 y D+3 está entre las 43-45 horas y a las 67-69 horas respectivamente (ASEBIR, 2015) (Chen & Suresh Kattera, 2006).

La segunda división mitótica se produce aproximadamente 48 horas tras la fecundación y debería dar lugar a 4 blastómeras de apariencia y tamaño similar. Cuando se correlaciona la tasa de implantación con el número de blastómeras en día 2 de desarrollo la clasificación ASEBIR nos indica que los mejores resultados los obtienen aquellos embriones con 4 células, seguidos (de mejor a peor tasa de implantación) los de 5 células; 2,3 o 6 células; y una o más de 6 células (ASEBIR, 2015) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Cuando hablamos de la simetría celular, los embriones se pueden clasificar según el tamaño de los blastómeros estadio-específico. ASEBIR utiliza la siguiente nomenclatura: embrión estadio-específico, es aquel en el que el tamaño de los blastómeros es acorde con el ciclo de división; y el embrión no estadio-específico, los blastómeros difieren de tamaño con el ciclo de división (ASEBIR, 2015)

Algunos autores relacionan la diferencia de tamaños de los blastómeros con baja capacidad de implantación (ASEBIR, 2015). Un mayor número y diferencia de tamaño de los blastómeros en los días 2 y 3, se ha asociado a mayores tasas de aberración cromosómica (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

D+3 a las 68 $\pm$  1 horas, los embriones de mejor calidad y los que mayor probabilidad de implantación tienen son los que llegan a 7 u 8 células y que procedan de 4 células del D+2 (ASEBIR, 2015); está demostrado que embriones con menos de 7 o más de 8 blastómeros durante D+3 tienen mayores tasas de aneuploidías (ASEBIR, 2015) (Chen & Suresh Kattera, 2006).

Existen controversias sobre si la selección embrionaria en el día 3 debería hacerse en combinación con la morfología nuclear o con el desarrollo temprano del cigoto en el día 1, pero se puede predecir a partir de la morfología pronuclear, la división temprana del cigoto y el número de blastómeros en el D+2 y D+3 (Chen & Suresh Kattera, 2006)

Como el desarrollo embrionario es un evento dinámico, la evaluación en D+3 depende del ritmo de división del embrión del día 2 (ASEBIR, 2015). De manera que la combinación de ambos criterios nos da una idea de la cinética de cada embrión de la cohorte.

Pero no sólo el número de células es relevante, hay una serie de factores que pueden disminuir la calidad global del embrión. Los más conocidos son:

### 2.3.1 Fragmentación celular

La fragmentación celular influye sobre el potencial implantatorio, junto con el número de blastómeras y el patrón de división de D+2 y D+3 (ASEBIR, 2015) (S.Meriano, Alexis, Visram-Zaver, Cruz, & F.Casper, 2001) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Así mismo, se puede predecir el número de blastómeros en los días 2 y 3 con la morfología pronuclear y la tasa de división celular (Chen & Suresh Kattera, 2006).

Cuando se estudia la fragmentación celular hay dos aspectos a tener en cuenta: el número y la distribución de estos. En cuanto al porcentaje de fragmentación, está relacionado con el volumen celular y se establece un punto de corte <10% de fragmentación asociado a mayores tasas de implantación y de calidad embrionaria, sin embargo, se acepta una fragmentación de hasta el 25% (ASEBIR, 2015) (S.Meriano, Alexis, Visram-Zaver, Cruz, & F.Casper, 2001). Embriones con más del 50% de fragmentación suelen detener su desarrollo y en caso de ser transferidos tienen tasas de implantación casi inexistentes (ASEBIR, 2015).

### 2.3.2 Número y grado de multinucleación

La observación de los núcleos en las blastómeras es de gran importancia en los laboratorios de reproducción asistida. La visualización de un solo núcleo por cada blastómero es un buen predictor del potencial implantatorio (ASEBIR, 2015).

Es más sencilla la visualización en el estadio de dos células, ya que cuanto mayor número de células más pequeños son los blastómeros y por lo tanto más difícil de evaluar los núcleos en el interior de cada una de ellas (ASEBIR, 2015).

Un blastómero que tiene más de un núcleo se define como multinucleado y su presencia se considera anormal, se han sugerido varios factores externos que pueden promover la multinucleación como variación del pH en los medios de cultivo y una temperatura de incubación inadecuadas (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). La multinucleación además está altamente relacionada con aberraciones cromosómicas, y está demostrado que presentan bajas tasas

de implantación y de nacimiento (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la célula tiene cierta capacidad de autocorrección y que, con relativa frecuencia, nos encontramos con embriones multinucleados en D+2 y que sin embargo tienen todas sus blastómeras mononucleadas en D+3.

#### 2.4- EVALUACIÓN ESTADO DE MÓRULA Y BLASTOCISTO D+4, D+5 Y D+6

A los 4 días de la formación del cigoto hay entre 16 a 32 células y cada vez va siendo más pequeño su contenido citoplasmático,; a partir de aquí las blastómeras entran en contacto más estrecho unas a otras y se desarrollan mecanismos de adhesión diferencial denominándose el embrión resultante “mórula” (Cruz Lantigua, 2011). En este estadio normalmente no se hace valoración embrionaria ya que no podemos diferenciar estructuras más allá de clasificar el grado de compactación de la mórula.

A medida que comienza la blastulación, las blastómeras que se encontraban en la zona más externa pasarán a formar parte de la masa externa que recibe el nombre de trofoectodermo (TE) y las que se encontraban más en el interior como masa interna denominándose masa celular interna (MCI) (Cruz Lantigua, 2011). El primero dará lugar a la placenta y el segundo tipo celular, al feto.

