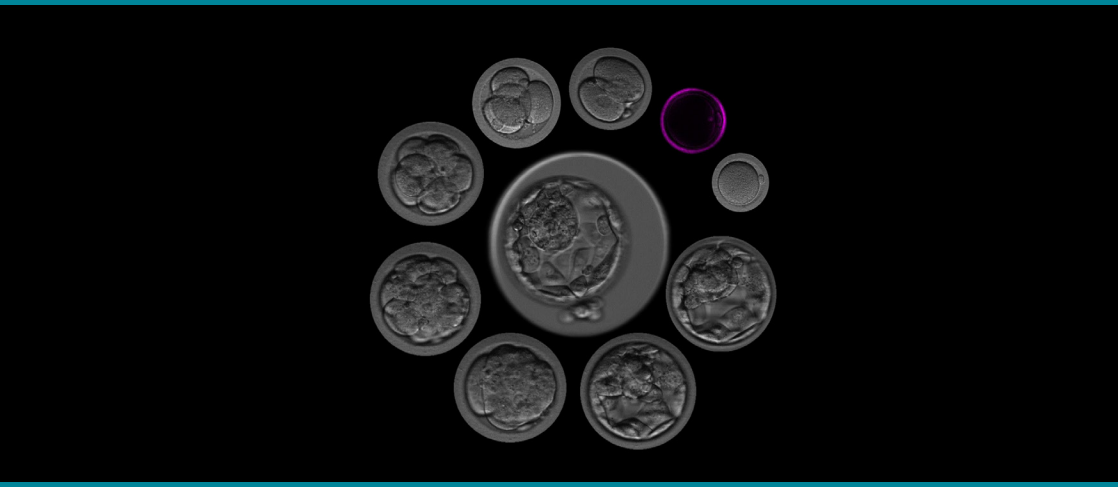
ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

CUADERNOS DE EMBRIOLOGÍA CLÍNICA



Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos

3ª Edición · 2015

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos

Coordinadores

Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
Jorge Cuadros Fernández

Comisión de Trabajo de ASEBIR

Jorge Cuadros Fernández
Mª José de los Santos Molina
Mª José Figueroa García
Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
Fernando J. Prados Mondéjar

Comité Permanente del Grupo de Interés de Embriología

Mª Victoria Hurtado de Mendoza y Acosta
Gemma Arroyo Cardona
Mª José Figueroa García
Ana Busquets Bonet
Mª José de los Santos Molina
Elena García Cerrudo
Beatriz González Soto
Marta Moragas Solanes
Amaia Mugica de la Iglesia
Maria Carme Pons Gatell
Fernando J. Prados Mondéjar
Miguel Ángel Vilches Ferrón

3ª Edición - 2015

El contenido de este Cuaderno ha sido ratificado por
la Junta Directiva de ASEBIR y su Presidenta Montse Boada

Relación de los miembros del GIE que han participado en esta edición

Oocito: Mª Victoria Hurtado de Mendoza; Jorge Ten

Zigoto y D+1: Gemma Arroyo; Mª José de los Santos

D+2 y D+3: Mª Carme Pons

Simetría y sincronía en la división: Jorge Cuadros; Fernando Prados

Vacuolas: Beatriz González; Mª Victoria Hurtado de Mendoza; Mª José de los Santos

Zona pelúcida: Amaia Mugica; Miguel Ángel Vilches

Número de células y ritmo de división: Natalia Rives; Mª Carme Pons

Forma del blastómero y Anillo acitoplasmático: Irene Cuevas

Multinucleación: Mª José Figueroa; Muriel Cuadros; Jorge Cuadros

Fragmentación: Miguel Ángel Vilches; Ana Busquets; Gloria Calderón

D+4: Marta Moragas; Mª José Torello

D+5 y D+6: Mª José de los Santos; Miguel Ángel Vilches

Diseño y maquetación

Góbalo, Agencia Creativa Digital
c/ Castillo de Fuensaldaña 4 · 28232 Las Rozas, Madrid
Tfno.: 91 626 39 74 · www.gobalo.es · hola@gobalo.es
Depósito legal: M-30.301-2008 - ISSN: 1888-8011

Índice

Presentación 5
Introducción 7
1. Evaluación morfológica de cada estadio de D+0 a D+3 9
1.1. Valoración morfológica del oocito. D+0 9
1.1.1. Parámetros evaluados en el estadio de oocito 9
1.1.2. Parámetros oocitarios incluidos en el sistema de clasificación 18
1.1.3. Recomendaciones 20
1.2. Valoración morfológica del zigoto. D+1 20
1.2.1. Intervalo de tiempo de observación posinseminación en D+1 21
1.2.2. Parámetros evaluados en el estadio de D+1 22
1.2.3. Parámetros en el estadio de D+1 incluidos en el sistema de clasificación 33
1.2.4. Recomendaciones 33
1.3. Valoración morfológica en D+2 y en D+3 33
1.3.1. Intervalo de observación posinseminación en D+2 y D+3 34
1.3.2. Parámetros evaluados en los estadios de D+2 y D+3 34
1.3.3. Parámetros en los estadios de D+2 y D+3 incluidos en el sistema de clasificación 51
1.3.4. Recomendaciones 52
2. Esquema de gradación de la calidad embrionaria en D+2 y D+3 53
2.1. Gradación embrionaria para D+2 y D+3 54
2.2. Esquemas de gradación propuestos para el trabajo diario 54
3. Evaluación morfológica del estadio de mórula al de blastocisto. D+4, D+5 y D+6 58
3.1. Intervalo de observación posinseminación en D+4, D+5 y D+6 58
3.2. Parámetros evaluados en el estadio de D+4 58
3.3. Recomendaciones 60
3.4. Gradación embrionaria para D+4 61
3.5. Parámetros evaluados en los estadios de D+5 y D+6 62
3.6. Parámetros en los estadios de D+5 y D+6 incluidos en el sistema de clasificación 65
3.7. Recomendaciones 68
4. Esquema de gradación de la calidad embrionaria en D+5 y D+6 69
4.1. Gradación embrionaria para D+5 69
4.2. Gradación embrionaria para D+6 70
5. Resumen de las recomendaciones 72
6. Recomendaciones generales 74
7. Referencias bibliográficas 75

Notas

Presentación

Como en ediciones anteriores, no podemos empezar la presentación del presente trabajo sin recordar los pasos que nos han conducido a realizarlo. En julio del 2004 se creó la Comisión de trabajo de ASEBIR: "Definición de criterios de valoración morfológica y su categorización, de Oocito a Blastocisto" para tratar de dar respuesta a la necesidad de unificar los criterios de valoración embrionaria.

La falta de consenso entre los diversos equipos, en este aspecto clave de la embriología clínica, conlleva problemas como la imposibilidad de generar estudios multicéntricos con una valoración común de la calidad embrionaria, la interpretación de los informes clínicos de otros laboratorios o la comparación de los datos bibliográficos. Y aún a día de hoy, a pesar de los esfuerzos realizados por las diversas sociedades científicas internacionales, no hay un consenso aceptado por todos.

El objetivo de la comisión fue definir una propuesta de criterios morfológicos de valoración de la calidad y su clasificación en escalas para cada uno de los diversos estadios embrionarios.

Para llevar a cabo ese objetivo, la comisión se basó principalmente en tres herramientas: la revisión bibliográfica exhaustiva, incluyendo consultas directas a algunos de los principales autores; una encuesta multicéntrica fundamentada en dicha revisión; y en la propia experiencia de los miembros de la comisión.

El resultado de todo ese trabajo fue la elaboración de una clasificación embrionaria en categorías, publicada en 2007 en el II Cuaderno de Embriología Clínica, "Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos", con una segunda edición al año siguiente (ASEBIR, 2008).

Nuestro objetivo en la 3ª edición de este Cuaderno de Embriología ha sido la actualización de la clasificación embrionaria tras 7 años de aplicación. Para ello, el Grupo de Interés de Embriología (GIE) de ASEBIR, heredero de la Comisión original, se ha basado en distintos trabajos acerca de la clasificación: una encuesta actualizada a todos los socios de ASEBIR sobre la utilización de la categorización embrionaria en sus laboratorios (Hurtado de Mendoza, 2011); también se han tenido en cuenta los resultados de la introducción de los controles de calidad externos de embriología, que han permitido conocer qué aspectos de la

clasificación debían ser revisados (Castilla et al., 2010); y, por último, el primer trabajo de validación del criterio ASEBIR, un estudio multicéntrico realizado entre miembros del GIE que demuestra su validez predictiva en estadio D+3 (Pons et al., 2014).

El resultado de estos trabajos ha sido la base para la actualización de la clasificación embrionaria en categorías y la presentación de nuevas tablas que faciliten dicha clasificación, así como de una nueva recomendación dentro de los embriones de la categoría D, ya que dentro de este grupo podemos diferenciar aquellos con una probabilidad de implantación baja de aquellos cuya probabilidad de implantación es prácticamente nula. Como se mantuvo siempre en la Comisión, dado que este trabajo se realiza sobre un proceso dinámico, esta categorización embrionaria continúa sujeta a revisiones futuras por el GIE de ASEBIR.

Cabe destacar que los criterios de valoración presentes en este Cuaderno siempre han sido descritos para oocitos y embriones en fresco. Por lo tanto, esta clasificación no es aplicable para la categorización de oocitos y embriones descongelados. En el caso de los embriones descongelados, éstos son especialmente divergentes con los embriones en fresco; no hay valoración para embriones con células lisadas, para la ausencia de división en 24 horas e incluso para los días de llegada a blastocisto en los embriones que se descongelan en estadio D+2 o D+3 y se mantienen en cultivo.

Por otro lado, no se nos escapa que las nuevas tecnologías por imágenes introducidas cada vez más en los laboratorios, como la luz polarizada y el seguimiento continuo del desarrollo embrionario en tiempo real (*Time-Lapse*), van a ir aportando información y seguramente modificarán algunos criterios, permitiéndonos valorar en su justa magnitud su influencia en el desarrollo embrionario.

Por último, mencionar que hemos creído imprescindible añadir algunas imágenes realizadas con las nuevas tecnologías a las ya existentes en el Cuaderno. Dichas imágenes han sido cedidas desinteresadamente por miembros del GIE, por lo que el consenso es unánime. Esperamos que este hecho sirva para justificar la variedad en la calidad y presentación de las fotografías.

Introducción

La evidencia científica indica que las posibilidades de gestación en la especie humana dependen en gran medida tanto de la receptividad endometrial como de la calidad embrionaria, aspectos que distan mucho de estar bien estudiados.

En el abordaje de la calidad embrionaria, la primera decisión a tomar es seleccionar la herramienta de trabajo. Tras 37 años del nacimiento del primer bebé mediante FIV, el método más habitual para valorar la calidad embrionaria es la utilización de parámetros morfológicos. La aplicación de otros criterios como el consumo metabólico, el análisis cromosómico, la respirometría y otros recursos, aunque están demostrando su eficacia, no acaban de alcanzar una gran implantación en los laboratorios (Leese et al., 1993, 2007; Leese, 1995, 2002; Gardner et al., 2001; Hamamah, 2005; Haggarty et al., 2006; Munne et al., 2007, 2009; Scott et al., 2008; Picton et al., 2010). Sin embargo, la valoración de la morfología continúa siendo el sistema más extendido y eficiente (Hill et al., 1989; Munne and Wells, 2002; Scott, 2003a; Holte et al., 2007; Racowsky et al., 2010; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011; Montag et al., 2011b).

Otro aspecto necesario es decidir qué estadios del desarrollo hay que escoger para la clasificación morfológica de los embriones. Inicialmente se escogió el preembrión en el segundo o tercer día de cultivo (D+2 o D+3) o bien el blastocisto (D+5 o D+6). Sin embargo, estudios posteriores han puesto de manifiesto que la valoración en los días de cultivo restantes: oocito (D+0), zigoto y primera división celular (D+1) y mórula (D+4), puede resultar asimismo útil en la categorización embrionaria, lo que en este trabajo se ha considerado desde sus inicios.

Siguiendo el mismo esquema que en las ediciones anteriores, en cada estadio del desarrollo embrionario se han analizado los parámetros morfológicos citados en la bibliografía revisada. En el sistema final de clasificación se han incluido todos aquellos parámetros relacionados de manera evidente con las probabilidades de implantación del preembrión. Algunos de los parámetros no utilizados para la clasificación se han propuesto como criterios que podrían ayudar a elegir entre varios embriones de la misma categoría. Finalmente, ciertos parámetros morfológicos precisan un mayor estudio para poder formar parte relevante del esquema de decisión.

Una vez recogidos todos los datos morfológicos, es preciso decidir cómo ponderarlos para dar una clasificación final al preembrión. Existen dos opciones fundamentales al respecto: valoración por categorías o por puntuación. En este trabajo se optó por la primera, tanto por ser la más extendida, como por la dificultad para consensuar una ponderación adecuada de cada uno de los parámetros (Desai et al., 2000; Fisch et al., 2001; Balaban et al., 2006).

El Grupo de Interés de Embriología (GIE) de ASEBIR es consciente de la introducción en los últimos años de nuevas tecnologías como la birrefringencia por la luz polarizada (Keefe et al., 2003; Montag and van der Ven, 2008) y especialmente el seguimiento del desarrollo embrionario en tiempo real *Time-Lapse* (Lemmen et al., 2008; Wong et al., 2010; Meseguer et al., 2011). Esta última ha permitido realizar una evaluación semicuantitativa de la morfología embrionaria y su cinética del desarrollo. Con gran probabilidad, el estudio de los parámetros morfológicos a valorar en los embriones variará con la información que estas nuevas tecnologías vayan aportando. En este Cuaderno dirigiremos nuestros esfuerzos a ponderar e incluir aquellos datos contrastados que puedan facilitar dicha clasificación.

Los autores quieren dejar constancia de que a lo largo del texto siempre que se use el término "embrión" se hace referencia al "preembrión" que, de acuerdo con la Ley 14/2006, de 26 de Mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida, se define como "el embrión *in vitro* constituido por el grupo de células resultantes de la división progresiva del oocito desde que es fecundado hasta 14 días más tarde".

1. Evaluación morfológica de cada estadio de D+0 a D+3

1.1. Valoración morfológica del oocito. D+0

El proceso de maduración oocitaria incluye cambios tanto a nivel citoplasmático como nuclear, que no siempre son sincrónicos. Oocitos con maduración nuclear en metafase II pueden presentar deficiencias en su maduración citoplasmática que comprometerían el adecuado desarrollo del embrión (Scott, 2003b). La calidad oocitaria no está influenciada únicamente por los genomas nuclear y mitocondrial, sino también por el microambiente procedente del ovario y el folículo preovulatorio que influye en los procesos de transcripción y traducción, y como consecuencia en la madurez citoplasmática (Albertini et al., 2003).

Entre un 60% y un 70% de los oocitos recogidos en los ciclos de estimulación ovárica exhiben una o más características morfológicas anormales (De Sutter et al., 1996; Balaban et al., 1998; Ten et al., 2007; Tejera et al., 2011; Rienzi et al., 2012).

La revisión bibliográfica nos muestra que el oocito maduro puede presentar alteraciones morfológicas o dismorfismos que nos permitirían realizar una valoración morfológica:

1.1.1. Parámetros evaluados en el estadio de oocito

a) Alteraciones morfológicas citoplasmáticas:
- Agrupación de orgánulos/granulosidad localizada en el centro del oocito.
- Agregación de retículo endoplasmático liso (AREL).
- Vacuolas.
- Inclusiones citoplasmáticas.

b) Alteraciones morfológicas extracitoplasmáticas:
- Restos celulares en el espacio perivitelino.
- Anomalías de la zona pelúcida.
- Espacio perivitelino aumentado.
- Alteraciones del primer corpúsculo polar: fragmentación y tamaño.

c) Complejo cúmulo-corona radiata-oocito (COC, *Cumulus-Oocyte Complex*).

Agrupación de orgánulos/granulosidad localizada en el centro del oocito

Se trata de una alteración frecuente del citoplasma del oocito, que podría describirse al microscopio óptico como una masa individual y oscura con un contenido excesivo de gránulos, normalmente situada en la porción central del oocito (Van Blerkom and Henry, 1992; Kahraman et al., 2000; Meriano et al., 2001); ver imagen 1.

También se ha descrito la presencia de un citoplasma irregular con una apariencia engrosada, como consecuencia de una vesiculización extensiva que ocupa la práctica totalidad del citoplasma (Van Blerkom and Henry, 1992; Meriano et al., 2004).

Imagen 1. Granulosidad localizada en el centro del oocito (flecha).

Es aceptado mayoritariamente que el citoplasma del oocito ha de ser claro; sin embargo, se desconoce el significado biológico de un citoplasma heterogéneo. En base a la evidencia actual, se considera que puede representar una variabilidad entre oocitos más que un dismorfismo con significado en el desarrollo.

Se ha cuantificado que sólo un 8,3% de los embriones procedentes de oocitos con citoplasma oscuro son de buena calidad (Ten et al., 2007). De hecho, hay acuerdo entre los diversos autores respecto a que la granulosidad central o el citoplasma granular localizado centralmente están asociados con un bajo potencial de implantación (Balaban and Urman, 2006; Ebner et al., 2006; Rienzi et al., 2008; Figueira et al., 2010).

Agregación de retículo endoplasmático liso (AREL)

Visto al microscopio óptico, se trata de un tipo de inclusión citoplasmática individual, de forma ligeramente elíptica o completamente circular, de aspecto liso y rodeada de un reborde formado por los gránulos citoplasmáticos que han sido desplazados por las vesículas del AREL, y que en ocasiones tiene dimensiones semejantes a un pronúcleo (Van Blerkom and Henry, 1992; Serhal et al., 1997; Meriano et al., 2001); ver imagen 2.

Mediante microscopía electrónica se confirma que este dismorfismo es el resultado de una acumulación masiva de sáculos de retículo endoplasmático liso (Sathananthan, 1994;

Imagen 2. Presencia de AREL (R) y pequeñas vacuolas (V) en el oocito.

Otsuki et al., 2004). Alrededor de un 10% de los ciclos de ICSI presentan este tipo de oocitos, pero si en el proceso de la ICSI no se rompe la AREL, la fecundación puede ser normal (Otsuki et al., 2004; Ebner et al., 2008).

La presencia de AREL se considera una anomalía severa, que está asociada a un desarrollo anormal de los embriones, baja formación de blastocistos, alto porcentaje de gestaciones bioquímicas y complicaciones obstétricas en las gestaciones derivadas de estos embriones (Balaban and Urman, 2006; Ebner et al., 2008). Sin embargo, algunos autores no están de acuerdo en que este tipo de oocitos no sean inyectados o que se cancele la transferencia de los embriones procedentes de los mismos, cuando no hay otros disponibles, ya que se han publicado nacimientos de niños sanos (Bielanska and Leveille, 2011; Mateizel et al., 2013; Shaw-Jackson et al., 2014).

No obstante, el consenso de Estambul recomienda que los oocitos con estas características no sean inseminados (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Vacuolas

La vacuolización es probablemente el dismorfismo citoplasmático más evidente y dinámico en oocitos humanos. Las vacuolas varían tanto en número como en tamaño, y pueden definirse como inclusiones citoplasmáticas rodeadas de membrana y rellenas de un fluido virtualmente idéntico al del espacio perivitelino (Van Blerkom, 1990; Van Blerkom and Henry, 1992; Otsuki et al., 2004); ver imagen 3.

Su número y tamaño varían considerablemente entre oocitos diferentes o incluso dentro de cada uno de ellos (Van Blerkom and Henry, 1992). Estas vacuolas podrían formarse espontáneamente o bien mediante una fusión de vesículas preexistentes derivadas del retículo endoplasmático liso y/o del aparato de Golgi (Van Blerkom, 1990; El Shafie et al., 2000).

La incidencia de oocitos con una vacuola oscila, según estudios, entre el 3% y el 12% (Alikani and Cohen, 1995), mientras que la presencia de múltiples vacuolas en un oocito es

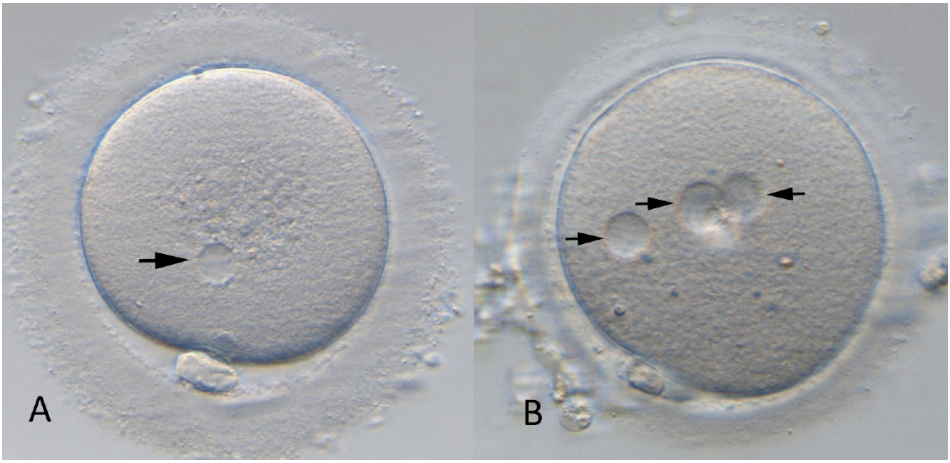


Imagen 3. (A); (B) Presencia de vacuolas en el oocito (flechas).

menos frecuente, presentándose sólo en el 1% de los casos (De Sutter et al., 1996; Loutradis et al., 1999).

Se desconoce la repercusión biológica de la presencia de vacuolas escasas de tamaño pequeño (5-14µm de diámetro) llenas de líquido transparente, mientras que vacuolas grandes (>14µm de diámetro) se han asociado con fracaso de fecundación (Ebner et al., 2005a). En el caso de oocitos que se fecundan, aquellas vacuolas que persisten pasan al estado de singamia y pueden interferir con los planos de división, dando lugar a tasas más bajas de blastocistos (Rienzi et al., 2012). Por lo tanto, se recomienda registrar el tamaño y la cantidad de vacuolas (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Inclusiones citoplasmáticas

Se señalan diversos tipos de características citoplasmáticas consideradas como pequeñas áreas de necrosis, las cuales estarían formadas por cuerpos refringentes de ~10µm de diámetro, compuestos de lípidos y gránulos densos que pueden agruparse o quedarse aislados (Serhal et al., 1997; Suzuki et al., 2004; Otsuki et al., 2007) y por cuerpos picnóticos no refringentes, que aparecen normalmente en forma de herradura (Meriano et al., 2001); ver imagen 4.

La influencia de estas inclusiones citoplasmáticas no está clara, ya que para algunos autores no parece que afecten a la fecundación, ni a la calidad embrionaria, ni a la implantación (Balaban et al., 1998), mientras que otros sí consideran que afectan negativamente a la fecundación y al desarrollo de los embriones a blastocisto (Otsuki et al., 2007; Rienzi et al., 2008).

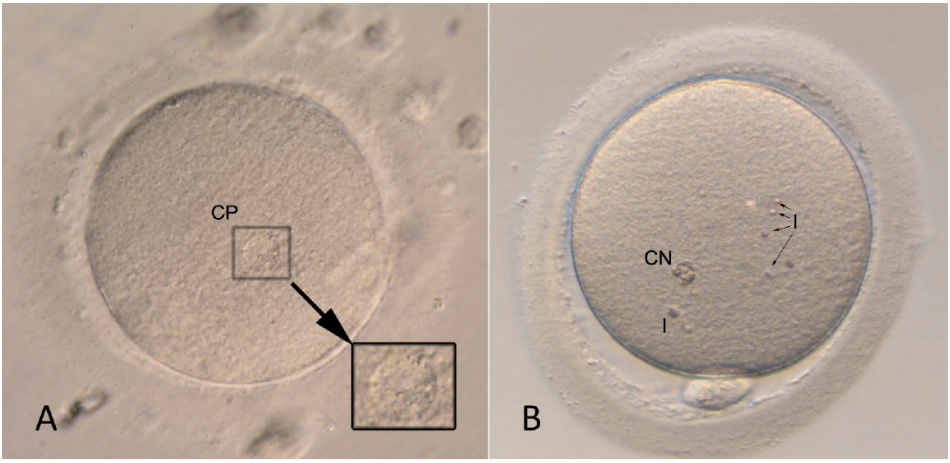


Imagen 4. Presencia de inclusiones. (A) Cuerpo picnótico (CP); (B) Cuerpo necrótico (CN), cuerpos refringentes (I).

Restos celulares en el espacio perivitelino

La presencia de detritus en el espacio perivitelino se considera una anomalía extracitoplasmática; ver imagen 5. Esto se ha relacionado con un deterioro de la zona pelúcida interna, y su incremento podría afectar a la capacidad de fecundación del oocito tras la realización de una FIV convencional (Veeck, 1999b). La presencia de este detritus podría ser un signo de un exceso en la administración del tratamiento con gonadotropinas empleadas en los ciclos de estimulación ovárica. Por tanto, este dismorfismo podría ser

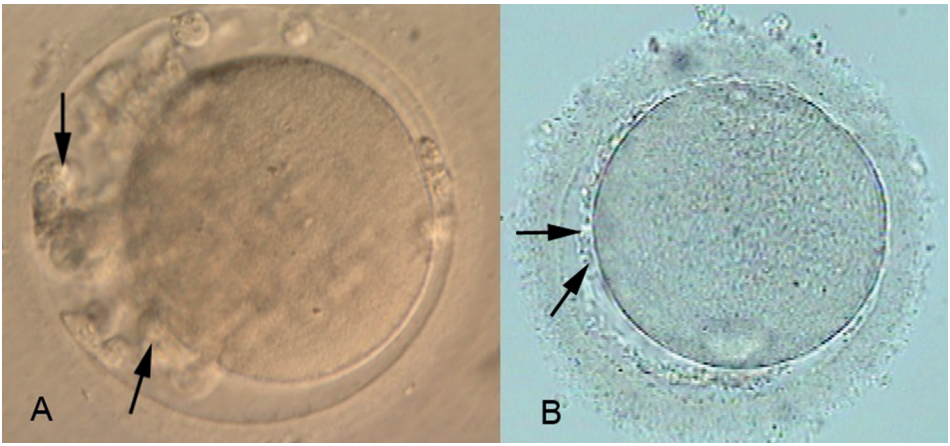


Imagen 5. (A); (B) Detritus en el espacio perivitelino (flechas).

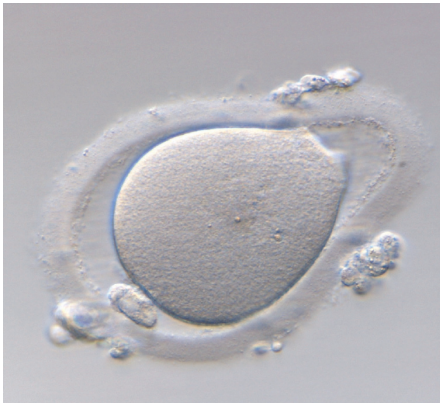


Imagen 6. Zona pelúcida no circular.

Imagen 7. Zona pelúcida oscura.

un fenómeno relacionado con la maduración fisiológica del oocito (Balaban and Urman, 2006); aunque su presencia no parece alterar las tasas de fecundación, división y calidad embrionaria, sí se ha relacionado con una menor tasa de implantación (Hassan-Ali et al., 1998; Farhi et al., 2002; Ten et al., 2007; Rienzi et al., 2008; Figueira et al., 2010).

Actualmente, la presencia de material celular o detritus en el espacio perivitelino se considera una anomalía. Sin embargo, no hay suficiente evidencia que apoye algún pronóstico asociado a esta observación.

Anomalías de la zona pelúcida

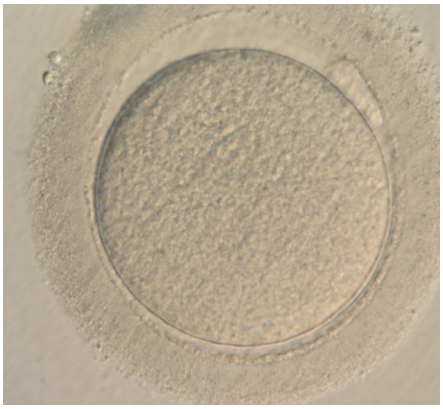


Imagen 8. Zona pelúcida gruesa (>20µm).

La zona pelúcida sufre cambios en el grosor y en la apariencia de bicapa desde D+0 hasta D+5, no siendo valorable este aspecto en el D+0. Pero otras anomalías como: contorno no circular, abultamientos, septo, etc., se mantienen a lo largo del desarrollo y pueden ser detectadas con más facilidad en el momento de la microinyección, al tener que manipular el oocito; ver imágenes 6 a 9.

Con la introducción de la luz polarizada se ha podido alcanzar un mayor conocimiento de la estructura de la zona pelúcida, que incluso facilita el pronóstico de los embriones que llegarían a blastocisto y darían lugar a gestación (Montag et al., 2008; Ebner et al., 2010). El hecho

de que el estrato interno de la zona pelúcida presente una estructura muy ordenada, posibilita que la zona pelúcida sea estudiada bajo esta óptica (Pelletier et al., 2004). Así, una falta de refringencia en el estrato interno de la zona pelúcida, con variaciones de intensidad y espesor, se asocia a bajas tasas de implantación; mientras que una zona pelúcida con birrefringencia intensa, uniforme y continua en el estrato interno y un mayor grosor de éste (10-13 µm) se asocia a altas tasas de formación de blastocistos (Rama Raju et al., 2007), implantación (Montag and van der Ven, 2008; Montag et al., 2011a) y gestación (Shen et al., 2005); ver imagen 10.

Espacio perivitelino aumentado

Es un dismorfismo que se visualiza claramente al microscopio, que hace que el oocito quede "flotando" en el interior de la zona pelúcida; ver imagen 11.

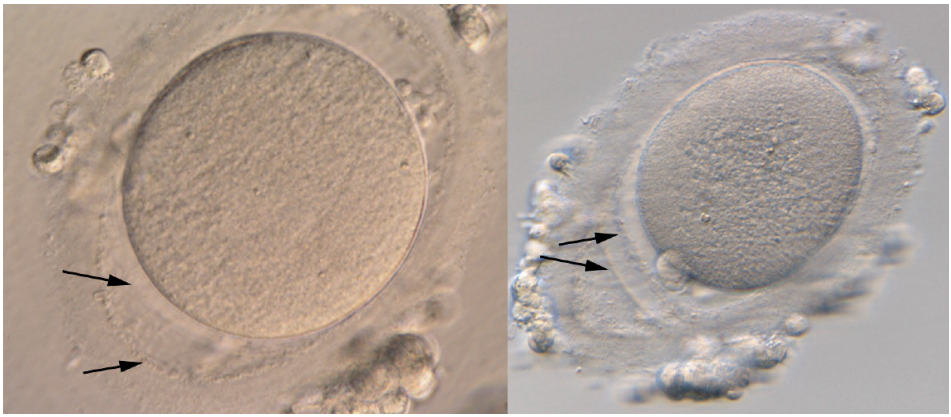


Imagen 9. Zona septada (flechas).

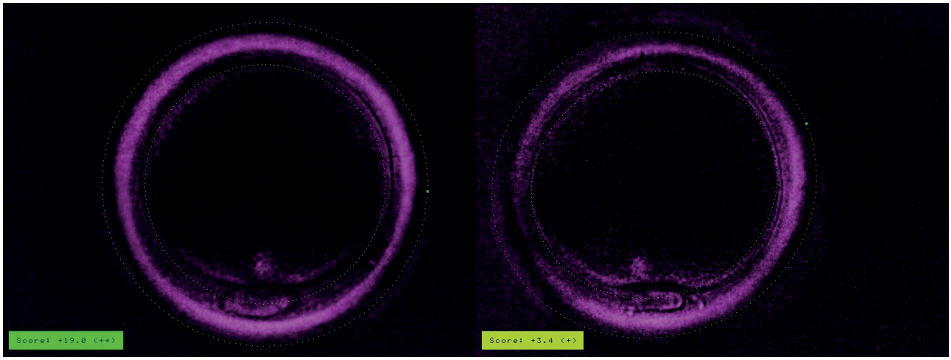


Imagen 10. Zona pelúcida al microscopio de luz polarizada. A la izquierda, la ZP se muestra regular. En la imagen de la derecha se observa una ZP irregular.

Imagen 11. Espacio perivitelino aumentado.

Los datos de la literatura indican que un incremento del espacio perivitelino puede estar asociado a una sobremaduración del oocito (Mikkelsen and Lindenberg, 2001; Miao et al., 2009). También se ha correlacionado con una baja tasa de fecundación, comprometiendo la morfología pronuclear, aunque no parece afectar la calidad embrionaria (Hassan-Ali et al., 1998; Ten et al., 2007; Rienzi et al., 2008; Setti et al., 2011). Sin embargo, si además de un gran espacio perivitelino el oocito presenta un primer corpúsculo polar grande (> 30µm), se asocia con una disminución de la calidad embrionaria en D+2 (Xia, 1997).

Alteraciones del primer corpúsculo polar (1erCP): fragmentación y tamaño.

La morfología del 1erCP parece ser que cambia después de unas horas de cultivo *in vitro* y, por tanto, puede variar dependiendo del tiempo transcurrido desde la extrusión (Balaban et al., 1998, 2006). De hecho, se ha detectado una correlación positiva entre el porcentaje de fragmentación del 1erCP y el tiempo transcurrido entre la denudación y la ICSI (Ciotti et al., 2004), así como también un incremento de la fragmentación del 1erCP a lo largo del tiempo (Verlinsky et al., 2003). Sin embargo, no parece existir acuerdo entre los autores respecto a que el tamaño irregular o la fragmentación del primer corpúsculo polar estén relacionados o no con la subsecuente calidad embrionaria, desarrollo a blastocisto, tasas de implantación o aneuploidías (Verlinsky et al., 2003; Ciotti et al., 2004; De Santis et al., 2005; Ten et al., 2007), mientras que para otros sí parece influir en ellos (Ebner et al., 1999, 2000, 2002; Rienzi et al., 2008; Navarro et al., 2009); ver imágenes 12 a 14.

Por otro lado, la variabilidad en el tamaño del 1erCP (grande o pequeño) puede ser tratada

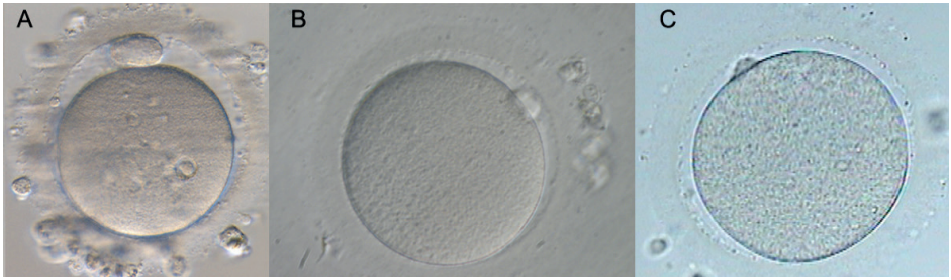


Imagen 12. Diferentes tamaños de corpúsculo polar. (A) grande; (B) normal; (C) pequeño.

como una condición anómala del oocito (Veeck, 1999b). El factor determinante es, probablemente, la posición del huso meiótico en relación con la superficie del oocito. Estos oocitos pueden dar lugar, por tanto, a alteraciones cromosómicas (Veeck, 1999b).

Actualmente, la integración del microscopio de luz polarizada permite obtener más información y se ha podido constatar que muchos oocitos que presentan corpúsculo polar no han madurado totalmente, ya que no presentan el huso meiótico, señal inequívoca de maduración nuclear (Rienzi et al., 2008; Petersen et al., 2009); ver imagen 15.

Imagen 13. Corpúsculo polar doble (flechas).

Imagen 14. Corpúsculo polar fragmentado.