Sobre el día 5 (aproximadamente 124 horas después de la fecundación) el blastocisto comienza una serie de contracciones y expansiones cuya finalidad es liberarse de la ZP para tratar de comenzar lo que sería el proceso de implantación (en torno al día 6 de desarrollo) (Cruz Lantigua, 2011).

Grosso modo, cuando evaluamos la etapa en la que se encuentra el blastocisto se deberá tener en cuenta: el grado de expansión de la zona pelúcida, el blastocele, la masa celular interna y el trofoectodermo (ASEBIR, 2015).

ASEBIR propone una clasificación de estos embriones, subdividiéndose en 4 categorías: A, B, C y D (*Figura 3.*); teniendo en cuenta el tamaño, la forma y grado de compactación de la masa celular interna, el grado de expansión del blastocele y la estructura y el número de células del trofoectodermo (ASEBIR, 2015). “A” representa el embrión con mayor

calidad y por lo tanto mayor potencial de implantación y “D” representa lo contrario (Cívico Vallejos, Hernández Dacruz, & Cívico Vallejos, 2022).

|   | A  | B  | C   | D   |
|---|--|--|---|---|
| A |   |   |   |   |
| B |  |   |   |   |
| C |  |  |  |   |
| D |  |  |   |  |

Figura 3. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad de la MCI y el TE. Elaboración propia, Obtenida de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Ovocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos 3a Edición · 2015

#### 2.4.1 Grado de expansión del blastocele

Se observa un aumento del volumen del blastocele junto con un adelgazamiento de la zona pelúcida (figura 4) (ASEBIR, 2015).

Su formación está relacionada con un proceso correcto de maduración trofoblástica, favoreciendo las tasas de implantación (ASEBIR, 2015). La producción de la expansión

requiere la utilización de la energía a través de las ATPasas de sodio/potasio en la membrana del trofoectodermo, por lo que su expansión es un reflejo de la competencia del embrión (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Es importante destacar si un blastocisto está colapsado en el momento de la evaluación de la expansión, debería volver a evaluarse de nuevo 1 o 2 horas más tarde (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).



*Figura 4. (A) blastocisto temprano, (B) blastocisto en expansión y (C) blastocisto expandido. Se observa un aumento de tamaño del blastocisto junto con un adelgazamiento de la zona pelúcida gradual. Obtenida de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Ovocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos 3a Edición · 2015*

#### 2.4.2 Zona pelúcida

Como se ha mencionado anteriormente con la expansión del blastocele se produce un adelgazamiento de la ZP, alcanzando la máxima finura cuando el blastocisto está totalmente expandido, produciéndose una apertura de esta e iniciándose una “eclosión” (ASEBIR, 2015). La “eclosión” se defina como una salida de emergencia del trofoectodermo cuando ya no puede expandirse más en un blastocisto cerrado; esta supuesta “eclosión” no se puede evaluar si previamente ya hay una zona pelúcida rota artificialmente (por ejemplo, la que se realiza para la biopsia embrionaria previa al análisis genético de las células obtenidas) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

### 2.4.3 Trofoectodermo

Se define como una capa de células cohesionadas que forman la pared del blastocele o la cavidad del blastocisto; ASEBIR lo clasifica en distintas categorías según el grado de cohesión: homogéneo, irregular o irregular con escasas células (ASEBIR, 2015).

El grado de desarrollo de trofoectodermo es esencial para la capacidad del embrión para implantarse en el endometrio (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

### 2.4.4 Masa celular interna

La masa celular interna (MCI) originará el hipoblasto y el epiblasto, que darán lugar al saco vitelino, y al saco amniótico respectivamente. La MCI deberá tener una forma oval y sus células deberán tener un buen número y estar compactas (ASEBIR, 2015). La MCI es esencial para el correcto desarrollo embrionario y del feto (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Se ha determinado que hay mejores pronósticos para la implantación y desarrollo fetal cuando su MCI tenga mayor número de células, y estén más compactas y adheridas entre sí (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Hoy en día, la tendencia en la gran mayoría de las clínicas de reproducción asistida se realiza la transferencia embrionaria en estadio de blastocisto, debido a una serie de ventajas: mejor selección embrionaria y mejor sincronía entre el estadio embrionario y el ambiente uterino; además se han observado mayores tasas de gestación y de recién nacido vivo (ASEBIR, 2015).

Está demostrado que no todos los embriones son capaces de llegar a estadio de blastocisto, únicamente entre el 40 y 60% de los ovocitos fecundados *in vitro* (ASEBIR, 2015). Se debe tener en cuenta que lo ideal es que lleguen a blastocisto en día 5, pero algunos embriones lo consiguen más tarde; son los embriones del día 6 y 7; estos embriones tienen inferiores tasas de implantación (ASEBIR, 2015) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

#### 2.4.5 Fragmentación y vacuolización

No existen suficientes fuentes bibliográficas que los relacione directamente con fallos en la implantación, sin embargo, su presencia está vinculado a una mala morfología del blastocisto y un factor de mal pronóstico (ASEBIR, 2015).