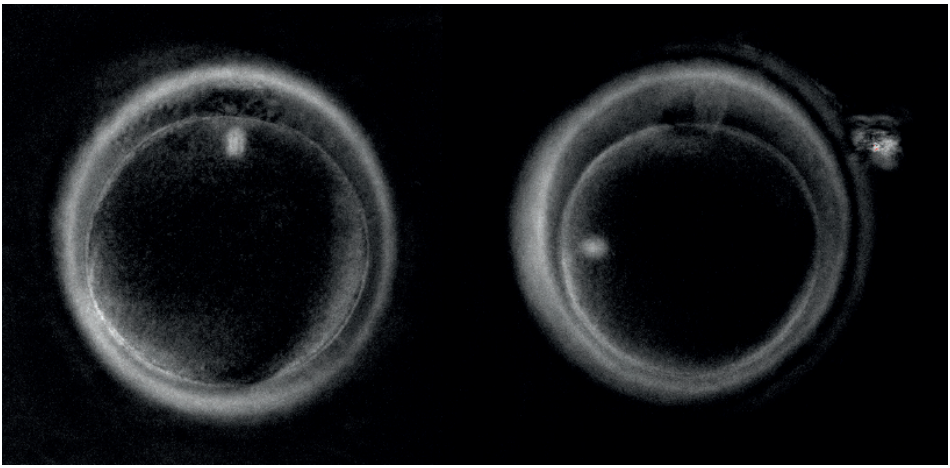


Imagen 15. Huso meiótico. A la izquierda, el huso se encuentra en su posición correcta, respecto del 1erCP. En la imagen de la derecha, el huso se encuentra desplazado 90º.

Hasta obtener más datos, se sigue manteniendo entre los expertos que los oocitos con un gran corpúsculo polar no deberían ser inseminados debido al riesgo de tratarse de oocitos aneuploides (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Complejo cúmulo-corona radiata-oocito (COC, *Cumulus-Oocyte Complex*)

El grado de madurez del COC ha sido utilizado como indicador de la madurez oocitaria, aunque la sincronía entre ambos es cuestionable, sobre todo en ciclos estimulados (Tarín and Pellicer, 1992; Hartshorne et al., 1999; Gilchrist et al., 2008).

Esto puede ser debido a diferencias de sensibilidad de las células del complejo cúmulo-corona y del núcleo oocitario a la maduración inducida por las gonadotropinas u otro/s factor/es intrafolicular/es (Balaban and Urman, 2006; Tejera et al., 2011). Por lo tanto, dado que no hay una relación directa entre la apariencia del COC y el posterior desarrollo embrionario, el consenso de Estambul aconseja una gradación binaria (0 o 1), donde 1 es un buen COC definido como un cumulus expandido y una corona con forma radiada (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

1.1.2. Parámetros oocitarios incluidos en el sistema de clasificación

Queda aceptada la definición morfológica de un oocito maduro óptimo, como aquel que ha de tener una forma redondeada, envuelto por una zona pelúcida clara y uniforme con un grosor de alrededor de 20µm, el citoplasma translúcido y libre de inclusiones, y la presencia de un corpúsculo polar de tamaño apropiado (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Sin embargo, respecto a la catalogación de oocitos, la revisión bibliográfica realizada revela una gran disparidad en los resultados (Alikani et al., 1995; De Sutter et al., 1996; Loutradis et al., 1999; Figueira et al., 2010; Rienzi et al., 2011), probablemente porque los estudios son retrospectivos, no homogéneos y, en su mayoría, basados en un número de casos insuficiente. En la tabla I se muestra la correlación descrita en diversos estudios entre la morfología oocitaria y las variables reproductivas.

El estado actual del conocimiento sobre los parámetros morfológicos analizados aún no permite establecer la importancia de dichos parámetros en las variables reproductivas relevantes. Por esta razón seguimos sin poder incluir la calidad oocitaria como parámetro importante en la categorización del embrión, aunque es cada vez más evidente que deberán ser incluidas en un futuro, conforme exista mayor evidencia científica.

Autores/ Parámetros morfológicos	Tamaño oocito	Orgánulos/ Granulosidad Central	AREL	Vacuolas, Inclusiones, Cuerpos refráctiles	Exudados Espacio perivitelino	ZP	Incremento Espacio Perivitelino	1er CP Tamaño	Complejo Cúmulo Corona radiata-oocito	Influencia
ALPHA-ESHRE, 2011	SI	SI	SI	+	-	+	+	SI	+	F, DE, BL, EBq, AN, RNV
Balaban et al., 1998	NO	NO	-	NO	-	NO	NO	-	-	F, CE, IM, EC
Balaban & Urman, 2006	-	SI	SI	+	+	-	-	-	+	DE, BL, EBq
Bielanska et al., 2011	-	-	SI	-	-	-	-	-	-	IM, EC
Ciotti et al., 2004	-	-	-	-	-	-	-	NO	-	F,DE,IM, EC
Ebner et al., 2000		-	-	-	-	-	-	SI	-	F, CE, IM
Ebner et al., 2002								SI		CE, BL, IM
Ebner et al., 2006	SI	SI	SI	SI						IM, AN
Ebner et al., 2008	+	SI	+	SI	-	-	-	-	SI	F, DE, BL, EBq
Ebner et al., 2010	-	-	-	-	-	SI	-	-	-	BL, IM
Figueira et al., 2010	-	SI	-	-	SI	-	-	-	-	F, DE, CE,IM
Gu et al., 2010	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Paciente-específico
Hassan-Ali et al., 1998	-	-	-	-	NO	-	+	-	-	F,DE,IM, EC
Kahraman et al., 2000	-	SI	-	SI	-	SI	-	-	-	F,CE,IM,EC,AN
Loutradis et al., 1999	-	SI	-	SI	-	NO	-	-	-	F,CE, DE, EC
Mateizel et al., 2013	-	-	SI	-	-	-	-	-	-	F, CE, IM, RNV
Montag et al., 2008	-	-	-	-	-	SI	-	-	-	DE, IM, EC, RNV
Navarro et al., 2009		-	-	-	-	-	-	SI	-	F, DE, EC, IM, RNV
Otsuki et al., 2004	-	-	SI	-	-	-	-	-	-	F, IM, EBq
Otsuki et al., 2007		-	-	SI	-	-	-	-	-	F,BL
Rienzi et al., 2008	NO	SI	SI	SI	-	NO	SI	SI	-	F, MPN, CE, IM
Rienzi et al., 2011	-	SI	SI	SI	SI	NO	SI	SI	-	F, MPN , CE, EC
Rienzi et al., 2012	-	-	-	SI	-	-	-	-	-	F,BL
Setti et al., 2011	-	-	-	SI	-	-	SI	SI	-	F, IMP, EC
Ten et al., 2007	NO	SI	-	NO	-	NO	SI	NO	-	F,CE,IM,AN
Verlinsky, 2003	-	-	-	-	-	-	-	NO	-	F,CE,BL,EC,AN
Xia, 1997	-	-	-	SI	-	-	SI	+	-	F,CE

F: Fecundación ; **MPN**: Morfología de los pronúcleos; **DIV**: División Embrionaria; **DE**: Desarrollo Embrionario; **CE**: Calidad Embrionaria; **BL**: Blastocisto; I**M:** Implantación; **EBq:** Embarazo bioquímico; **EC:** Embarazo Clínico; **AN:** Aneuploidías

Tabla I. Correlación de la morfología oocitaria y algunos parámetros, según referencias bibliográficas consultadas. (Si) muestra correlación; (No) no muestra correlación; (-) No investigado; (+) Investigado

1.1.3. Recomendaciones

Basado en la revisión de Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology (2011), podríamos concluir:

- Los resultados del efecto de las alteraciones extracitoplasmáticas (morfología del corpúsculo polar, tamaño del espacio perivitelino, apariencia de la zona pelúcida) son controvertidos y no parece que exista una relación de las mismas con la tasa de implantación de los embriones resultantes. Estas alteraciones, en lugar de anomalías, podrían ser consideradas como desviaciones fenotípicas como resultado de la heterogeneidad de los oocitos extraídos (Rienzi et al., 2012).
- Basándonos en los datos publicados, parece más evidente que las alteraciones citoplasmáticas severas, como la presencia de acumulaciones de retículo endoplasmático liso, la acumulación de orgánulos/granulosidad severa centralizada y la vacuolización excesiva, podrían perjudicar el desarrollo embrionario y su potencial implantatorio. Por tanto, estas desviaciones severas de la normalidad citoplasmáticas son las que tendremos que tener en cuenta a la hora de establecer diferencias entre embriones de la misma calidad morfológica.
- La morfología del oocito puede también reflejar anomalías genéticas. Por esta razón se aconseja no inseminar los oocitos gigantes, aquellos que presentan un tamaño superior a 200µm, ya que suelen contener un set de cromosomas adicionales, aunque la presencia de un único oocito gigante no compromete el ciclo (Machtinger et al., 2011).

Recomendamos la utilización de algunos de los parámetros para establecer diferencias entre embriones de la misma calidad morfológica:

Desfavorables:

- Acumulaciones de REL.
- Granulosidad central.
- 1er CP gigante (>30µm).
- Vacuolización excesiva.
- Oocitos gigantes: No se deben utilizar.

También recomendamos la observación de la zona pelúcida en este estadio.

1.2. Valoración morfológica del zigoto. D+1

Habitualmente se ha considerado la observación del estadio de zigoto como una herramienta útil sólo para identificar fallos o alteraciones de la fecundación. Sin embargo, el proceso de fecundación supone una serie ordenada de cambios morfológicos que afectan

notablemente al aspecto celular y que pueden dar información de utilidad. Hace unos años y movidos por necesidades impuestas por legislaciones de cada país, surgieron una serie de publicaciones que hablaban de la posibilidad de seleccionar los embriones sólo en función de este estadio. Con el tiempo esto tomó una importancia relativa, pasando a formar parte de sistemas de clasificación complejos y dinámicos en los que se tenía en cuenta la morfología del embrión en varios estadios del desarrollo.

1.2.1. Intervalo de tiempo de observación posinseminación en D+1

La interacción de los gametos masculino y femenino supone una secuencia de acontecimientos que da lugar a la aparición de nuevas estructuras nucleares y cambios morfológicos dinámicos. Este hecho implica que la hora de observación de los pronúcleos (PN) es crucial para una valoración adecuada del zigoto.

Márgenes de tiempo inadecuados en la valoración de la fecundación conllevan un alto riesgo de fallos de interpretación:

- No visualización de los 2PN + 2CP, alteración de su tamaño o posición, valoración errónea de su yuxtaposición.
- Modificación en el tamaño, número y distribución de los cuerpos precursores nucleolares (NPB, *Nucleolar Precursor Bodies*).
- Variación del aspecto del citoplasma.

Los márgenes horarios habituales en la observación de los PN oscilan entre las 16 y las 22 horas tras la inseminación/microinyección. Este margen podría provocar la falta de observación de los PN que hayan desaparecido muy temprano, por lo que se aconseja restringir la observación a un rango de 16 a 18 horas, máxime teniendo en cuenta el uso generalizado de la ICSI (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Actualmente, con la introducción del seguimiento continuo del desarrollo embrionario en tiempo real (*Time-Lapse*) de los embriones, se ha aumentado el conocimiento sobre los eventos que se dan en el desarrollo embrionario, como la extrusión del segundo corpúsculo polar, la aparición de los PN, su movimiento y su desaparición, y su relación con la implantación. Aunque no se dispone de ningún estudio que presente una clasificación o unos parámetros morfocinéticos en el zigoto, sí es posible que se modifique el momento recomendado de observación de éstos. Alrededor de las 9-10 horas posinseminación se observa la aparición de los PN y su movimiento hacia la zona central del zigoto. La observación continua y seriada del movimiento de los precursores nucleolares (NPB), y el cambio de tamaño y distribución de éstos, hace que las clasificaciones clásicas de PN, basadas en una única observación estática, hayan quedado relegadas a un segundo plano en la valoración de la morfología embrionaria; ver imagen 16.

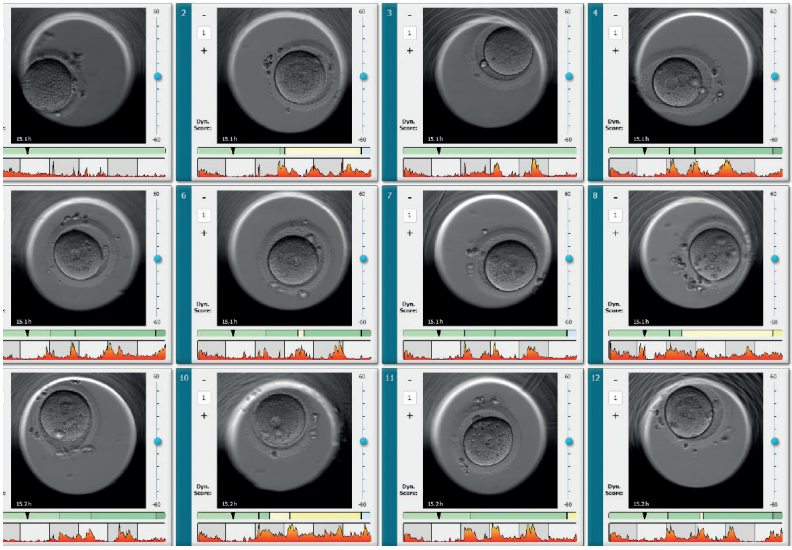


Imagen 16. Pronúcleos en *Time-Lapse*.

La presencia de los PN puede perdurar hasta las 24-28 horas posinseminación (Aguilar et al., 2014). Una desaparición muy temprana de éstos, por ejemplo antes de las 20 horas, es un evento cuya importancia se está cuestionando, y que ha sido posible observarlo gracias a la tecnología del *Time-Lapse*.

1.2.2. Parámetros evaluados en el estadio de D+1

a) Alteraciones morfológicas:

- Corpúsculos polares (CP): Número, apariencia y localización respecto a los pronúcleos.
- Número de pronúcleos (PN).
- Apariencia de los pronúcleos: Simetría, sincronía y localización.
- Cuerpos precursores nucleolares (NPB): Número, simetría y polarización.
- Halo citoplasmático: Presencia/ausencia y aspecto.

b) División temprana.

Corpúsculos polares (CP)

- Número. No existen evidencias de que el número de corpúsculos polares deba ser incluido en la valoración morfológica. Sin embargo, su observación es importante para evaluar la ploidía, en conjunto con el número de PN; ver imagen 17.

Imagen 17. Número de corpúsculos polares en D+1.

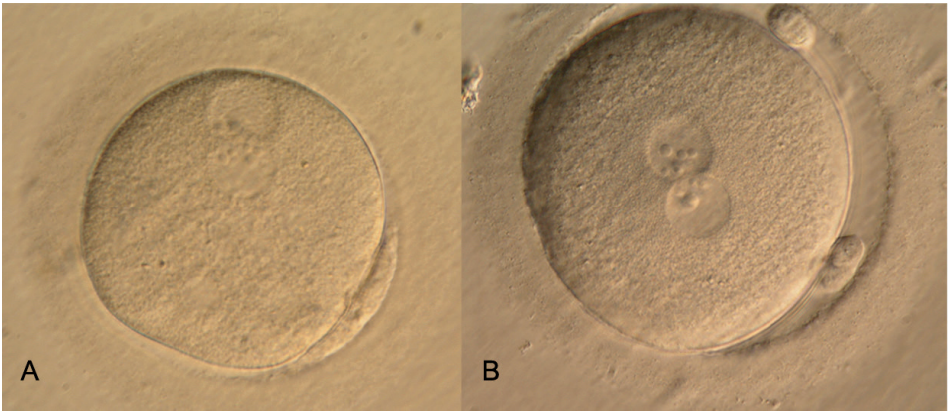
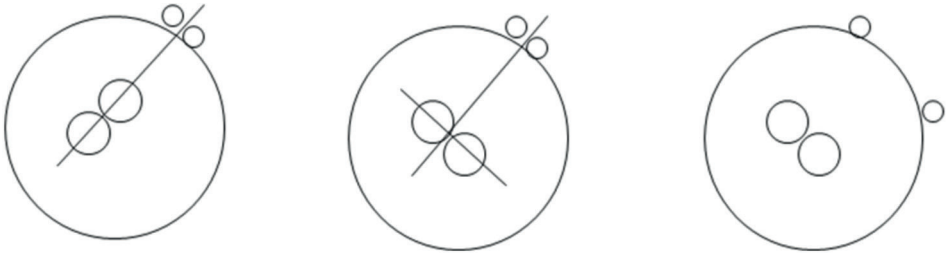


Imagen 18. (A) corpúsculos fragmentados; (B) corpúsculos separados.

- Apariencia. La apariencia de los CP suele hacer referencia a las alteraciones en el tamaño o en la fragmentación de los mismos. Actualmente no existen evidencias que puedan apoyar la inclusión de este parámetro en la valoración morfológica; ver imagen 18.
- Localización respecto a los pronúcleos. Los PN aparecen alineados con el 2doCP, marcando el eje polar que determinará el plano de la primera división mitótica (Scott, 2000), aunque la acción mecánica al denudar el oocito para una ICSI puede producir el desplazamiento de los CP. Los PN se centran y rotan hasta situarse ecuatorialmente al eje polar. Este posicionamiento se ha incluido en algunas clasificaciones, aunque su relación con el desarrollo embrionario posterior no es concluyente (Gianaroli et al., 2003; Nicoli et al., 2010); ver figura 1.



i) Longitudinal ii) Perpendicular iii) Otra

Figura 1. Orientación de los corpúsculos polares en relación al eje longitudinal de los pronúcleos incluida en la clasificación de zigotos de Gianaroli et al., 2003 i) Longitudinal; ii) Perpendicular al eje longitudinal; iii) otra posición distinta.

Número de pronúcleos (PN)

La valoración conjunta del número de pronúcleos, el número de corpúsculos polares y la técnica utilizada (FIV convencional o ICSI) permiten decidir qué hacer cuando en D+1 tenemos zigotos con la morfología observada en las imágenes 19 y 20.