#### 2.4.6 Categorización de la calidad embrionaria de D+5 y D+6

Según los criterios del ASEBIR y el consenso de Estambul (ESHRE), se debe observar al embrión del día 5 a las 114-118 horas post inseminación y el día 6 a las 136-140 horas post inseminación (ASEBIR, 2015) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Se categorizarán de la A a la D, es decir, de mejor a peor tasa de implantación respectivamente según la masa celular interna y el trofoectodermo (*tablas 2 y 3*):

| <b>Categoría</b> | <b>Tamaño MCI (µm<sup>2</sup>)</b> | <b>Cohesión</b> |
|------------------|------------------------------------|-----------------|
| <b>A</b>         | 3800-1900                          | Compacta        |
| <b>B</b>         | 3800-1900                          | No compacta     |
| <b>C</b>         | 1900                               | Indiferente     |
| <b>D</b>         | Signos de degeneración             | Indiferente     |
| <b>Excluidos</b> | Degenerada                         | Indiferente     |

*Tabla 2. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad de la MCI. Elaboración propia, Obtenida de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos 3a Edición · 2015*

| <b>Categoría</b> | <b>Descripción del trofoectodermo</b>   |
|------------------|---|
| <b>A</b>         | Homogéneo, cohesionado y muchas células |
| <b>B</b>         | Homogéneo; menos células                |
| <b>C</b>         | Pocas células                           |
| <b>D</b>         | Signos de degeneración                  |
| <b>Excluidos</b> | Degenerado                              |

*Tabla 3. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad del TE. Elaboración propia, Obtenida de Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos 3a Edición · 2015.*

## 2.5- DIFERENTES MÉTODOS DE CLASIFICACIÓN EMBRIONARIA

Una cuestión frecuentemente planteada es: ¿Por qué se deben puntuar los embriones? ¿Por qué no se cultivan hasta blastocisto y se seleccionan entonces? Estas cuestiones se abordan porque el desarrollo embrionario es un proceso dinámico y estrechamente dependiente de las condiciones de cultivo en las que crecen. Está claro que un motivo de gran peso por los que se determinan los parámetros morfológicos es por la visualización de dos pronúcleos, ya que se ha observado que los blastocistos aneuploides pueden llegar a desarrollarse muy bien y tener una apariencia excelente.

Las características de división en el embrión temprano pueden predecir el potencial de esos embriones para implantar. Una vez se forma el blastocisto, aunque sea de muy buena calidad, si en estadios previos de división las características morfológicas tempranas no eran buenas, parecen perder su valor predictivo sobre la implantación. Por el contrario, un embrión con buenos parámetros en sus inicios pero que durante el cultivo prolongado va perdiendo cualidades, disminuirá su potencial de implantación. Esto sugiere que los parámetros morfológicos en el embrión temprano son marcadores potenciales, sin embargo, los parámetros morfológicos en el blastocisto tienen mayor sensibilidad y especificidad respecto al potencial de implantación (Gardner & Balaban, 2016).

La mejora en el cultivo embrionario ha facilitado la transferencia en el día 5 o 6 de desarrollo, ya que un mayor número de embriones alcanzan el estadio de blastocisto con

buena calidad, con el consiguiente aumento de las tasas de embarazo. Esta realidad ha ido permitiendo promover el SET (Single Embryo Transfer), de manera que se mantienen excelentes tasas de gestación y recién nacido, pero reduciendo las tasas de embarazo múltiple, evitando así las complicaciones de los embarazos múltiples tanto para la madre como para los bebés (D'Agostino, y otros, 2019).

Estas cuestiones han supuesto nuevos métodos de clasificación embrionaria. En España, las clínicas de reproducción asistida se rigen sobre todo por los criterios de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR), que es una entidad española reconocida internacionalmente; pero cabe otra clasificación que está más extendida en el resto de los países, que es el sistema de Gardner.

A continuación, se explicará la puntuación Gardner, concretamente en cuanto a la puntuación de los blastocistos (Gardner & Balaban, 2016). Gardner en el año 2000 describió una clasificación de tipo alfanumérica, según el grado de expansión del blastocisto ( del 1 al 6, de menos a más expandido respectivamente) y en el grado de desarrollo de la MCI y del TE (de A a C desde mejor a peor calidad respectivamente), posteriormente el método Gardner fue modificado mediante el desarrollo de una puntuación de calidad de blastocisto “BQS”, multiplicando la tasa de expansión del 1 al 6 por la puntuación de la masa (convirtiendo así ABC en 3,2 y 1 respectivamente) y por la puntuación del TE. Finalmente, en 2011 el consenso de Estambul propuso esta clasificación, pero la facilitó cambiando el A, B y C por 1, 2 y 3 (de mejor a peor); representándola de manera más analítica y estadística (D'Agostino, y otros, 2019) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

#### 2.5.1 Criterio de clasificación de los blastocistos según el grado de expansión y extrusión de la zona pelúcida:

Los criterios según Gardner para el grado de expansión y de extrusión de la zona pelúcida son: “1” blastocisto temprano, el blastocele ocupa menos del 50% del volumen del embrión, “2” el blastocele ocupa el 50% o más del volumen embrionario, “3” el blastocele ocupa todo el volumen embrionario, sin embargo la ZP no se encuentra adelgazada, “4” es un blastocisto expandido, ocupa un volumen mayor al inicial y la ZP está adelgazada,

“5” el blastocisto expandido está eclosionando hacia afuera de la ZP y “6” el blastocisto está completamente fuera de la ZP (D’Agostino, y otros, 2019).

Una vez clasificado el blastocisto según el grado de expansión, si llega a la puntuación “3”, se debe clasificar la MCI y el TE.

### 2.5.2 Criterio de clasificación de los blastocistos según la Masa Celular Interna

Se clasifican como A, B y C (de mejor a peor morfología respectivamente): “A” cuando presenta numerosas células compactadas produciendo el aspecto de una masa oval, “B” las células aparecen en menor número y de forma menos compacta, “C” pocas células y además no compactadas (D’Agostino, y otros, 2019).

La anterior clasificación es más subjetiva en comparación con la clasificación de la masa según ASEBIR: “A” diámetro de la masa es entre 1900 y 3800  $\mu\text{m}^2$  y “B” diámetros de la masa comparado con el tamaño de las blastómeras en estadio de 4 y 8 células y “C” cuando el diámetro de la MCI es menor a 1900  $\mu\text{m}^2$  (ASEBIR, 2015) (D’Agostino, y otros, 2019).

### 2.5.3 Criterio de clasificación de los blastocistos según el Trofoectodermo

El TE también es clasificado con letras (de mejor a peor morfología respectivamente): “A” abundantes células formando un TE de apariencia cohesiva y homogénea con células alargadas; “B” número menor de células de apariencia heterogénea y menor cohesivas; y “C” epitelio totalmente irregular con células bastante escasas (D’Agostino, y otros, 2019).

## 3- OBJETIVOS

1. Establecer la importancia que es tener un consenso común de los parámetros morfológicos de evaluación de los ovocitos D+0, D+1, D+2, D+3, D+4, D+5 y D+6.
2. Establecer las características morfológicas de los ovocitos D+0, D+1, D+2, D+3, D+4, D+5 y D+6.
3. Identificar las características desfavorables, favorables y saber cuándo se debe descartar los cigotos y embriones.
4. Resumir e identificar otros métodos de evaluación morfológica embrionaria.

#### 4- MATERIAL Y MÉTODOS

El método empleado para el desarrollo del trabajo ha sido a través de una revisión bibliográfica, donde se ha ido recopilando la información más relevante sobre el tema en cuestión; se ha priorizado los artículos científicos más actuales, siendo el más actual del año 2022 y el más antiguo del año 2001.

En cuanto a la realización de la búsqueda de información, se han utilizado documentos científicos, a partir de las siguientes bases de datos: Pubmen, ScienceDirect, Library of Congress, Google Scholar, Embase, Medline y SciFinder.

Los criterios de inclusión aplicados a la búsqueda bibliográfica fueron: artículos con información clínica sobre la evaluación embrionaria, y artículos comprendidos en los años 2000-2022.

Los criterios de exclusión durante la búsqueda bibliográfica fueron: artículos duplicados, páginas web poco conocidas, artículos que no sean en inglés o español y artículos más antiguos que el año 2000.

En el apartado de bibliografía se encuentra el material empleado para el desarrollo de la revisión bibliográfica ordenado mediante orden alfabético a través de las normas APA, siendo clave el cuaderno de ASEBIR (3a edición del 2015).

#### 5- RESULTADOS

##### 5.1 Evaluación de los estudios

Después de la búsqueda bibliográfica se evaluó la calidad de los artículos para su selección, esto fue mediante los criterios de inclusión y exclusión nombrados anteriormente.

A continuación, en la *tabla 4* se muestra la tabla resumen de los estudios seleccionados según el tipo de estudio, el objetivo principal y el material y los métodos que emplearon los autores:

| <b>Estudio</b>  | <b>Tipo de estudio</b> | <b>Objetivo</b>   | <b>Material y métodos</b>   |
|---|------------------------|---|---|
| <b>Human oocyte respiration (rate measurement) potential to improve oocyte and embryo selection?</b>  | Estudio observacional  | Evaluar la relación entre la tasa de respiración de los ovocitos, así como su capacidad para desarrollarse a embriones  | Se registraron las tasas de respiración de ovocitos humanos individuales. Se utilizaron ovocitos inmaduros o maduros, no fertilizados, de un programa clínico de reproducción asistida. Se registraron las diferencias en las tasas de respiración entre ovocitos dentro de una cohorte y entre cohortes de ovocitos. |
| <b>Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles.</b>   | Estudio observacional  | Determinar si las dismorfias del ovocito, especialmente la repetición de dismorfias específicas de un ciclo a otro, tienen un impacto pronóstico en el resultado de la ICSI         | Se agruparon pacientes sometidas a ICSI en función del porcentaje de ovocitos dismórficos y la repetición de dismorfias específicas entre dos ciclos. Se evaluaron los resultados de embarazo clínico y tasas de implantación en los diferentes grupos.   |
| <b>Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study</b> | Estudio aleatorizado   | Determinar si la morfología de los pronúcleos y la división temprana del cigoto son predictivas en términos de implantación y embarazo.   | Los pacientes se asignaron aleatoriamente a dos grupos, basados en la clasificación de los embriones en subgrupos según la morfología de los pronúcleos o el estado de división temprana del cigoto. Se compararon las tasas de implantación y embarazo entre los grupos y subgrupos correspondientes.                |
| <b>Zona pellucida birefringence in vivo and in vitro matured oocytes</b>  | Estudio prospectivo    | Evaluar la birefringencia de la zona pelúcida en ovocitos maduros e inmaduros obtenidos después de la estimulación ovárica controlada y su influencia en el desarrollo del ovocito. | Se evaluó la birefringencia de la zona pelúcida en ovocitos maduros e inmaduros utilizando un software de imagen de polarización. Se analizó la influencia de la birefringencia en la maduración nuclear espontánea in vitro, la fertilización y la calidad embrionaria.  |
| <b>Meiotic spindle and zona pellucida</b>   | Estudio prospectivo    | Evaluar las características del huso  | Se analizaron las características del huso  |

|   |                           |   |  |
|---|---------------------------|---|--|
| <b>characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging</b>                         |                           | meiótico y de la zona pelúcida utilizando PolScope y analizar su relación con el potencial de desarrollo embrionario.   | meiótico y de la zona pelúcida en ovocitos maduros utilizando PolScope. Se evaluó la relación entre estas características y la progresión a blastocistos después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides  |
| <b>Asociación entre la calidad de blastocistos y los resultados en la transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido</b> | Estudio retrospectivo     | Evaluar la variabilidad interoperatoria en la clasificación de blastocistos y determinar si los criterios de clasificación utilizados tienen valor predictivo para la implantación.   | En un estudio retrospectivo de 645 transferencias de blastocistos congelados, se evaluó la concordancia entre operadores y el valor predictivo de la clasificación morfológica en la tasa de implantación.   |
| <b>Inter-centre reliability in embryo grading across several IVF clinics is limited: implications for embryo selection</b>        | Observacional transversal | - Evaluar la fiabilidad intra-centro y la fiabilidad inter-centro en la clasificación de embriones según el Consenso de Estambul.<br>- Evaluar el impacto de la capacitación interactiva en la mejora de la fiabilidad de la clasificación. | Se tomaron tres fotografías de 40 embriones de 3 días y 40 blastocistos en diferentes planos focales. Las imágenes se recopilaron en dos conjuntos y fueron tomadas por un embriólogo no involucrado en la encuesta en un centro de FIV. El software utilizado fue EmbryoScope's EmbryoViewer. |