Respecto a la clasificación anteriormente publicada (ASEBIR, 2008), y a la vista de nuevas publicaciones (Azevedo et al., 2014), recomendamos descartar todos aquellos oocitos fecundados provenientes de ICSI que presentan la formación de un solo PN y 2 CP. Cabe la duda de la asincronía en la formación de PN (Staessen et al., 1993) y la fusión de PN (Levron et al., 1995), en el caso de que se haya realizado una observación única y estática de la fecundación. No obstante, la observación de la fecundación mediante tecnología Time-Lapse indica que podemos descartar el embrión por estar altamente relacionado con aneuploidías (Mateo et al., 2013) o activación partenogenética (Staessen and Van Steirteghem, 1997). En cuanto a los oocitos fecundados que proceden de FIV convencional y presenten 1PN y 2CP, queda a criterio de cada laboratorio seguir o no su evolución, ya que un 80% pueden ser diploides; ver tabla II.

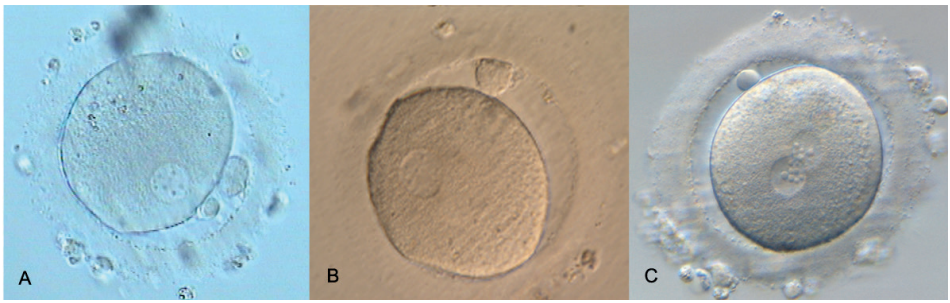


Imagen 19. (A) 1 PN + 2 CP; (B) 1 PN + 1 CP; (C) 2 PN + 1 CP.

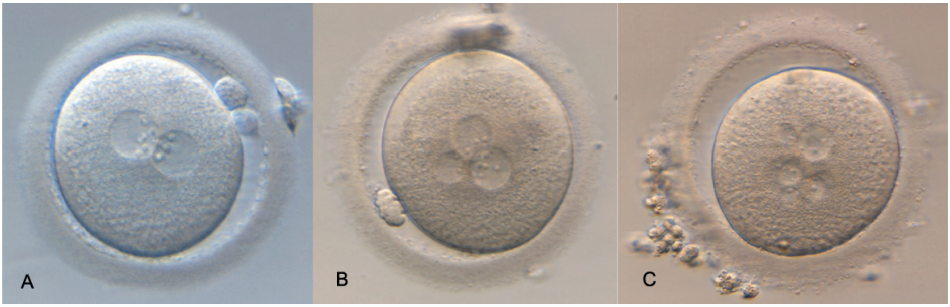


Imagen 20. (A) 2 PN + 2 CP; (B) 3 PN + 1 CP; (C) micronúcleos.

Relación nº PN-CP	FIV	ICSI
2 PN + 2 CP	Continuar	
1 PN + 1 CP	Descartar	
1 PN + 2 CP	Si evoluciona, 80% diploidía	Descartar (según texto). Si evoluciona, 20% diploidía
2 PN + 1 CP	Descartar*	
> 2PN	Descartar	

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

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

La observación de un único CP pone de manifiesto la no extrusión del 2doCP y, por tanto, los zigotos con un solo CP serán digínicos. En el caso de que el oocito haya sido fecundado, se observarán 3PN, y solo 2PN si no lo ha sido. Resaltamos que ante una observación clara de un CP, aunque el zigoto presente 2PN, no se recomienda la transferencia del embrión debido a la ausencia de cromosomas paternos.

La presencia de 3PN es signo inequívoco de una fecundación anómala y, en el caso de que el oocito haya sido inseminado de manera convencional, su origen más probable sería una polipenetración espermática. En cualquier caso hay que descartar el embrión, ya que será triploide (Palermo et al., 1995; Boada and Ponsà, 2008). La presencia de 2PN y uno o más micronúcleos también es signo de mala fecundación, debido en este caso a errores en la formación de los pronúcleos. Debemos descartar el embrión porque existe una correspondencia con la presencia de anomalías cromosómicas (Staessen and Van Steirteghem, 1997). En el caso de ausencia de PN con 2CP, se podría realizar una observación de la división temprana, por la posibilidad de aparición de PN tardíos.

Apariencia de los pronúcleos y de los cuerpos precursores nucleolares (NPB, *Nucleolar Precursor Bodies)*

Las clasificaciones embrionarias del zigoto publicadas consideran principalmente el aspecto de los pronúcleos (PN) y de los precursores nucleolares (NPB) (Tesarik y Greco, 1999; Scott, 2000). En relación a los PN se valora la simetría (iguales o desiguales), posición (adyacentes o separados), y localización en el citoplasma (centrales o no). Los NPB se clasifican en cuanto a número, simetría (tamaño similar) y localización (polarizados: alineados en la membrana o situados en la mitad próxima al PN adyacente).

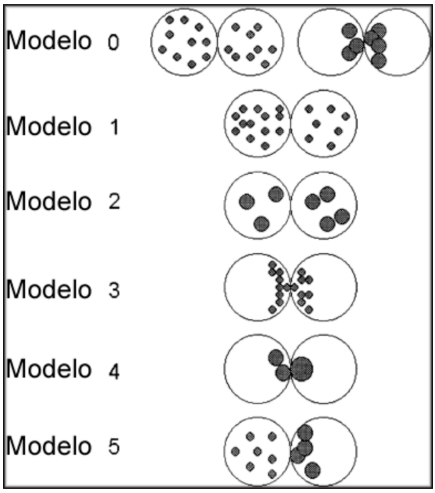


Figura 2. Esquema de gradación pronuclear propuesto por Tesarik y Greco (1999).

Tesarik y Greco (1999) presentaron la primera clasificación basada únicamente en el aspecto de los PN (Figura 2). En 2000, Tesarik et al. presentan una versión resumida: p0 y no-p0 (Tesarik et al., 2000), reportando unas tasas de embarazo e implantación de 45% y 30% con los p0 frente al 22% y 11% en los no-p0, así como mayores tasas de multinucleación, baja calidad embrionaria y bloqueo en la división en p1, p2 y p3.

Estos resultados han sido reproducidos en la literatura con pequeñas adaptaciones relacionándolo con calidad embrionaria (Wittemer et al., 2000; Arroyo et al., 2007), ritmo de división y desarrollo hasta blastocisto (Balaban et al., 2004), implantación (Balaban et al., 2004) y gestación (Wittemer et al., 2000; Balaban et al., 2004; Montag et al., 2011a). Por el contrario, otras publicaciones no hallan ninguna relación entre esta clasificación y el ritmo de división (Aydin et al., 2011), el desarrollo hasta blastocisto (Guerif et al., 2007) o la tasa de implantación y gestación (Arroyo et al., 2007; Brezinova et al., 2009).

Scott (2000) presenta una clasificación de zigotos con 4 patrones Z (Figura 3). Esta clasificación también ha sido sujeta a interpretaciones y asociada a la calidad embrionaria (Arroyo et al., 2007) y al desarrollo hasta blastocisto, así como con la tasa de implantación y gestación (Lan et al., 2003). Por el contrario, James et al. (2006) no encuentran relación entre esta clasificación y la calidad embrionaria, ni tampoco con las tasas de implantación y gestación.

En la literatura existen clasificaciones que son una combinación de las anteriormente descritas (James et al., 2006; Nicoli et al., 2007, 2010). De Placido et al. (2002) consideran de buen pronóstico la presencia de halo, posición central de los PN en el citoplasma, igual tamaño y distribución polarizada de los NPB. A pesar de formar parte de una clasificación embrionaria con gradación dinámica hasta D+3, no hallan relación ni con la calidad embrionaria, ni con los resultados clínicos; ver imágenes 21 a 26.

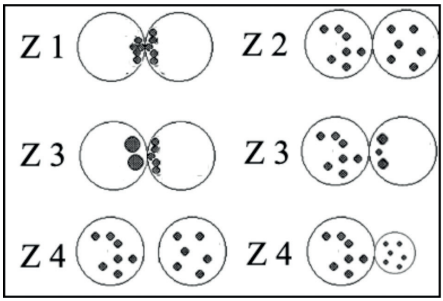


Figura 3. Esquema de gradación pronuclear propuesto por Scott (2000).

Imagen 21. Pronúcleos separados.

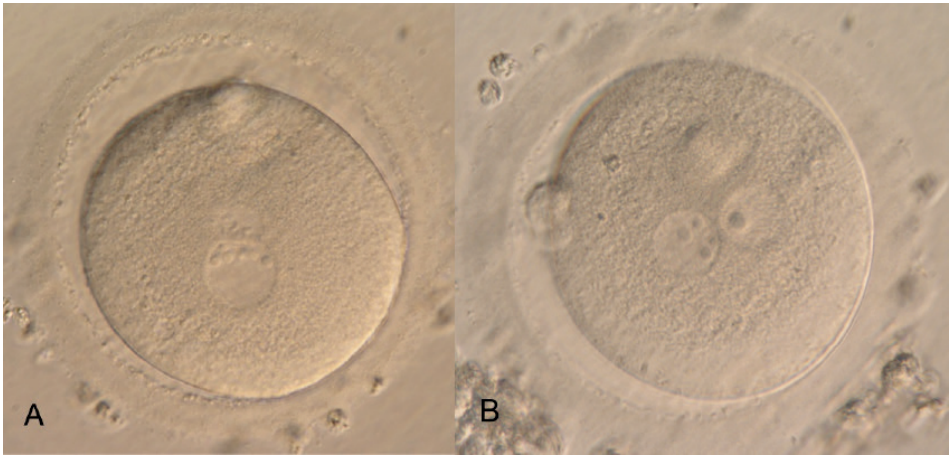


Imagen 22. (A) pronúcleos de tamaño diferente; (B) sólo un precursor en uno de los pronúcleos.

No se ha encontrado consenso en la bibliografía cuando se trata de relacionar los distintos patrones pronucleares con las tasas de implantación, aunque hay tres características morfológicas que sí parecen tener relación con bajas tasas de implantación o con mala morfología embrionaria:

- Un solo precursor nucleolar en un pronúcleo.
- Pronúcleos separados.
- Pronúcleos de tamaño desigual.

Imagen 23. (A) sólo dos precursores en un pronúcleo; (B) polarización de los precursores en sólo un pronúcleo.

Imagen 24. (A) pronúcleos periféricos; (B) precursores asimétricos, las flechas destacan algunas de las desigualdades.

La presencia de estas características se ha relacionado además con mayores tasas de aneuploidías y alteraciones en la dotación cromosómica del embrión. Las clasificaciones utilizadas son también variadas (Gianaroli et al., 2003, 2007; Balaban et al., 2004; Chen and Kattera, 2006; Arroyo et al., 2010), confirmando la importancia de la sincronía y equilibrio en la distribución, número y tamaño de los NPB como factor de buen pronóstico, así como la simetría de los PN (Sadowy et al., 1998; Kahraman et al., 2002; Gámiz et al., 2003).

Imagen 25. (A) precursores polarizados sólo en uno de los pronúcleos; (B) precursores polarizados en ambos pronúcleos. p: polarizados, d: dispersos.

Imagen 26. (A) oocito atrésico o lisado en D+1 tras microinyección; (B) presencia de micronúcleo indicado con flecha.

Halo citoplasmático

Es la presencia de un área cortical más clara en parte o todo el citoplasma. Scott y Smith (1998) propusieron una primera clasificación de los zigotos en la que consideraban parámetros como el aspecto del citoplasma y la presencia de halo. A pesar de que su valoración tiene un componente subjetivo y altamente variable entre diferentes observadores, varias publicaciones llegan a la conclusión de que es una característica positiva, siempre y cuando no sea excesiva (Payne et al., 1997; Zollner et al., 2002; Balaban and Urman, 2006). Los zigotos con halo evolucionan como embriones de mejor calidad (60,9%) que los zigotos sin halo (52,2%), con una diferencia estadísticamente significativa (Salumets et al., 2001); ver imágenes 27 y 28.

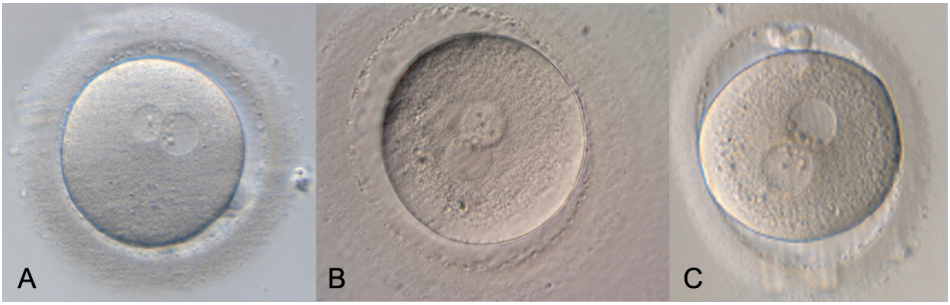


Imagen 27. (A) zigoto con ausencia de halo; (B) zigoto con halo incompleto que se presenta parcialmente en el contorno celular; (C) zigoto con halo completo.

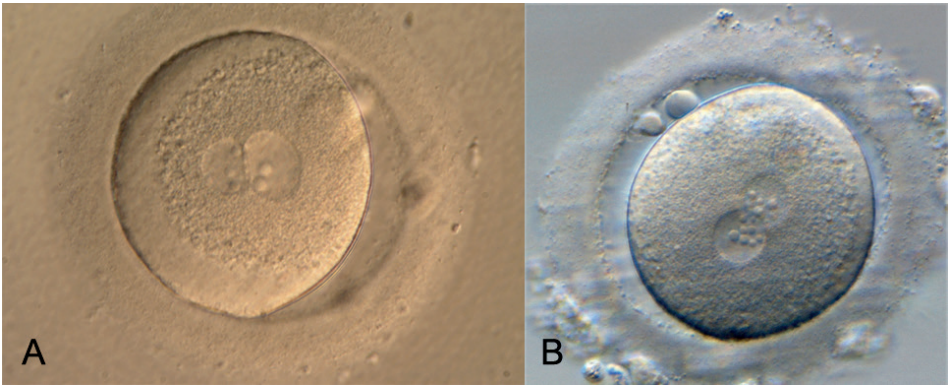


Imagen 28. (A) zigoto con halo excesivo; (B) zigoto con halo adecuado.

División temprana

La observación de este parámetro se aconseja realizarla entre las 25 y las 27 horas pos-ICSI (27-29 horas pos-FIV) (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). La frecuencia de la presentación de la división temprana es variable, pero se espera que alrededor del 50% de los ciclos presenten algún embrión con división temprana observando los embriones a las 26±2 horas, y esta probabilidad decrece con el aumento de la edad de la paciente; ver imagen 29.

Imagen 29. Embrión con división temprana a las 26 horas posinseminación.

En la primera edición de este Cuaderno, los estudios que analizaban este parámetro, no lo analizaban únicamente, sino que combinaban la presencia de la división temprana con la morfología del zigoto (Chen and Kattera, 2006), la uninucleación en D+2 (Ciray et al., 2005) o la morfología en D+3 (Neuber et al., 2003).

En la división temprana se han analizado los siguientes parámetros morfológicos:

- Primera división celular realizada.
- Semejanza de los blastómeros.
- Presencia de fragmentación.
- Multinucleación.

La relación de la división temprana con los resultados clínicos en cuanto a las tasas de implantación y gestación es controvertida; mientras que en algunos estudios se ha relacionado la división temprana con mejores tasas de embarazo en FIV convencional (Edwards et al., 1984; Shoukir et al., 1997) y en ICSI (Sakkas et al., 1998; Ciray et al., 2005), en otras publicaciones no se confirma esta relación (Emiliani et al., 2006; Sundström and Saldeen, 2008; De los Santos et al., 2014).

En cuanto a la relación entre los embriones con división temprana y la calidad embrionaria (Lundin et al., 2001; Rienzi et al., 2005; Ciray et al., 2006) y el desarrollo hasta blastocisto (Fenwick et al., 2002; Neuber et al., 2003; Guerif et al., 2007), los resultados también son contradictorios.

En el reciente estudio multicéntrico del GIE de ASEBIR (De los Santos et al., 2014), se ha hallado relación entre la observación de la división temprana (EC, *Early Cleavage*) y la probabilidad de implantación de los embriones de categoría C en D+3 (25,7% EC vs 14,9% No EC), no siendo así en las categorías de mejor pronóstico como la A y la B. Parece pues que la división temprana tiene un mayor peso en la evaluación de embriones de peor pronóstico.

En general, en las publicaciones estudiadas, y en consonancia con el trabajo multicéntrico de ASEBIR, se aconseja utilizar la división temprana como "parámetro secundario", para decidir entre embriones de calidad similar.

La multinucleación también fue analizada en este estudio sobre la división temprana (De los Santos et al., 2014). La frecuencia fue del 10,9% en los embriones de 2 células. La tasa de implantación para este tipo de embriones fue del 24,2%, mientras que la de los embriones no multinucleados con división temprana fue del 36,5%. La diferencia no fue sin embargo estadísticamente significativa; a pesar de ello, sería aconsejable que, ante embriones de morfología similar el día de la transferencia, se elija aquellos que no hubiesen presentado multinucleación. Por lo tanto, se recomienda que si utilizamos la división temprana para decidir en el momento de la transferencia, seleccionaremos aquel embrión que a las 26 horas posinseminación presente dos blastómeros del mismo tamaño, con ausencia de fragmentación y sin multinucleación.

Con la publicación de los últimos estudios de *Time-Lapse*, se añaden nuevos parámetros morfocinéticos a la valoración del zigoto. Una desaparición temprana de PN y primera división se correlacionan con un desarrollo adecuado en D+2 (Lemmen et al., 2008). También Meseguer et al. (2011) relacionan la división temprana con buen pronóstico embrionario. Otro estudio, sin embargo, relaciona la desaparición temprana de PN con una probabilidad menor de nacidos vivos (Azzarello et al., 2012). En definitiva, consideramos que la evaluación de estos parámetros tempranos no parece aumentar significativamente el poder predictivo de implantación que ya posee la valoración morfológica realizada a partir de D+2.