*Tabla 4. Comparativa de los diferentes estudios utilizados en la bibliografía según el título, el tipo de estudio, el objetivo principal y el material y métodos empleados.*

Seleccionar al mejor embrión en base a su morfología es la base de esta revisión bibliográfica. La *Tabla 5* demuestra la comparativa de los 6 estudios revisados entre los diferentes valores que afectan positiva y negativamente junto con los efectos que producen al estar presentes:

| <b>Estudio</b>  | <b>Valores estudiados que afectan positivamente</b> | <b>Efecto positivo</b>       | <b>Valores estudiados que afectan negativamente</b> | <b>Efecto negativo</b>           |
|---|---|------------------------------|---|----------------------------------|
| <b>Human oocyte respiration (rate measurement) potential to</b> | -Valores normales de FSH (0-7,9 mIU/ml)             | Mayores tasas de fecundación | - Baja carga de ADN mitocondrial                    | Fallos o bajas tasas fecundación |

|   |  |  |   |  |
|---|--|--|---|--|
| <b>improve oocyte and embryo selection?</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Edad materna &lt; 35 años</li> <li>- Tasas de respiración comprendidas en 0,514 (nl O2/h)a</li> </ul> |  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tasas de respiración significativamente reducidas</li> <li>-Edad materna avanzada</li> <li>- Altos valores de FSH FSH <math>\geq</math>11 mIU/ml.</li> </ul>                       |  |
| <b>Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles.</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ausencia de cluster en la cohorte</li> </ul>  | Mayores tasas de fecundación e implantación                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Presencia de cluster en la mayoría de los ovocitos de la cohorte</li> </ul>  | Bajas tasas de fecundación e implantación                          |
| <b>Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zigotos con un nucleolo de tamaño normal y alineado con ambos pronúcleos</li> </ul>                   | Mayores tasas de implantación y embarazo clínico                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Zigotos con nucleolo normal pero ambos pronúcleos no alineados</li> <li>- Zigotos con nucleolo más pequeño de lo normal</li> </ul>   | Bajas tasas de implantación y embarazo clínico                     |
| <b>Zona pellucida birefringence in in vivo and in vitro matured oocytes</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovocitos en MII con niveles altos de birrefringencia de la ZP</li> </ul>                              | <p>Mayores tasas de fecundación</p> <p>Mayor calidad embrionaria</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovocitos en MII con niveles bajos de birrefringencia de la ZP</li> <li>- Ovocitos en MI madurados a MII en el laboratorio con niveles bajos de birrefringencia de la ZP</li> </ul> | <p>Bajas tasas de fecundación</p> <p>Menos calidad embrionaria</p> |
| <b>Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging</b>                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovocitos con una retardancia &gt; 3nm</li> <li>-Ovocitos con longitudes de huso &gt;12nm</li> </ul>   | Mayores tasas a blastocisto  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Ovocitos con retardancias comprendidas entre 2-3 nm o &lt;2 nm.</li> <li>-Ovocitos con longitudes de huso de 10-12 nm o &lt;10 nm</li> </ul>  | Menores tasas a blastocisto  |

|   |   |   |   |                               |
|---|---|---|---|-------------------------------|
| <b>Asociación entre la calidad de blastocistos y los resultados en la transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido</b> | - Edad materna < 35 años<br><br>- Clasificación según Gardner 3BB o mejor | Blatocistos de mejor calidad<br><br>Mayores tasas de implantación | - Edad materna >35 años<br><br>- Clasificación según Gardner <3BB | Menores tasas de implantación |
|---|---|---|---|-------------------------------|

*Tabla 5. Comparativa de los diferentes estudios utilizados en la bibliografía para determinar valores que afectan positiva y negativamente en ovocitos, cigotos y embriones. Elaboración propia.*

## 5.2 Resumen de estudios seleccionados

Para comparar unos estudios con otros y seleccionar los que eran diferentes para que no se hiciera repetitiva la información se realizó una tabla resumen comparativa *Tabla 6*:

| Estudio   | Número de muestra (n) | Parámetros evaluados  | Resultados   | Conclusión   |
|---|-----------------------|---|--|--|
| <b>Human oocyte respiration (rate measurement) potential to improve oocyte and embryo selection?</b>                    | 502 ovocitos          | - Tasas basales de respiración de los ovocitos en función de la concentración de FSH.<br>- Tasas basales de respiración de los ovocitos del día 0 (D0) según la edad de la paciente | A edad materna avanzada disminuyen las tasas basales de respiración y disminuye también las concentraciones de FSH   | La respiración ovocitaria es una herramienta útil para mujeres de edad avanzada            |
| <b>Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles.</b> | 67 pacientes          | - Determinar si el dimorfismo del ovocito tiene impacto durante la ICSI   | Ovocitos que tenían más de un 50% de dimorfismo, el 47% del total tuvieron cluster, en comparación con los ovocitos que tenían menos del 50% de dimorfismo que tuvieron 17,3% de cluster | El cluster está asociado con peores tasas de implantación                                  |
| <b>Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage</b>  | 330 cigotos           | -Morfología en Cigotos del día 1,2 y 3. Grupo 1.  | Las tasas globales de implantación en pacientes del grupo 1 y grupo 2 no   | La morfología pronuclear en un criterio satisfactorio en comparación con el clivaje precoz |