Tal vez uno de los aspectos más interesantes con efecto negativo para la implantación, es la división directa a 3 células (Rubio et al., 2012). Dado el consenso general en las publicaciones con *Time-Lapse*, referente a la poca probabilidad de viabilidad de los embriones que realizan división directa a 3 células, se ha decidido que en los casos en que, sin tecnología *Time-Lapse*, se observe un embrión en D+2 con 3 células iguales, éste se considerará como resultado de una división directa a 3 células y por lo tanto se le otorgará la categoría D. No obstante, vale la pena destacar que, dado que la definición de división directa hace mención a la duración del segundo ciclo celular (menor de 5 horas), podría darse el caso de estar observando embriones con tres blastómeros y buena simetría,

pero que seguirían estando dentro del grupo llamado división directa, con mal pronóstico reproductivo.

1.2.3. Parámetros en el estadio de D+1 incluidos en el sistema de clasificación

Igual que en D+0, la revisión bibliográfica realizada, así como los datos que hemos analizado, revelan gran variabilidad en los resultados. El estado actual del conocimiento tampoco permite establecer aún que los parámetros morfológicos analizados tengan una relación directa con la tasa de implantación independientemente de la morfología embrionaria en días posteriores.

Por el momento, no se puede incluir la calidad en D+1 como parámetro de relevancia en la categorización del futuro embrión.

1.2.4. Recomendaciones

Recomendamos la utilización de algunos de los parámetros analizados para establecer diferencias entre embriones de la misma calidad morfológica.

Favorables:

- La presencia de halo.
- División temprana.

Desfavorables:

- Cualquier estado diferente de 2PN + 2CP.
- Un solo precursor nucleolar en alguno de los PN.
- Pronúcleos separados o de tamaño desigual.
- División directa a 3 células (si se dispone de tecnología *Time-Lapse).*

Descartar:

- 1PN + 1CP.
- 2PN + 1CP, de acuerdo con la Tabla II (pág. 25).
- Más de 2PN.

1.3. Valoración morfológica en D+2 y en D+3

La valoración en estos estadios ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria. Sin embargo, aunque existe cierto acuerdo sobre qué es un buen

embrión y qué es un mal embrión, el consenso entre laboratorios es muy difícil cuando se trata de valorar embriones de calidades intermedias (Bruna et al., 2005). En una encuesta realizada a centros de reproducción asistida en España, antes de la redacción de la primera edición de este Cuaderno (Torelló, 2005), así como posteriores sondeos mediante los controles de calidad externos (Castilla et al., 2010) y una encuesta a todos los centros de reproducción asistida sobre el uso del Cuaderno (Hurtado de Mendoza, 2011), evidenciaron la gran disparidad de criterios en la aplicación de la clasificación embrionaria entre los diferentes laboratorios, disparidad que se agudizaba en la zona intermedia de calidad. La ausencia de criterios comunes afectaba tanto a los parámetros a evaluar, como a los puntos de corte entre categorías, e incluso al algoritmo que definiría la categorización de la calidad embrionaria.

De ahí la importancia de realizar controles intra e interlaboratorios (Arce et al., 2006), para reducir diferencias tanto entre los embriólogos de un mismo centro como entre los distintos laboratorios, así como de aplicar correctamente la clasificación embrionaria y las recomendaciones que se proponen en este Cuaderno, fruto no sólo de los datos bibliográficos, sino también del estudio multicéntrico de validación del criterio ASEBIR (Pons et al., 2014). Los resultados de este trabajo demuestran que la clasificación de ASEBIR tiene valor pronóstico tanto para la tasa de implantación como para la tasa de nacido vivo, ya que dichas tasas aumentan gradualmente según la categoría embrionaria, siendo máximas en los embriones de categoría A y mínimas en los de categoría D.

1.3.1. Intervalo de observación posinseminación en D+2 y D+3

Se debe realizar la observación durante los siguientes intervalos de tiempo:

- D+2: 43-45 horas posinseminación.
- D+3: 67-69 horas posinseminación.

1.3.2. Parámetros evaluados en los estadios de D+2 y D+3

- 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.
- Anomalías citoplásmicas:
    - Anillo acitoplasmático.
    - Presencia de vacuolas.
    - *Pitting* o moteado.
- Forma del blastómero.
- Zona pelúcida.
- Grado de compactación/adhesión temprana.

Número de células y ritmo de división

La valoración de la morfología embrionaria incluye la observación del embrión en el segundo día de cultivo (D+2). Dicha observación debe realizarse 44 ± 1 horas después de la inseminación (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). En este momento los embriones óptimos serán aquellos que presenten 4 células (Munné, 2006; Holte et al., 2007; Scott et al., 2007).

Si el cultivo embrionario continúa, el siguiente momento de observación es en D+3, a las 68 ± 1 horas después de la inseminación (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). En este momento los embriones con mayor probabilidad de implantación serán aquellos que presenten 7-8 células y que a su vez procedan de 4 células en D+2 (Racowsky et al., 2011). Se ha demostrado que los embriones con ≤ 6 células o ≥ 9 células en D+3 presentan mayores tasas de aneuploidías que aquellos embriones que presentan 7 u 8 blastómeros (Magli et al., 2007; Finn et al., 2010).

El motivo de la variación en los tiempos de división aún no está claro, pero se ha atribuido a factores intrínsecos del oocito, como ciertas características del huso meiótico (Tomari et al., 2011) o el estado de sus orgánulos (Van Blerkom et al., 1995; Scott et al., 2008). También se ha observado cierta variación en función del medio de cultivo utilizado y de las condiciones ambientales (Ciray et al., 2012).

Apoyándonos en las principales publicaciones, y en los resultados de la encuesta multicéntrica organizada por la comisión de ASEBIR en el ámbito nacional, se puede esbozar una clasificación según el número de células para el D+2 y el ritmo de división de D+2 a D+3 (Desai et al., 2000; Hardarson et al., 2001; Van Royen et al., 2001); ver imágenes 30, 31 y 32.

Evaluación en D+2:
Con los estudios actuales es posible agrupar los embriones en función de la tasa de implantación según el número de células observadas, de mejor tasa a peor tasa de implantación:

- 4 células.
- 5 células.
- 2, 3 o 6 células.
- 1 o más de 6 células.

La presencia de 5 células aporta mejor tasa de implantación que la de 2, 3 o 6 células; los embriones de 6 células tienden a dar mejores resultados que los de 3 células. En la presente edición, los embriones de 2 células se categorizan como C en lugar de B, debido a que se

Imagen 30. Estadios de 2 a 5 blastómeros.

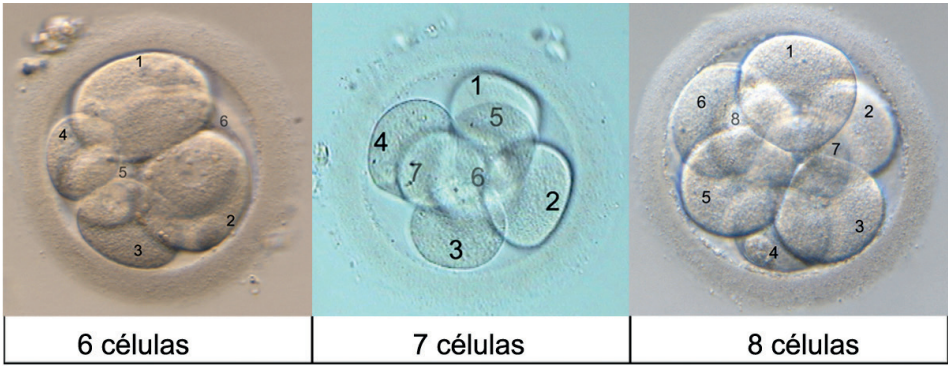


Imagen 31. Estadios de 6 a 8 blastómeros.

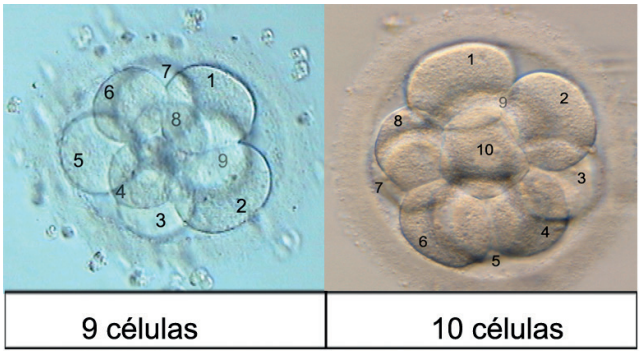


Imagen 32. Estadios de 9 a 10 blastómeros.

ha podido apreciar que las tasas de implantación y de recién nacido vivo correspondientes a los embriones que en D+2 presentaban 2 células son similares a las de los embriones pertenecientes a la categoría C (datos no publicados).

Evaluación en D+3:
La valoración del embrión en D+3 es dependiente del ritmo de división entre D+2 y D+3. En base al estudio multicéntrico realizado por el GIE de ASEBIR (Pons et al., 2014), en la tabla III se exponen los resultados obtenidos hasta el momento, agrupando los embriones en función de la tasa de implantación según el ritmo de división. Debemos resaltar que, debido a la naturaleza del estudio, con un tamaño muestral relativamente bajo, estos resultados son susceptibles de cambios y controversias.

Ritmo de División	T. Implant	Implantados	Transferidos	P (respecto al primero)
4 → 7 - 9	24,8%	326	1312	
5 → >6 ; 4 → >9	16,8%	33	196	0,015
2 → 4 - 9	10,2%	19	186	0,0001
4 → 6	7,6%	6	79	0,0002
3 → >4	3,1%	3	94	<0,0001
No división o incremento de una cél de D+2 a D+3	<1,5%	0	63	<0,0001

Tabla III. Agrupación del tipo embrionario según la evolución de la división celular, de mejor a peor tasa de implantación.

Porcentaje y tipo de fragmentación celular

Según Sela et al. (2012) la clasificación embrionaria que predice el potencial implantatorio del embrión se establece combinando el grado de fragmentación, el número de blastómeros y el patrón de división en D+2 y D+3.

Podemos definir un fragmento celular como una estructura anuclear, formada por citoplasma delimitado por una membrana celular, de origen blastomérico, con un tamaño de <45µm de diámetro en D+2 y <40µm en D+3 (Prados et al., 2012).

La presencia de fragmentos en los embriones humanos cultivados *in vitro* ocurre con cierta frecuencia; hasta el momento solo se ha podido observar en la especie humana y no siempre se correlaciona con una tasa de implantación baja.

La fragmentación en los estadios tempranos del desarrollo reduce la viabilidad del embrión debido a anomalías que acaban provocando un bloqueo embrionario, por lo general antes de llegar a la blastulación (Racowsky et al., 2009; Pelinck et al., 2010).

Actualmente todos los estudios coinciden en que la fragmentación es un parámetro morfológico importante para establecer la clasificación embrionaria y mayoritariamente se evalúa en D+2 y D+3.

Los patrones de fragmentación establecidos en la bibliografía hacen referencia:

Al **Tamaño** de los fragmentos. Cuando predominan fragmentos de gran tamaño repartidos por todo el embrión, que pueden confundirse con células pequeñas, las posibilidades de implantación son escasas. Este patrón de fragmentación es el denominado Tipo IV (Alikani and Cohen, 1995). En esta 3ª Edición del Cuaderno, en la tabla de la página 54 (Gradación embrionaria para D+2 y D+3) se ha eliminado el concepto "No Tipo IV" de la columna "% Fragmentos" de las calidades embrionarias A, B y C, ya que es un dato que puede generar confusión. En este patrón de fragmentación, en la mayoría de los casos, los fragmentos ocupan más del 35% del volumen celular; por lo tanto, si un embrión clasificado como A tiene un porcentaje de fragmentos ≤10%, no puede haber una fragmentación Tipo IV, al igual que en un embrión clasificado como B (≤ 25%) y en un embrión clasificado como C (≤ 35%).

A la **Distribución** de los fragmentos. Existe un mayor número de anomalías cromosómicas en embriones que presentan una fragmentación dispersa por todo el volumen embrionario, en comparación con aquellos en los que se encuentra localizada (Magli et al., 2007).

Al **Volumen** que ocupan los fragmentos respecto al volumen total del embrión, donde porcentajes bajos de fragmentación (hasta un 10%) no parecen influir significativamente en el potencial implantatorio del embrión, así como tampoco en la tasa de embarazo, mientras que un elevado porcentaje de fragmentos (≥40%) reduce mucho el potencial de implantación del embrión (Alikani et al., 2000).

Al **Porcentaje** de fragmentación, que está en relación con el volumen de las células. Por ejemplo, si una célula de un embrión de 4 células se fragmentara totalmente, el porcentaje de fragmentación sería del 25%.

No existe un consenso en cuanto al porcentaje de fragmentos, aunque casi todos los estudios coinciden en un "punto de corte" asociado a la mejor calidad embrionaria y a una tasa mayor de implantación (<10% de fragmentos).

Según algunos autores, cuando el grado de fragmentación no supera el 20% (Ziebe et al., 1997; Van Royen et al., 1999; Hardarson et al., 2001) o bien el 25% (Alikani et al., 2000; Racowsky et al., 2003), la implantación del embrión no está comprometida. La observación habitual de los grados de fragmentación no nos permite resolver diferencias inferiores a 10 puntos porcentuales, por tanto ambos puntos de corte (20% y 25%) son igualmente aceptables.

El tratamiento de este parámetro es aplicable tanto al D+2 como al D+3, y se establecen cuatro grupos de calidad embrionaria, según el porcentaje de fragmentación, volumen y distribución; ver imágenes 33 a 35.

- ≤ 10%.
- > 10 - 25%.
- > 25 - 35%.
- > 35%.

Se recomienda que aquellos embriones con más del 50% de fragmentación no deberían ser ni transferidos ni congelados, debido a que su tasa de implantación es prácticamente nula.

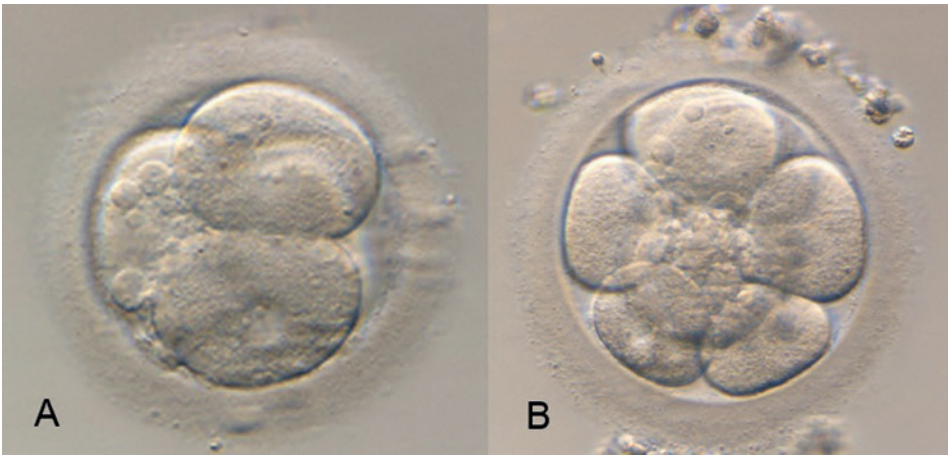


Imagen 33. Embriones de (A) 4 células y (B) 8 células con fragmentación aproximada del 10%.

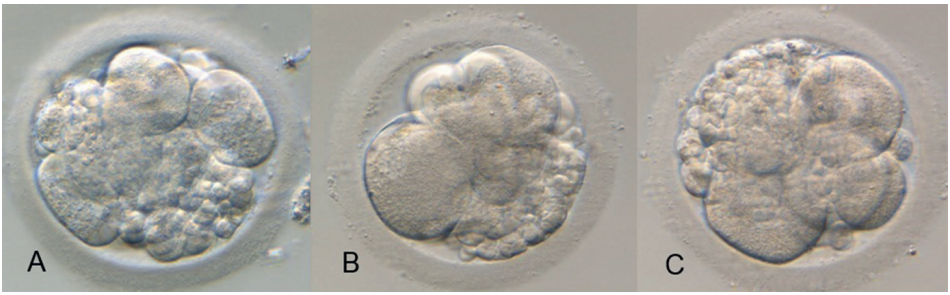


Imagen 34. (A); (B); (C) Embriones con fragmentación aproximada entre 15% y 25%.

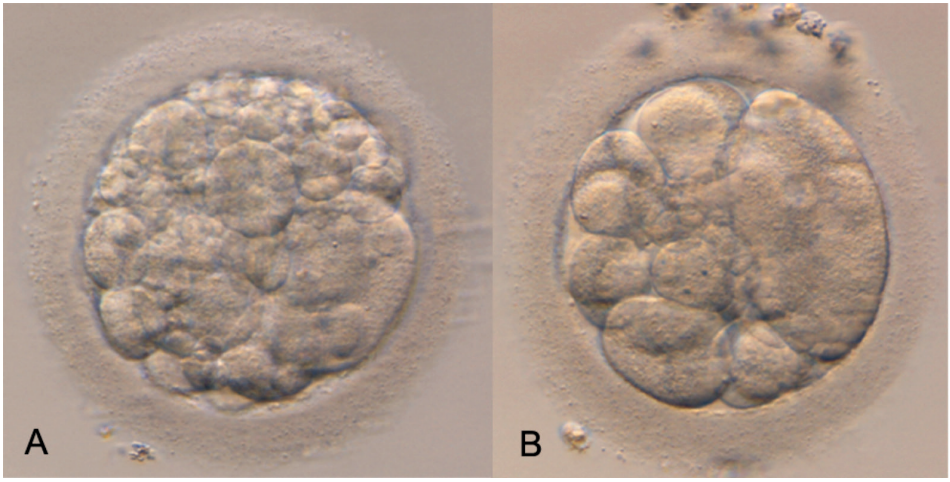


Imagen 35. (A) Embrión con fragmentación > 50%; (B) Embrión con fragmentación tipo IV.

Tamaño de los blastómeros estadio-específico

Cuando el zigoto realiza las primeras divisiones mitóticas, sus células no siempre se dividen simétrica y sincrónicamente. Un embrión con divisiones simétricas y sincrónicas presentará 2, 4, 8 o 16 células de tamaño similar, con una ausencia casi total de periodos de tiempo en los que se muestren estadios de división intermedios. En cambio, un embrión con divisiones simétricas, pero asincrónicas, presentará células de tamaño diferente durante periodos de tiempo considerables, porque corresponden a ciclos celulares diferentes; por ello debe ser considerado como un embrión "estadio-específico" y no como un embrión con células "desiguales", por lo que su categoría morfológica no debe ser penalizada. El concepto de desigualdad en el tamaño de los blastómeros está relacionado exclusivamente con las divisiones asimétricas, de tal manera que, por ejemplo, un embrión de 5 células de tamaño semejante no es "estadio-específico" (Prados et al., 2012), y debería ser clasificado como un embrión con células desiguales, mientras que un embrión de 5 células con 3 grandes (en el segundo ciclo de división) y 2 pequeñas (en el tercer ciclo de división) sí que sería "estadio-específico" y debería ser valorado como un embrión con células iguales. En definitiva, y para evitar errores de concepto, se recomienda utilizar la nomenclatura siguiente para definir la simetría celular de los embriones:

Embrión estadio-específico, sería aquel cuyas células presenten todas un tamaño acorde con su ciclo de división.

Embrión no estadio-específico, sería aquel que contenga células cuya relación de tamaños sea incompatible con su ciclo de división.

Según diversos autores, la falta de simetría en la división de los blastómeros se asocia con una disminución en la capacidad implantatoria (Steer et al., 1992; Veeck, 1999a; Van Blerkom et al., 2000; De Placido et al., 2002; Hnida et al., 2004).

Definimos como un embrión de 4 células con división asimétrica a aquel en el que la diferencia entre el diámetro de los blastómeros mayor y menor supera el 20% del diámetro de la mayor (Hardarson et al., 2001); ver figura 4 e imagen 36.

En un embrión de 3 células, una de ellas debe corresponder a un blastómero de un embrión de 2 células (primer ciclo de división) que todavía no se ha dividido, y que debe ser claramente más grande que las otras 2 células, el tamaño de las cuales ha de ser el esperado para los blastómeros en estadio de 4 células (segundo ciclo de división).

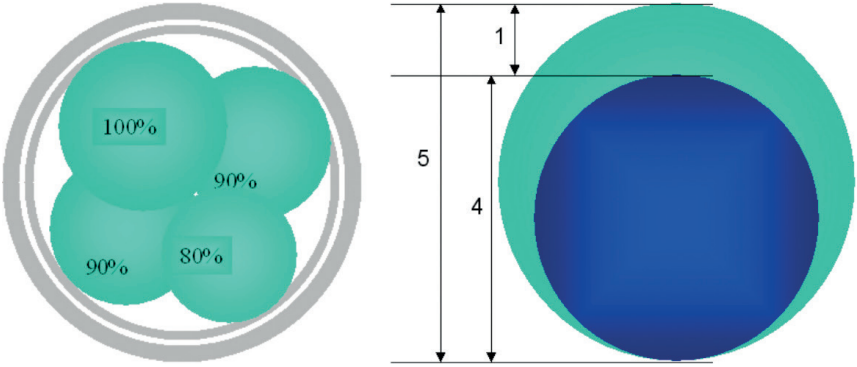


Figura 4. Relación de diámetros según esquema propuesto por Hardarson (Hardarson et al., 2001).

Imagen 36. (A) relación del 16% entre blastómeros; (B) relación del 24% entre blastómeros.

Por lo tanto, en los estadios de 3, 5, 6 y 7 células, el tamaño de los blastómeros sería compatible con un embrión estadio-específico cuando se manifiesta de la siguiente forma:

3 Células → 2 pequeñas + 1 grande
5 Células → 2 pequeñas + 3 grandes
6 Células → 4 pequeñas + 2 grandes
7 Células → 6 pequeñas + 1 grande

Otras combinaciones de tamaños implican divisiones asimétricas con distribución anómala del citoplasma entre las dos células resultantes; ver figura 5.

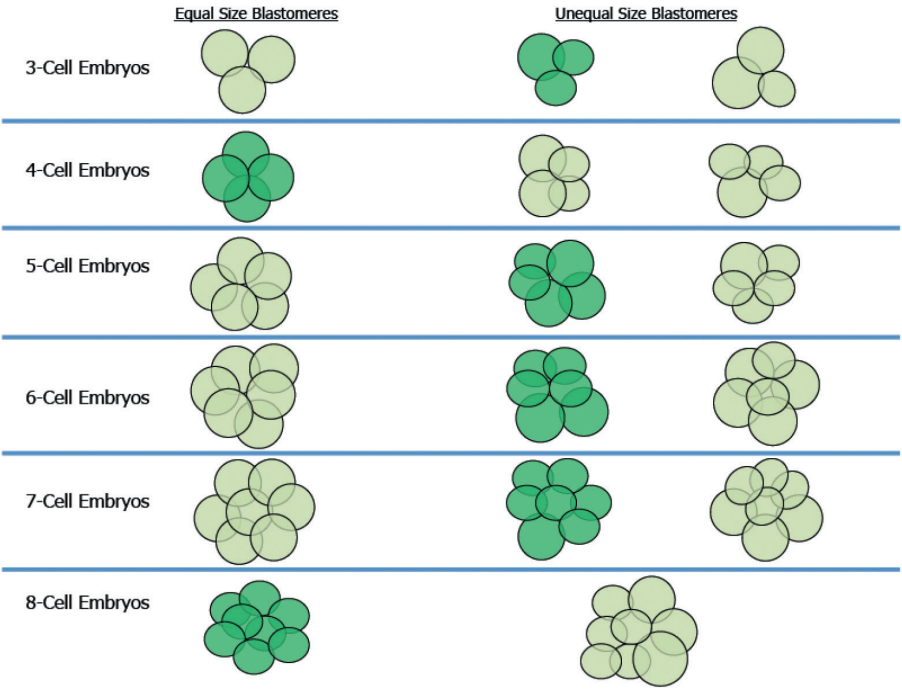


Figura 5. Diagrama que ilustra el concepto de patrones de división «Estadio-específicos» (coloreados en verde oscuro) versus «No estadio-específicos» (coloreados en verde claro) a partir de 3 células. Como se observa, la relación adecuada de tamaños celulares coincide con la igualdad de tamaño de blastómeros sólo en los casos de 4 y 8 células (Imagen cedida por la European Society of Human Reproduction and Embryology). Esta imagen aparece en el capítulo: "The Cleavage Stage Embryo" (Prados et al., 2012) del «Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos» (Magli et al., 2012).

En cuanto a la categorización, a pesar de que la norma general sea que la simetría sólo es valorable en estadios de 2, 4 y 8 células, y que la desviación de la normalidad en esos estadios motiva la clasificación del embrión como C, podríamos resaltar algunos casos particulares, como el de los embriones con 3 células iguales en D+2, a los que se adjudica la categoría D. Los embriones de 7 células en D+3, cuya simetría esté en desacuerdo con lo esperado en un embrión estadio-específico (6 células pequeñas y una grande), no deberían ser clasificados como grado A, sino como grado B. Sin embargo, no se dispone de evidencia suficiente como para clasificar como grado C los embriones de 5 células en D+2 no estadio-específicos. Para los embriones clasificados dentro de la misma categoría morfológica, y en ausencia de otra característica diferenciadora, se recomienda que los embriones estadio-específicos tengan preferencia en la selección frente a sus equivalentes no estadio-específicos.

Visualización de núcleos y grado de multinucleación

La visualización de los núcleos en la práctica diaria en los laboratorios de reproducción asistida es un procedimiento que debe seguir siendo considerado de gran importancia en la valoración morfológica de los embriones.

Además, se ha observado que la visualización de un núcleo único por blastómero es un buen predictor del potencial de implantación (Moriwaki et al., 2004; Saldeen and Sundström, 2005).

La multinucleación se define como la presencia de más de un núcleo en al menos uno de los blastómeros de un embrión (Jackson et al., 1998; Staessen and Van Steirteghem, 1998; Van Royen et al., 2003; Elder and Cohen, 2007); se puede evaluar en diferentes momentos del desarrollo embrionario, desde 2 células hasta el día 3 del desarrollo (D+3); ver imagen 37.

Se observa con más facilidad en el estadio de 2 células (Balakier and Cadesky, 1997). A partir del D+3 es más difícil la visualización de los núcleos, debido al tamaño menor de los blastómeros y al número mayor de células (Van Royen et al., 2003; Parriego et al., 2013), pero es posible hacerlo mediante movimientos secos de la platina, para que el embrión gire y permita observar tanto la multinucleación como la uninucleación.

La presencia de multinucleación es frecuente, pero la incidencia varía mucho en los distintos estudios, existiendo incluso variaciones significativas entre observadores (Paternot et al., 2009).

Numerosos trabajos han mostrado que la observación de la nucleación y en particular de la multinucleación es un parámetro de alto valor predictivo de la viabilidad de un embrión (Jackson et al., 1998; Pelinck et al., 1998; Van Royen et al., 2001, 2003; Meriano et al., 2004; Cuadros et al., 2011).

Imagen 37. (A) micronucleación; (B) binucleación. Las flechas indican la posición de los núcleos/micronúcleos.

Se observan dos tipos de multinucleación:

- Binucleación (bn): 2 núcleos por célula.
- Multi/micronucleación (mn): más de 2 núcleos por célula.

Estas dos alteraciones podrían tener orígenes distintos (Meriano et al., 2004), lo que afectaría de distinta forma al potencial de implantación. Según Meriano et al. (2004), la tasa de implantación de los embriones con células micronucleadas sería menor que la de los embriones con células binucleadas.

La multinucleación podría deberse a alteraciones en la formación de la membrana nuclear (Webster et al., 2009), a roturas de DNA o mitosis imperfectas (Norppa and Falck, 2003), al mal funcionamiento del huso mitótico o a que se haya producido una cariocinesis sin citocinesis (Pickering et al., 1995).

La multinucleación suele ir asociada a otros parámetros de mal pronóstico, como un porcentaje alto de fragmentación y blastómeros con división desigual, así como una tasa menor de formación de blastocistos (Balakier and Cadesky, 1997; Jackson et al., 1998; Hnida et al., 2004; Yakin et al., 2005). Además, según diversos autores, los embriones multinucleados presentan un número mayor de alteraciones cromosómicas (Grifo et al., 1990; Pickering et al., 1995; Hardarson et al., 2001; Munne, 2006; Agerholm et al., 2008; Parriego et al., 2013) y una mayor tasa de abortos (Jackson et al., 1998; Scott et al., 2007; Fauque et al., 2013). Sin embargo, en algunos estudios se muestran casos de implantación y nacidos vivos a partir de embriones multinucleados (Elder and Cohen, 2007; Parriego et al., 2013).

Por otro lado, el consenso de Estambul de valoración embrionaria de las asociaciones ESHRE y ALPHA recomienda no seleccionar los embriones multinucleados para la transferencia si hay algún otro embrión disponible (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011).

Se transfieren pocos embriones multinucleados, ya que tanto las sociedades científicas como la mayor parte de los modelos de clasificación embrionaria lo desaconsejan; y aunque se han publicado nacimientos de niños sanos (Elder and Cohen, 2007; Fauque et al., 2013), los datos no son suficientemente significativos.

Impulsados por el planteamiento de algunas controversias en la clasificación de ciertos embriones binucleados o multinucleados, el Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR realizó un estudio multicéntrico en el cual se observa que determinados casos de binucleación en D+2 o en D+3 no parecen afectar a la tasa de implantación, siempre y cuando los embriones presenten un desarrollo embrionario óptimo (datos no publicados). Con estos datos no podemos concluir que la multinucleación sea inocua para el desarrollo embrionario, sin embargo aparentemente la tasa de implantación se ve menos afectada cuando la binucleación se presenta aisladamente en embriones con buen desarrollo embrionario (categoría A) que cuando se presenta asociada a otros parámetros de mal pronóstico, como la fragmentación, un ritmo de división subóptimo o la desigualdad en los blastómeros. Basándonos en estas evidencias, en esta edición del Cuaderno los embriones con un desarrollo óptimo y una única célula binucleada en D+2 o bien 1-2 células binucleadas en D+3 serán adscritos a la categoría C.

ANOMALÍAS CITOPLÁSMICAS

Hemos agrupado en el apartado de anomalías citoplásmicas, en concordancia con el trabajo de Prados et al. (2012), una serie de parámetros como el anillo acitoplasmático, la presencia de vacuolas y el *pitting* o moteado, que valoramos a la hora de clasificar los embriones en D+2 y D+3, si bien su valor predictivo en cuanto a las tasas de implantación y de gestación no está actualmente definido.

Anillo acitoplasmático

Se caracteriza porque el citoplasma aparece retraído, dejando un anillo translúcido amplio en la periferia del blastómero. El citoplasma de los blastómeros puede ser oscuro con una granulosidad centralizada asociada a un halo cortical más claro. El anillo acitoplasmático se relaciona con un proceso de pérdida de proteínas regulatorias y mitocondrias que son eliminadas en forma de fragmentos. Se ha sugerido que estos embriones tienen un reducido potencial de implantación o terminan degenerando (Veek, 1999c) ya que las células afectadas pierden la habilidad de dividirse y los embriones que lo presentan tienen

comprometido su desarrollo posterior (Van Blerkom, 2007); ver imagen 38.

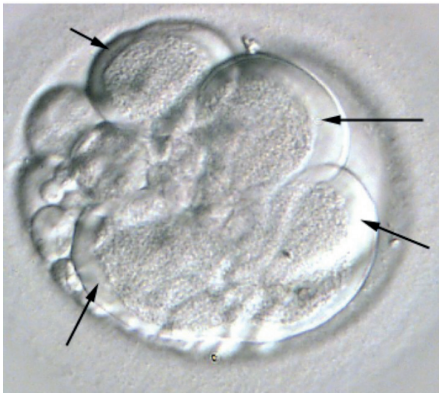


Imagen 38. Anillo acitoplasmático. Las flechas indican algunas zonas con esta característica.

Presencia de vacuolas

La aparición de pocas vacuolas de tamaño menor a 5µm de diámetro no parece comprometer el desarrollo del embrión (Veeck, 1999b), sin embargo, en casos de vacuolización extensa, puede ser perjudicial sobre todo para su desarrollo espacial (Prados et al., 2012); ver imagen 39.

Durante el desarrollo embrionario se ha observado una menor vacuolización espontánea en D+2 y D+3, y un pico elevado de vacuolización espontánea en embriones en D+4, coincidiendo con la compactación embrionaria, lo cual se ha relacionado con una mala calidad de los blastocistos. En D+5 la mayoría de las vacuolas están localizadas en el trofoectodermo; se piensa que esto podría ser una estrategia del propio embrión para minimizar el efecto negativo que tendría la vacuolización sobre la masa celular interna (Ebner et al., 2005a). Es difícil cuantificar el grado de afectación por vacuolas que presenta un embrión, ya que no sólo varía el número sino también el tamaño de éstas.

El Grupo de Interés de Embriología de ASEBIR, con el objetivo de cuantificar la influencia de la formación de vacuolas, realizó un estudio a través de una encuesta

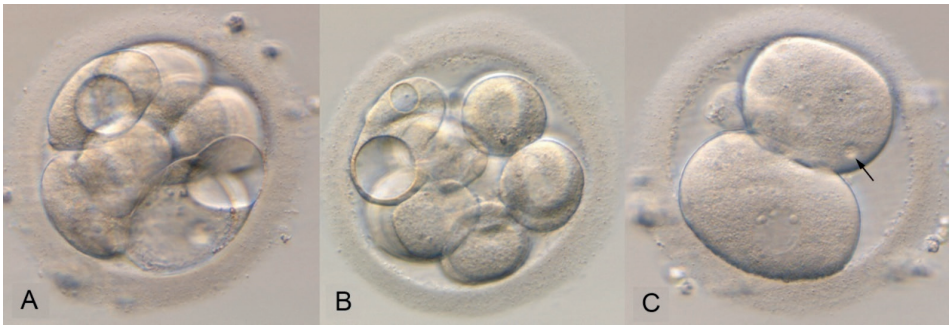


Imagen 39. (A); (B) presencia de vacuolas grandes (>14µm) en menos del 50% de los blastómeros del embrión; (C) Embrión con una vacuola pequeña de aproximadamente 5µm (flecha).

(datos no publicados). Aunque disponemos de pocos casos, del resultado obtenido se deduce que la tasa de implantación no parece estar afectada cuando se observan vacuolas en la mitad o menos de los blastómeros del embrión y siempre que estos presenten un buen desarrollo embrionario. Dado el escaso número de datos y la controversia sobre la distinta influencia del tamaño y el número de vacuolas, así como de su localización en uno o en varios blastómeros, hemos llegado a un consenso para realizar esta propuesta de categorización embrionaria (ver figura 6):

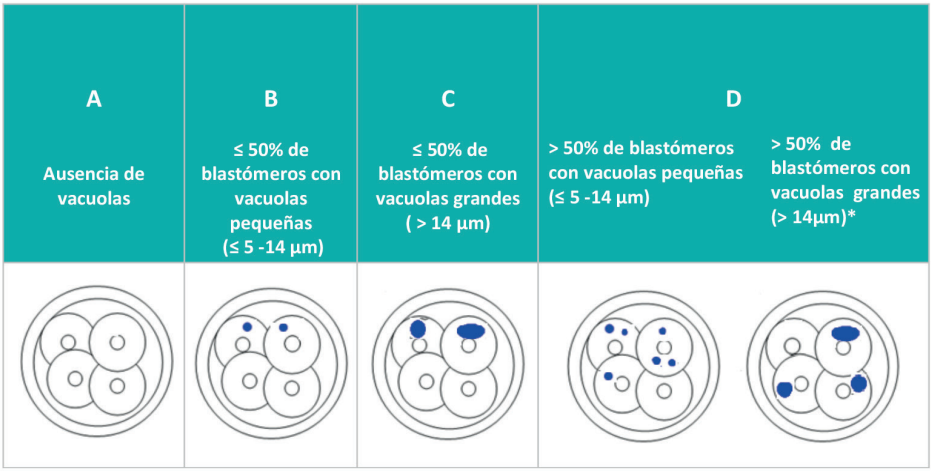
Categorización embrionaria: Presencia de vacuolas

A Ausencia de vacuolas.