|  |                              |   |   |   |
|--|------------------------------|---|---|---|
| <b>status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study</b>  |                              | -Morfología pronuclear.<br>Grupo 2  | tuvieron diferencias significativas.<br>Tasas de implantación en zigotos del subgrupo A fueron significativamente superiores (P.01) que las del subgrupo C en ambos grupos  | para ayudar a la selección de embriones en el día 3   |
| <b>Zona pellucida birefringence in vivo and in vitro matured oocytes</b>   | 346 ovocitos                 | Birrefringencia de la membrana pelúcida in vivo e in vitro  | - Mayor birrefringencia en ovocitos inmaduros que en ovocitos maduros (40,1% vs 23,6%)<br>- Dentro de los ovocitos inmaduros, mayor birrefringencia en profase I comparado con metafase I (50,7% vs 25%)<br>- Ovocitos en metafase II tuvieron una influencia positiva en la birrefringencia de la ZP       | Birrefringencia de la zona pelúcida puede ser útil para predecir la calidad embrionaria de los ovocitos metafásicos II. Además, la finalización de los cambios nucleares en la producción de ovocitos metafase-II in vitro puede no reflejar su madurez molecular |
| <b>Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging</b> | 205 ovocitos<br>25 pacientes | Características del huso meiótico y de la zona pelúcida mediante el PolScope, y se analiza su relación con el potencial de desarrollo embrionario | - Los ovocitos con una retardancia del huso de >3 nm mostraron una mayor progresión a blastocistos comparando con los que tenían una retardancia de 2-3 nm o <2 nm. Se obtuvieron más blastocistos de ovocitos con longitudes de huso de >12 nm que de ovocitos con longitudes de huso de 10-12 nm o <10 nm | La medición cuantitativa de la longitud y la retardancia del huso meiótico y de la zona pelúcida tiene un valor predictivo positivo en relación con el desarrollo embrionario   |
| <b>Asociación entre la calidad de</b>  | 645 transferencias           | Determinar la concordancia  | - Concordancia entre operadores   | El trabajo confirma la validez de la  |

|  |  |   |  |   |
|--|--|---|--|---|
| <b>blastocistos y los resultados en la transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido</b>                         |  | entre operadores en la clasificación de blastocistos y si el criterio de clasificación utilizado tiene un valor para predecir la implantación | fue del 99%, 83%, 87% y 69% para evaluación de la expansión<br>- No hubo diferencias de implantación de blastocistos $\geq 3BB$ según edad o día de desarrollo.<br>- Las morfologías mejores tuvieron mayores tasas de implantación  | clasificación para evaluar la viabilidad de blastocistos descongelados en día 5-6, con concordancia entre operadores y capacidad para predecir implantación   |
| <b>Inter-centre reliability in embryo grading across several IVF clinics is limited: implications for embryo selection</b> | 40 embriones de 3 días y 40 blastocistos | - Simetría<br>- Fragmentación<br>- Expansión del blastocisto<br>- MCI<br>- TE   | - Fiabilidad intra-centro:<br>Sustancial para simetría de blastómeros, fragmentación y expansión de blastocistos.<br>Moderada para la calidad de la masa celular interna y del trophoctodermo.<br>- Fiabilidad inter-centro: Mejoró de regular a moderada para todos los parámetros, excepto la fragmentación de blastómeros entre los embriólogos senior. | - La fiabilidad intra-centro fue generalmente moderada/sustancial.<br>- La fiabilidad inter-centro fue regular, pero mejoró a moderada después de la capacitación interactiva.<br>- El establecimiento de servicios de evaluación de calidad externa y el uso de inteligencia artificial pueden mejorar la fiabilidad de la selección de embriones. |

Tabla 6. Resumen de resultados de los estudios utilizados en la bibliografía. Elaboración propia.

## 6- ARGUMENTACIÓN CRÍTICA/DISCUSSION

La relación entre la morfología embrionaria y la calidad ovocitaria para elegir al embrión con más posibilidades de implantación es un tema de gran importancia en la comunidad científica. Este TFM está enfocado a establecer principalmente las características favorables y desfavorables de los ovocitos, cigotos y embriones.

El tener un consenso común es indispensable; de ahí la importancia de la tercera edición del cuaderno ASEBIR. El cuaderno ASEBIR ha sido utilizado de guía básica para hablar

de los diferentes parámetros morfológicos según el estadio celular. Aunque hoy en día aún continúan existiendo una gran diversidad de valoraciones morfológicas, pero todas se unen en un consenso común en Estambul, estableciendo así las características morfológicas favorables y desfavorables.

A pesar de que en la tercera edición del cuaderno de ASEBIR se nombran ciertos parámetros a tener en cuenta para valorar la microinyección del ovocito, hay establecida una clasificación para él. La mejor manera de comprobar la calidad del ovocito es mediante un ciclo de estimulación ovárica; este ciclo de manera directa permite evaluar la respuesta de ambos ovarios tras una estimulación hormonal y así poder realizar la valoración ovocitaria. Después de la punción, los ovocitos se decumulan para poder ser evaluados y lo primero que se observa es que el ovocito no esté degenerado y que sea maduro. Para la maduración se evalúa principalmente que posea el primer corpúsculo polar, es cierto, que existen otros parámetros que pueden ser evaluados para determinar la madurez como, por ejemplo, el complejo cúmulo-corona radiata del ovocito, sin embargo, otros autores no recomiendan su uso para valorarla, ya que mencionan que puede verse afectado por las hormonas exógenas. En general las recomendaciones de ASEBIR en la 3ª edición define al ovocito maduro óptimo como aquel que tiene forma circular, una ZP uniforme, un citoplasma translúcido y con un CP de normales dimensiones.