B ≤ 50% blastómeros con vacuolas pequeñas.

C ≤ 50% de blastómeros con vacuolas grandes.

D >50% de blastómeros con vacuolas pequeñas y/o grandes.



*Se recomienda que aquellos embriones con más del 50% de blastómeros con vacuolas grandes no deberían ni transferirse ni congelarse, debido a que su tasa de implantación es prácticamente nula

Fig. 6. Esquema de categorización embrionaria en función de la presencia de vacuolas.

Pitting o moteado

Al igual que la adhesión celular, la aparición de este parámetro morfológico indica activación citoplasmática y debe ocurrir en el momento fisiológico de la activación embrionaria en D+3.

El *pitting* se caracteriza por la presencia de pequeñas hendiduras de aproximadamente 1,5 µm en la zona cortical del citoplasma (Biggers and Racowksy, 2002). La apariencia es un moteado en piel de naranja que no ha de confundirse con una extensiva vacuolización (Wiemer et al., 1996; Desai et al., 2000); ver imagen 40.

Imagen 40. Embrión con citoplasma moteado.

En principio se asoció la presencia de este *pitting* a un buen desarrollo del embrión a blastocisto, pero estudios posteriores no han encontrado valor pronóstico respecto a la calidad embrionaria (Rienzi et al., 2003) o a la gestación (Desai et al., 2000). Es más, hay trabajos que indican que las condiciones de cultivo son las que provocan la presencia de *pitting* citoplasmático (Biggers and Racowsky, 2002; Ebner et al., 2005b) llegando incluso, en casos extremos, a relacionarse con una mayor incidencia de abortos clínicos tempranos (Ebner et al., 2005b).

Forma del blastómero

Un blastómero de forma irregular puede sufrir una alteración fisiológica o estar dividiéndose (Goyanes et al., 1990). Se trata de una característica cuya relación con el potencial de implantación es difícil de valorar. En un estudio prospectivo realizado por Guerif et al. (2010), se encontró que los embriones cuyos blastómeros presentaban morfología regular en D+2 mostraban una elevada tasa de formación de blastocistos (73,2%), con respecto a los de forma irregular (58,1%). A pesar de ello, no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de recién nacido vivo (61,8% y 57,8%, respectivamente). Por lo tanto, esta característica no se ha incluido entre los criterios para asignar una categoría a un embrión; ver imagen 41.

Imagen 41. Forma irregular.

Zona pelúcida

Se ha descrito como zona pelúcida sana aquella que tiene una silueta redonda, grosor aproximado de 19,5 ± 2,2µm (Pelletier et al., 2004), que además no es homogéneo, ausencia de doble capa por tabicación interna o septo, ausencia de abultamientos y aspecto translúcido (Goyanes et al., 1990; Veeck, 1999b; Gabrielsen et al., 2001); ver imágenes 42 y 43.

Las anormalidades en la zona pelúcida se relacionan con una baja tasa de implantación, debido probablemente a dificultades en la eclosión (Ruiz et al., 1999; Veeck, 1999c; Gabrielsen et al., 2001; Calderón et al., 2002), aunque debemos distinguir entre anomalías y dismorfismos (ligeras variaciones de la normalidad), los cuales no parecen afectar a las tasas de implantación y nacido vivo (datos no publicados).

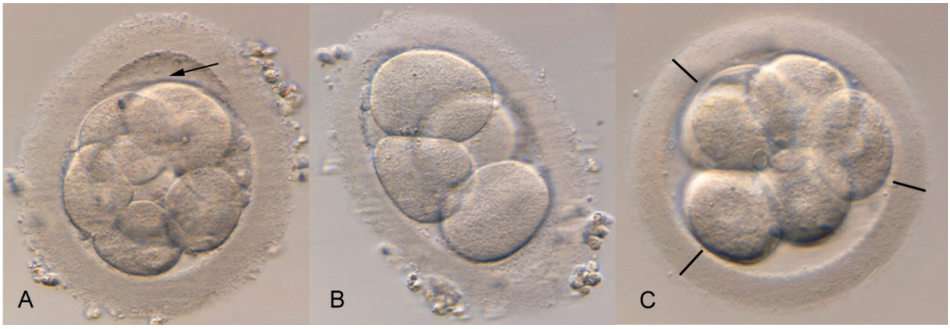


Imagen 42. (A) zona pelúcida septada; (B) zona pelúcida no circular; (C) zona pelúcida demasiado homogénea (las medidas del grosor de la zona pelúcida son muy parecidas).

Imagen 43. (A) zona pelúcida gruesa (>19µm); (B) zona pelúcida oscura.

El embrión en D+3 presenta una zona pelúcida más fina que la del oocito (15,2 ± 2,9µm), principalmente por el afinamiento del estrato externo (Pelletier et al., 2004). Hay poca evidencia en la literatura como para recomendar la medición del grosor de la zona pelúcida. Sin embargo, hay que tener en cuenta que podría tener efectos en algunos pacientes. Por tanto, podría hacerse una observación excepcional teniendo en cuenta su color y grosor (Gu et al., 2010; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011). Para poder medir aproximadamente el grosor de la zona pelúcida, se pueden realizar mediciones del tamaño observado en un monitor conectado al microscopio invertido, con una regla, previa calibración de la medida, o con un *software* específico de análisis de imágenes.

La introducción de la luz polarizada ha permitido observar que los embriones con el estrato interno de la zona pelúcida altamente ordenado son de buen pronóstico, en cuanto al desarrollo hasta el estadio de blastocisto y la implantación (Pelletier et al., 2004; Montag et al., 2008; Ebner et al., 2010).

En conclusión, respecto a la clasificación embrionaria propuesta, las alteraciones leves de la ZP no penalizan negativamente la categoría del embrión. Sólo aquellas características que sean muy evidentes, como grosor excesivo, presencia de septo, forma ovalada o color oscuro, en ausencia de otras alteraciones morfológicas que lo penalicen, le dan al embrión una categoría B.

Grado de compactación/adhesión temprana

La compactación temprana es un signo de activación embrionaria que conlleva un contacto intercelular, la formación de uniones intercelulares y el inicio de la polarización embrionaria (Gardner, 1989; Veeck, 1999c). Se pueden distinguir dos grados de compactación; ver imagen 44.

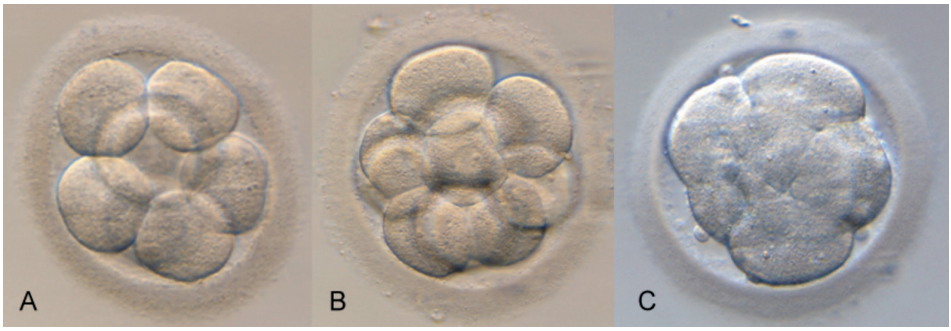


Imagen 44. (A) Embrión sin signos evidentes de inicio de adhesión celular; (B) Embrión con signos de inicio de adhesión celular; (C) Embrión compactado.

Inicio de adhesión: estadio en el que las células se pueden identificar bien por separado, aunque con las membranas adyacentes.

Compactación: estadio en el que es difícil diferenciar los blastómeros entre sí.

La bibliografía consultada no aporta datos suficientes para poder incluir este parámetro en un esquema de clasificación embrionaria, posiblemente por estar muy influenciado por el protocolo y los medios de cultivo utilizados, aunque sí se pueden sugerir algunas recomendaciones en función del grado de adhesión y del día de observación (Wiemer et al., 1996; Desai et al., 2000).

1.3.3. Parámetros en los estadios de D+2 y D+3 incluidos en el sistema de clasificación

Para decidir qué parámetros morfológicos se pueden incluir en el sistema de clasificación embrionaria, se buscaron referencias bibliográficas que confirmaran la relación entre estos parámetros y la tasa de implantación. A pesar de que la revisión reveló una gran variabilidad en los resultados, algunas características morfológicas están claramente relacionadas con la tasa de implantación y pueden formar parte del sistema de clasificación. Del resto de parámetros, por el momento, es posible elegir algunos para proponer recomendaciones para la selección embrionaria.

- Número de células en D+2 según el esquema citado.
- Ritmo de división celular en D+3 según el esquema citado.
- Fragmentación celular según la siguiente gradación, de mejor a peor tasa de implantación:
  - ≤ 10%.
  - > 10 - 25%.
  - > 25 - 35%.
  - > 35%.

- Tamaño de los blastómeros, de mejor a peor tasa de implantación:
  Blastómeros compatibles con su ciclo de división (estadio-específico).
  Blastómeros no compatibles con su ciclo de división (no estadio-específico).

- Visualización de núcleos, de mejor a peor tasa de implantación:
  Presencia de núcleo en todos los blastómeros.
  No visualización de todos los núcleos, pero ausencia de multinucleación.
  Presencia de blastómeros binucleados.
  Presencia de blastómeros multinucleados (>2 núcleos/célula) o con micronúcleos.

- Anillo acitoplasmático en D+3, de mejor a peor tasa de implantación:
  Ausencia de anillo acitoplasmático.
  Presencia de anillo acitoplasmático.

- Vacuolas, de mejor a peor tasa de implantación:
  Ausencia de vacuolas.
  ≤ 50% blastómeros con vacuolas pequeñas.
  ≤ 50% de blastómeros con vacuolas grandes.
  >50% de blastómeros con vacuolas pequeñas y/o grandes.

- Zona pelúcida, de mejor a peor tasa de implantación:
  Zona pelúcida normal.
  Zona pelúcida anormal.

1.3.4. Recomendaciones

Recomendamos la utilización de algunos de los parámetros siguientes para realizar una selección más fina entre embriones de calidad morfológica similar.

Favorables:

- En caso de observación de un número de células diferente de 2, 4 u 8, debe haber 2 patrones de tamaño celular (embriones "estadio-específicos" según el esquema de la pág. 42), correspondientes a una asincronía en la división, pero no a una división asimétrica.
- Presencia de uninucleación en todas las células.
- Inicio de adhesión, siempre que aparezca en D+3 y cuando el embrión tenga 7 u 8 células. Evaluar según protocolo de cultivo.

Desfavorables:

- Compactación muy avanzada en D+3. Evaluar según protocolo de cultivo.
- Inicio de adhesión o de compactación en D+2. Evaluar según protocolo de cultivo.
- 3 células del mismo tamaño en D+2.
- Aquellos embriones con >2 anomalías características de la categoría D, o que no hayan realizado una división celular en 24 horas.

2. Esquema de gradación de la calidad embrionaria en D+2 y D+3

Las diferentes observaciones de un mismo embrión deben aportar información relevante para su clasificación y la asignación de unas probabilidades de implantación que nos sirvan para tomar decisiones respecto a su transferencia o congelación.

De todo lo tratado en este Cuaderno, se puede concluir que no se debe valorar un embrión mediante una observación aislada en un momento puntual de su desarrollo. La categorización debe realizarse tras las múltiples observaciones realizadas a lo largo del desarrollo preimplantacional, respetando los intervalos de tiempo posinseminación establecidos. La valoración de la calidad de un embrión en un momento determinado de su desarrollo debe tener en cuenta los aspectos observados en estadios anteriores. La categorización de ASEBIR, a diferencia de lo que ocurre con otras clasificaciones, tiene en cuenta la evolución previa del embrión antes de llegar al estadio de blastocisto, con lo que solo puede ser un embrión óptimo aquel que ha llevado un desarrollo correcto desde el inicio del cultivo.
No se han incluido en nuestras conclusiones finales las observaciones de la morfología oocitaria y del zigoto debido a la falta de consenso sobre qué características serían relevantes para la valoración de la calidad embrionaria.

Para el sistema de gradación se ha empleado la opción de 4 categorías divididas en función del potencial implantatorio esperado:
Categoría A: Embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.
Categoría B: Embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.
Categoría C: Embrión regular con una probabilidad de implantación media.
Categoría D: Embrión de mala calidad con una probabilidad de implantación baja. Llamamos la atención sobre que, dentro de la categoría D, hay embriones con anomalías diversas, que hacen que su probabilidad de implantación sea prácticamente nula.

La asignación de un embrión a una categoría dependerá de las variables morfológicas que se han relacionado previamente.
El sistema propuesto sólo pretende establecer un sistema de gradación basado en las probabilidades de implantación y de nacimiento de niño vivo de los embriones y, por tanto, la decisión clínica sobre el destino de un embrión de determinada categoría pertenece exclusivamente al laboratorio.
Para realizar la clasificación embrionaria proponemos la siguiente tabla basada en la observación de los embriones entre D+2 y D+3.

2.1. Gradación embrionaria para D+2 y D+3

El embrión se clasifica según su característica más negativa. Al no ser "sumativas", la combinación de varias características propias de un determinado grado no supone penalización adicional.

2.2. Esquemas de gradación propuestos para el trabajo diario

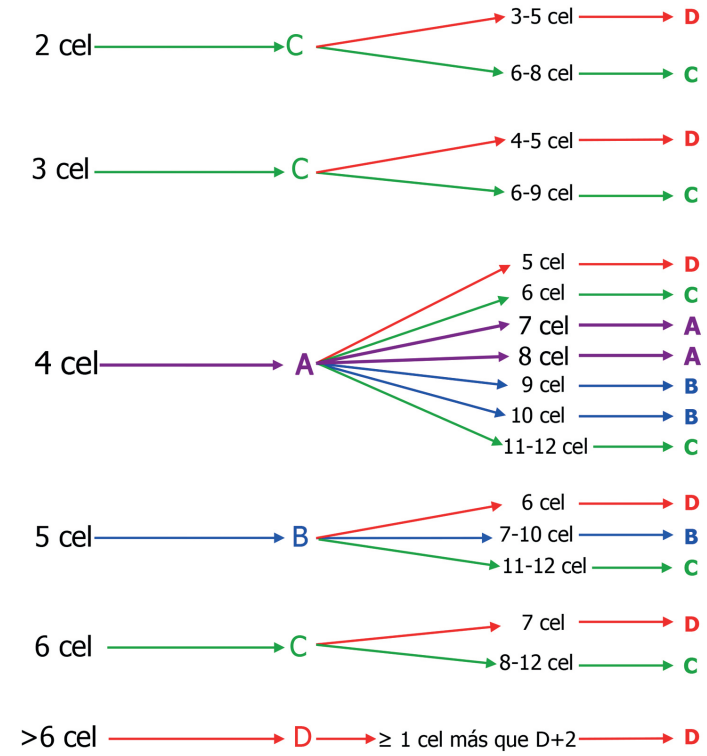
Grado	Día	Nº de células ("→" paso de D+2 a D+3)	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
A	D+2	4	≤10%	estadio-específico	NO	NORMAL
	D+3	7, 8				
B	D+2	5	>10-25%	4→7 células NO estadio-específico en D+3	NO	≤50% células con vacuolas pequeñas, o bien ZP anormal
	D+3	5 → 7 - 10 4 → 9, 10				
C	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	2, 3 → 6 - 9 6 → 8 - 10 6, 11, 12				
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]						

(1) "mn"= Multinucleada. "bn"= Binucleada. Excepción a la regla de que cualquier multinucleación conlleva clasificar como grado D.

(2) Por ejemplo: Anillo acitoplasmático muy evidente en D+3. Las vacuolas se valoran aparte.

(3) Excepción a la regla de no penalización por combinación de varias características negativas.

Ritmo de división



Otras características:

% Fragmentación

A.....≤ 10%

B..... >10-25%

C..... >25-35%

D.....> 35%

Zona Pelúcida

A....normal

B....anormal

Grave alteración citoplásmica ...D

Multinucleación

A.....sin multinucleación

C.....1 cél. bn en D+2 o bien
1-2 cél. bn en D+3. Resto Grado A

D.....Cualquier otra multinucleación

Simetría

A...4(D+2)→8(D+3) Estadio-específico

B...4(D+2)→7(D+3) No estadio-específico

C...4(D+2)→8(D+3) No estadio-específico

D...3 cél. (D+2) No estadio-específico

Vacuolas

A..Sin vacuolas

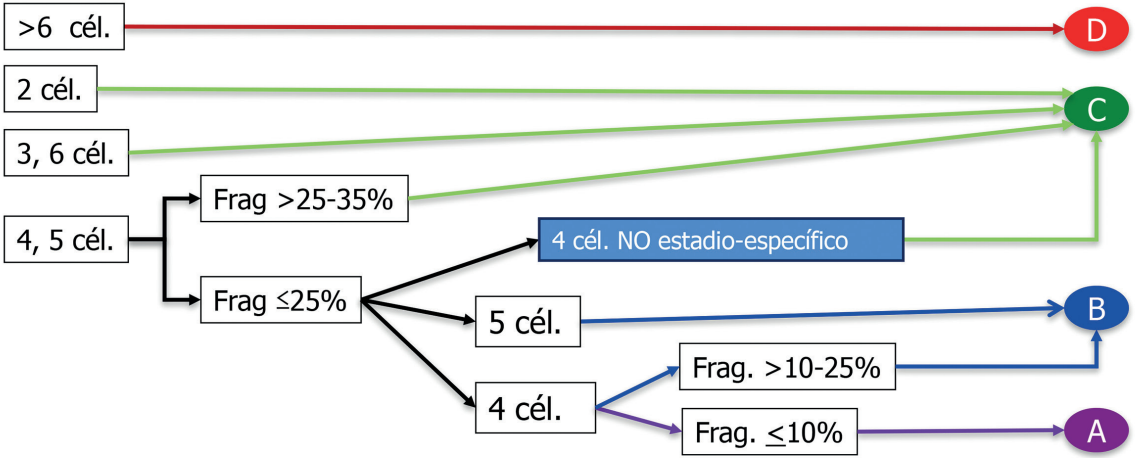
B..≤50% cél. con vacuolas pequeñas

C..≤50% cél. con vacuolas grandes

D..>50% cél. con vacuolas pequeñas

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.