Valorar la fecundación es el siguiente paso de la evaluación morfológica. Todos los autores coinciden en lo importante que es la observación de la fecundación a las 16-22 horas, la franja horaria establecida es debida a la valoración de ambos pronúcleos, ya que si esperásemos más tiempo podrían desaparecer y no llegaríamos a verlos, interpretándose como no fecundado. Revisando la opinión del resto de autores, los parámetros indispensables que se deben evaluar son: aparición de 2 PNs, extrusión del 2º CP y división temprana.

Los siguientes intervalos de observación según ASEBIR son a las 44-45 horas en día 2 y a las 67-69 horas en día 3, en este último intervalo de tiempo un parámetro de buena evolución embrionaria es que el cigoto debe presentar de 7/8 células (blastómeras) y deben de tener tamaños similares. También, es importante valorar la fragmentación del cigoto, los autores han determinado que si la fragmentación ocupa un 50% del cigoto las tasas de implantación son prácticamente nulas; un problema que he considerado aquí es

que puede resultar complicado valorar la fragmentación si los fragmentos son de un tamaño similar al de las blastómeras, ya que podrían llegar a confundirse con células del propio embrión (y los núcleos podrían no ser visibles dependiendo de si las blastómeras se encuentran en interfase o no).

El día 4 el embrión está en estadio de “mórula”, y no es evaluable debido al alto grado de compactación de las células embrionarias. En el día 5 y día 6 tanto ASEBIR como Gardner y el resto de los autores, realzan la importancia de la clasificación del embrión según: el grado de expansión, el trofoectodermo (debe estar compuesto por numerosas células y debe ser homogéneo) y la masa celular interna (células deben estar compactas y ambos autores establecen que un tamaño óptimo es entre 1900-3800  $\mu\text{m}^2$ ).

Los diferentes métodos de clasificación embrionaria están basados en categorías; la aparición de nuevas tecnologías y la dinamicidad embrionaria hacen necesarios su continua revisión y actualización. Por ejemplo, el Time-Lapse ha ayudado a una mejor observación de los diferentes parámetros (aparición de vacuolas y fragmentación, división temprana...), pero sobre todo ha ayudado a establecer mejor los tiempos de aparición de los acontecimientos. La luz polarizada, la metabolómica y la respirometría son campos nuevos y por lo tanto necesitan más ensayos clínicos para su uso rutinario en las clínicas de Reproducción asistida, en mi opinión, creo que en cuanto se hagan más ensayos clínicos y se demuestre su utilidad, podrían llegar a cambiar por completo las clasificaciones embrionarias y podrían descubrirse nuevos parámetros morfológicos.

Un aspecto que debería desarrollarse más en cuanto a los parámetros morfológicos según ASEBIR es la valoración morfológica de embriones criopreservados, ya que la actual valoración es únicamente para embriones en fresco. La discusión sobre cómo la vitrificación afecta la clasificación de embriones desvitrificados plantea argumentos válidos en ambos lados del debate. Mientras que algunos argumentan que los posibles daños estructurales y la incertidumbre en la viabilidad pueden dificultar una clasificación precisa, otros sostienen que los sistemas de clasificación existentes y la capacidad de recuperación del embrión pueden mitigar estos efectos, de hecho, normalmente en los laboratorios de RA cuando no pueden valorar un embrión recién desvitrificado, esperan hasta 2 horas para volverlo a evaluar. Por lo que deberíamos cuestionarnos: ¿Es necesario establecer nuevos criterios para los embriones criopreservados? En mi opinión, si, ya que

la transferencia de embriones congelados es bastante frecuente en los laboratorios del FIV, por lo que sería interesante investigar una nueva clasificación embrionaria.

La técnica de Assisted Hatching (HA) se utiliza en el campo de la reproducción asistida como un método para aumentar las posibilidades de implantación de embriones durante los tratamientos de fertilidad. Sin embargo, surge un debate sobre si los embriones sometidos a esta técnica deben recibir una clasificación diferente a la estándar utilizada en la embriología. Al realizar el HA, se introduce una intervención externa en el desarrollo natural del embrión, esto puede ocasionar cambios estructurales en la zona pelúcida, la capa que rodea al embrión y estos cambios podrían tener un impacto en el potencial de desarrollo y la capacidad de implantación del embrión, lo que justificaría una clasificación diferenciada. Aunque la eclosión asistida se ha utilizado durante años en los tratamientos de fertilidad, la evidencia científica disponible aún no respalda de manera concluyente la necesidad de una clasificación diferenciada para los embriones sometidos a esta técnica. Además, en mi opinión no tendría mucho sentido, ya que el motivo de realizar el HA es realizar una biopsia del TE y obtener información sobre la ploidia del embrión para decidir si transferirlo o no.

## 7- CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas a partir de esta revisión bibliográfica se muestran en la siguiente tabla resumen:

| ETAPA EMBRIONARIA | TIEMPOS DE OBSERVACIÓN                | PARÁMETROS MORFOLÓGICOS FAVORABLES   | PARÁMETROS MORFOLÓGICOS DESFAVORABLES   | PARÁMETROS PARA DESCARTAR                                      |
|-------------------|---------------------------------------|--|---|--|
| Ovocito o D+0     | Después de la punción y decumulación. | Cúmulo extendido con corona con forma radiada, ausencia de vacuolas, ausencia de AREL y CP | Cúmulo poco extendido, presencia de cluster, presencia de AREL, presencia de vacuolas, espacio perivitelino aumentado y CP de | Ovocitos inmaduros y degenerados o con signos de degeneración. |

|                |   | tamaño normal (<30 $\mu\text{m}^2$ ).  | gran tamaño (>30 $\mu\text{m}$ ).  |  |
|----------------|---|--|--|--|
| D+1            | 16-18 horas.  | Presencia de halo y división temprana.   | Diferente a 2PN + 2CP, PN de tamaños diferentes, división directa a 3 células.   | 1PN + 1 CP, 2PN + 1CP, más de 2 PN y los que estén degenerados o con signos de degeneración.   |
| D+2 y D+3      | 43-45 horas y 67-69 horas respectivamente.            | 8 blastómeras en el día 3, blastómeras de tamaño similar, presencia de un solo núcleo en las blastómeras, presentar menos de 10% de fragmentación y no presentar vacuolas. | Compactación avanzada de las blastómeras en el día 3 o en el día 2, 3 células en el día 2, que no haya habido división en 24 horas, tener una fragmentación superior al 25%, presentar vacuolas. | Multinucleación, fragmentación más del 50%, vacuolas grandes en más del 50% de las células y los que estén degenerados o con signos de degeneración. |
| D+4, D+5 y D+6 | 90-94 horas, 114-118 y 136-140 horas respectivamente. | Compactación en mórula en D+4, cavitación temprana, MCI 1900-3800 ( $\mu\text{m}^2$ ), TE homogéneo cohesionado con muchas células, y tener una categoría como A y B.      | Aparición tardía de blastocisto pasadas las 140 horas, MCI <1900 ( $\mu\text{m}^2$ ) y TE con pocas células.   | Embriones que presenta una combinación de 2 características propias de categoría D y embriones degenerado o con signos de degeneración.              |

Es importante tener en cuenta que esta tabla resume los tiempos de observación y parámetros morfológicos mencionados en la revisión bibliográfica, pero es fundamental contar con una evaluación y análisis más completo basado en los protocolos y criterios específicos utilizados por cada laboratorio de reproducción asistida. Además, se destaca que tanto el método Gardner como la clasificación ASEBIR son igualmente eficaces para

la valoración morfológica embrionaria y comparten los parámetros a evaluar en el estadio de blastocisto.

## 8- BIBLIOGRAFÍA

- Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. (2011, Abril 18). The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Human reproduction*, 26(6), 1270-1283.
- ASEBIR. (2015). *Cuadernos de embriología clínica: Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humano* (3ª ed.). (Góbal, Ed.) Madrid.
- Chen, C., & Suresh Kattera, P. (Febrero de 2006). Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. *Fertility and Sterility*, 85(2), 347-352.
- Cinamodo, D., Sosa Fernandez, L., Soscia, D., Fabozzi, G., Benini, F., Cesana, A., . . . De Santis, L. (enero de 2022). Inter-centre reliability in embryo grading across several IVF clinics is limited: implications for embryo selection. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(1), 39-48.
- Cívico Vallejos, Y., Hernández Dacruz, B., & Cívico Vallejos, S. (enero de 2022). Selección de embriones en los tratamientos de fecundación in vitro. *Clínica e investigación en ginecología y obstetricia*, 49(1).
- Cruz Lantigua, A. (2011). *Introducción a la genética médica* (2ª edición ed.). La Habana: Ciencias Médicas.
- D'Agostino, A., Frautschi, C., Peretti, C., Hernández, M., Estofan, G., & Dematteis, A. (Abril de 2019). Asociación entre la calidad de blastocistos y los resultados en la transferencia de un único blastocisto en ciclo diferido. *Reproducción*, 34(1).
- Gardner, D. K., & Balaban, B. (Septiembre de 2016). Assessment of human embryo development using morphological criteria in an era of time-lapse, algorithms and 'OMICS': is looking good still important? *Molecular Human Reproduction*, 22(10).
- Paes de Almeida Ferreira Braga, D., Rita, Queiroz, P., Madaschi, C., Iaconelli, A., & Borges, E. (Noviembre de 2010). Zona pellucida birefringence in in vivo and in vitro matured oocytes. *Fertility and Sterility*, 94(6), 2050-2053.
- Raju, G. R., Prakash, G., Krishna, K., & Madan, K. (Enero de 2007). Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. *Reproductive BioMedicine Online*, 14(2), 166-174.
- Rienzi, L., Balaban, B., Ebner, T., & Mandelbaum, J. (Diciembre de 2012). The oocyte. *Human reproduction*, 27(1), 2-21.
- S.Meriano, J., Alexis, J., Visram-Zaver, S., Cruz, M., & F.Casper, R. (2001). Tracking of oocyte dysmorphism for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. *Human reproduction*, 16(10), 2118-2123.
- Sciorio, R., Miranian, D., & Smith, G. D. (febrero de 2022). Non-invasive oocyte quality assessment. *Biology of Reproduction*, 106(2), 274-290.

- Scott, D. L. (19 de Junio de 2008). Human oocyte respiration (rate measurement) potential to improve oocyte and embryo selection? *Reproductive BioMedicine Online*, 17(4), 461-469.
- Shaw-Jackson, C., Beirs, N. V., Thomas, A.-L., Rozenberg, S., & Autin, C. (8 de Mayo de 2014). Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? A systematic mini-review. *Human reproduction*, 29(7), 1380-1386.
- Urman, B., & Balabal, B. (22 de Marzo de 2006). Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. *Reproductive BioMedicine Online*, 12(5), 608-615.