D+2



Modificar asignación a la baja si:

1. Anomalías citoplásmicas:
   - **B**- ≤50% cél. con vacuolas pequeñas
   - **C**- ≤50% cél. con vacuolas grandes
   - **D**- >50% cél. con vacuolas pequeñas

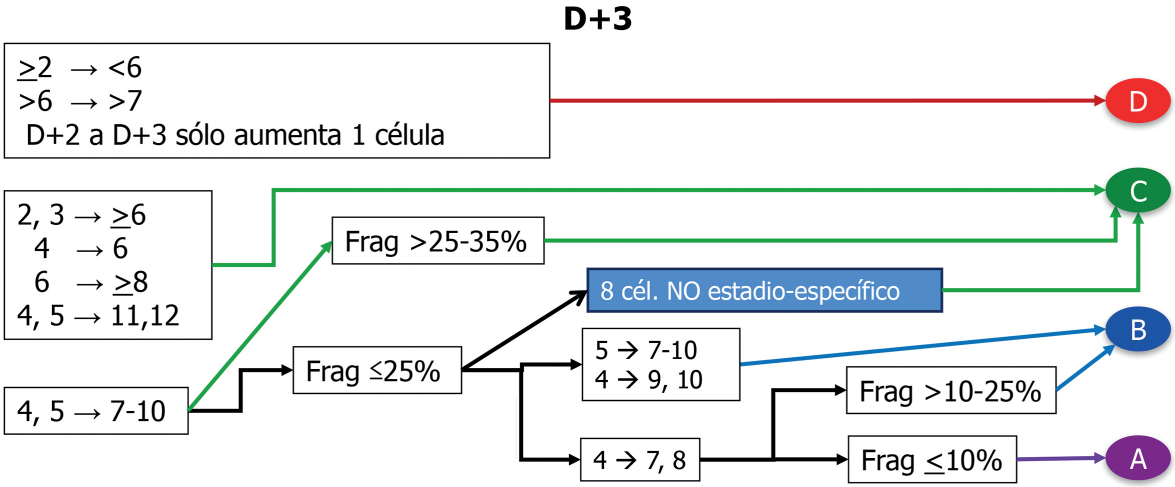
2. ZP anormal: **B**

3. Fragmentación celular:
   - **D**- >35%

4. Multinucleación:
   - **C**- 1cél. bn en D+2 y resto grado A
   - **D**- Otros tipos de mn/bn

5. Simetría celular:
   - **D**- 3 céls. NO estadio-específico

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.



Modificar asignación a la baja si:

1. Anomalías citoplásmicas:
   - **B**- ≤50% cél. con vacuolas pequeñas
   - **C**- ≤50% cél. con vacuolas grandes
   - **D**- >50% cél. con vacuolas pequeñas

2. ZP anormal: **B**

3. Fragmentación celular :
   - **D**- >35%

4. Multinucleación:
   - **C**- 1-2cél bn en D+3 y resto grado A
   - **D**- Otros tipos de mn/bn

5. Simetría celular:
   - **B**- 4 a 7 cél. NO estadio-específico

" → " significa evolución de D+2 a D+3

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. Evaluación morfológica del estadio de mórula al de blastocisto. D+4, D+5 y D+6.

La transferencia en estadio de blastocisto está asociada a elevadas tasas de implantación, debido en gran medida a que permite una mejor selección embrionaria (Gardner et al., 2000). El embrión en estadio de blastocisto presenta una estructura compleja, debido al gran número de células y a la organización de las mismas. Diversos autores han descrito cuáles son los parámetros determinantes de los blastocistos morfológicamente óptimos y que a su vez se correlacionan con altas tasas de implantación (Dokras et al., 1993; Shoukir et al., 1998; Gardner and Schoolcraft, 1999; Balaban et al., 2000; Richter et al., 2001; Racowsky et al., 2003).

La clasificación de ASEBIR, a diferencia de lo que ocurre con otras clasificaciones, propone tener en cuenta la evolución previa del embrión antes de llegar al estadio de blastocisto. Sin embargo, los resultados de un estudio prospectivo realizado por el GIE sobre implantación embrionaria se obtuvieron basándonos sólo en la morfología del blastocisto (datos no publicados). No obstante, y siguiendo con la idea de la clasificación, recomendamos que a igualdad de calidad de los blastocistos se seleccione los embriones en base al histórico de su evolución en D+3 y D+4 (Moragas et al., 2014).

3.1. Intervalo de observación posinseminación en D+4, D+5 y D+6

- D+4: 90-94 horas posinseminación.
- D+5: 114-118 horas posinseminación.
- D+6: 136-140 horas posinseminación.

3.2. Parámetros evaluados en el estadio de D+4

a. División celular.
b. Adhesión celular.
c. Compactación.
d. Fragmentación y vacuolización.

a) División celular.
El embrión óptimo tiene que haber iniciado la 4ª ronda de divisiones mitóticas (>8 células) (Feil et al., 2008; Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011); ver imagen 45.

b) Adhesión celular.
Estadio en el cual las células se pueden identificar por separado, aunque con membranas adyacentes. La adhesión celular es el primer paso en el proceso de la compactación; el embrión muestra los blastómeros con amplias zonas de contacto intercelular. En este momento los blastómeros todavía se pueden diferenciar claramente entre sí. Existe adhesión celular temprana en D+3, que puede ser un factor favorable siempre que el embrión tenga 7 u 8 células. Puede estar influenciado por los protocolos y los medios de cultivo utilizados (Wiemer et al., 1996; Desai et al., 2000).

Imagen 45. Embrión de 16 células sin signos de compactación.

c) Compactación.
Estadio en el que es difícil diferenciar los blastómeros entre sí; visualmente se caracteriza por la apariencia de una masa de células compacta y se pueden identificar los núcleos. La compactación celular se debe a las fuertes uniones estrechas (*tight junctions*) que se forman entre las células, lo que impide que se distingan los contornos de cada una claramente. Una correcta compactación es signo de activación del genoma embrionario (Balaban et al., 2000; Behr et al., 2000; Alikani, 2005). La compactación conlleva un aumento de la adhesión intercelular mediada por uniones adherentes y el inicio de la polarización embrionaria (Gardner, 1989; Veeck, 1999c; Alikani, 2005; Cockbum and Rossant, 2010). En esta situación las células dejan de ser totipotentes, lo que corresponde a un embrión ya especializado.

Según el grado de compactación:

Compactación parcial: afecta solamente a algunas de las células del embrión. Se observan embriones que excluyen células de su compactación; esta pérdida puede ser más o menos importante en función de la proporción de células que quedan excluidas y se correlaciona con el tamaño del embrión resultante; ver imagen 46A.

Compactación total: Afecta a todas las células del embrión. Es completa cuando todas las células están compactadas y visualmente se caracteriza por una masa multicelular; ver imagen 46B. Es incompleta cuando todas las células están iniciando el proceso de compactación pero en distinto grado, pudiéndose distinguir aún algunos blastómeros mientras que otros ya empiezan a formar una masa compacta; ver imagen 46C.

d) Fragmentación y vacuolización. Ambos parámetros son indicativos de inicio de apoptosis pero no hay referencias bibliográficas relativas a D+4 que lo relacionen directamente con

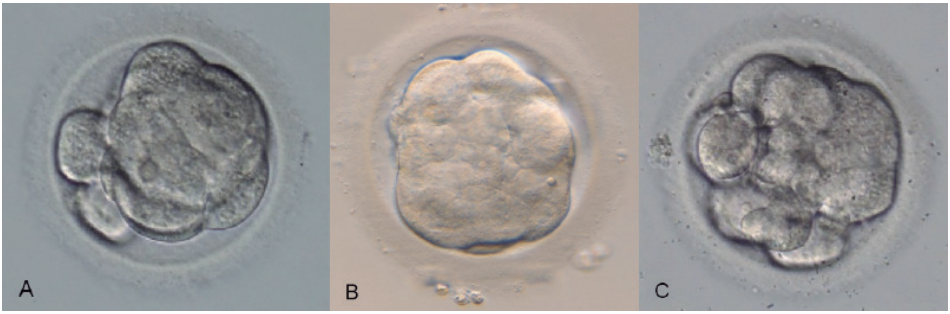


Imagen 46. (A) mórula con compactación parcial; (B) mórula con compactación total completa; (C) mórula con compactación incompleta.

fallos de implantación. Los fragmentos y células que entran en apoptosis no compactan y quedan excluidos fuera del embrión.

Transferencias en D+4

La falta de criterios morfológicos predictivos de embarazo es la principal causa de que no se realice la transferencia embrionaria en D+4 de forma sistemática.

Hay pocas publicaciones y la variabilidad en los criterios de gradación todavía es grande. La mayoría de estudios describen tasas de embarazo e implantación similares a las que se obtienen transfiriendo en D+2 o en D+3 (Kiltz et al., 2003; Pantos et al., 2008).

Estudios más recientes ponen de manifiesto que transferir en D+4 es una alternativa viable a transferir en D+5, sin comprometer las tasas de implantación y embarazo clínico (Skorupski et al., 2007; Feil et al., 2008; Menezes et al., 2010), aunque cuando más de la mitad del embrión está excluido de la compactación el pronóstico implantatorio es más bajo (Tao et al., 2002).

También se postuló que los embriones en estadio de 14-16 células, que no presentaban signos evidentes de compactación, tenían reducida la capacidad de llegar a blastocisto (Veeck and Zaninovic, 2003); pero, contrariamente a lo que se dijo en un primer momento, recientemente se ha constatado que estos embriones tienen capacidad de formar blastocistos viables e implantar en porcentajes aceptables (Feil et al., 2008; Ebner et al., 2009).

3.3. Recomendaciones

La clasificación en D+4 es dinámica; es una continuación de la clasificación morfológica en estadios celulares tempranos.

Es de consenso que el embrión óptimo en D+4 es el que está compactado o compactando y que ha iniciado la 4ª ronda de divisiones mitóticas (>8 células). La compactación debe comprender el total del volumen del embrión.

Atendiendo a los parámetros mencionados anteriormente: división celular, adhesión, compactación total o parcial y anomalías morfológicas de mal pronóstico (excesiva fragmentación, vacuolización), proponemos el siguiente esquema para la categorización de los embriones en D+4 (Tabla IV).

3.4. Gradación embrionaria para 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	
	Compactación parcial	D
D	Cualquier característica	

Cualquier embrión que presente en D+4:
- Fragmentación celular >35%.
- Excesiva vacuolización.
- ≤8 células sin signos de compactación o compactación < 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.

Tabla IV. Gradación embrionaria para D+4.

3.5. Parámetros evaluados en los estadios de D+5 y D+6

Evolución del embrión. Organización del blastocisto

Se considera que un embrión cultivado *in vitro* con buen pronóstico de implantación alcanza el estadio de blastocisto en D+5 o D+6. Este rango varía dependiendo del sistema de cultivo utilizado. Los embriones con un ritmo de desarrollo más lento pueden llegar a este estadio en D+7 o incluso D+8, situación que conlleva peor pronóstico (Khorram et al., 2000; Richter et al., 2001; Shapiro et al., 2001; Kovalevsky et al., 2013). En el blastocisto es preciso diferenciar (ver imagen 47):

- Blastocele.
- Zona pelúcida.
- Masa celular interna (MCI).
- Trofoectodermo polar y mural.

Las ventajas de la transferencia de embriones en estadio de blastocisto son varias; mejor selección embrionaria, mejor sincronía entre el estadio embrionario y el ambiente uterino (Milki et al., 2000), y menor contractibilidad uterina en el momento de la transferencia (Fanchin et al., 2001), aunque otros autores refieren también una mayor incidencia de gemelos monocigóticos (Skiadas et al., 2008), mayores riesgos obstétricos y perinatales (Dar et al., 2014) y mayores riesgos epigenéticos (Marchesi et al., 2012).

El cultivo y transferencia en estadio de blastocisto arroja tasas de gestación y recién nacido vivo mayores a las observadas en las transferencias de embriones en D+3 (Papanikolaou et al., 2006; Styer et al., 2008), por lo que se considera que puede ser una buena herramienta de selección embrionaria, que permite además reducir el número de gestaciones múltiples (Gardner and Schoolcraft, 1999). Los datos publicados en la revisión de Cochrane (Glujovsky et al., 2012) así lo demuestran, mostrando que las tasas de nacido vivo son mejores que las que se consiguen con embriones en estadios más tempranos, aunque la tasa de embarazo clínico acumulada con la descongelación es significativamente más alta en D+2-D+3 que en D+5-D+6, probablemente debido a que en estadios tempranos se congela con más frecuencia y hay menos cancelaciones de las transferencias (Glujovsky et al., 2012).

No todos los embriones son capaces de llegar a la fase de blastocisto. Está descrito que sólo entre el 40% y el 60% de los oocitos fecundados *in vitro* llegan a este estadio (Gardner et al., 1998; Behr et al., 1999), y esta capacidad está relacionada directamente con la morfología que presenta el embrión en estadios más tempranos.

La mayoría de los embriones que tienen un desarrollo correcto alcanzan la fase de blastocisto en D+5, pero algunos embriones sufren un retraso en su desarrollo y consiguen

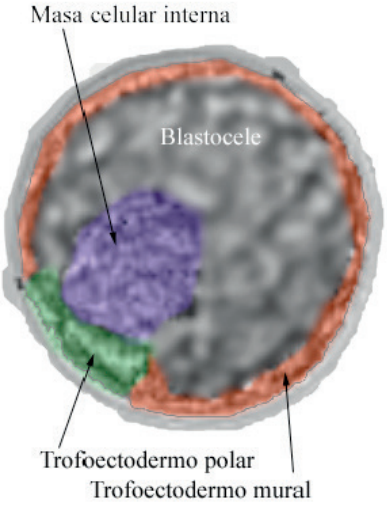


Imagen 47. Morfología del blastocisto.

diferenciarse en blastocistos en D+6 o D+7. Las tasas de implantación de estos embriones son inferiores (Shapiro et al., 2008), pero no despreciables, siendo una posible explicación la desaparición de la ventana de implantación en algunas mujeres en D+6.

Se propone una clasificación muy parecida a la de Gardner (Gardner et al., 1998), donde los parámetros que se tienen en cuenta son: el tamaño, forma y grado de compactación de la masa celular interna (MCI), el grado de expansión del blastocele, y la estructura y número de células del trofoectodermo (TE). El Grupo de Interés de Embriología propuso una clasificación de blastocistos que combinaba el grado de expansión, la calidad de la MCI y la del TE en cuatro categorías: A, B, C y D. Dicha clasificación otorgaba el mismo peso a la MCI y al TE, adjudicando para un blastocisto en el mismo grado de expansión la categoría de valor inferior independientemente de si el defecto procedía de la MCI o del TE. Tras un estudio prospectivo de validación que hemos realizado en el GIE (datos no publicados), se propone una nueva clasificación que consta de 4 categorías: A, B, C y D, que además concuerda con estudios publicados previamente que adjudican mayor relevancia a la morfología del TE respecto a la MCI (Ahlström et al., 2011; Hill et al., 2013).

Grado de expansión del blastocele

El aumento del volumen del blastocele es un parámetro de difícil catalogación, muy dependiente del tiempo; aún más debido a las fases de colapso blastocélico. Si se observa este fenómeno, la valoración del embrión debe posponerse unas horas, ya que el blastocisto colapsado frecuentemente recupera su morfología en escasos minutos. En pocas horas el blastocisto es capaz de expandirse considerablemente, con el consiguiente adelgazamiento de la zona pelúcida; ver imágenes 48 y 49.

La observación de la expansión del blastocele está relacionada con buenas tasas de implantación (Shoukir et al., 1998). Su formación podría relacionarse con un proceso adecuado de maduración trofoblástica, en la que las bombas sodio/potasio-ATPasa adoptan una configuración polarizada hacia el interior del blastocele, favoreciendo la formación de un gradiente de iones de sodio que es compensada mediante el paso de agua a través de las acuaporinas que existen en las células trofoblásticas (Wiley, 1984; Watson, 1992).

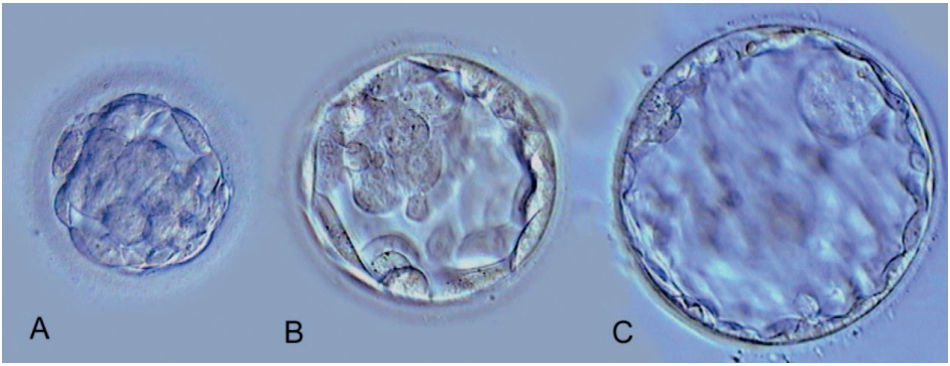


Imagen 48. (A) blastocisto temprano; (B) blastocisto en expansión; (C) blastocisto expandido.

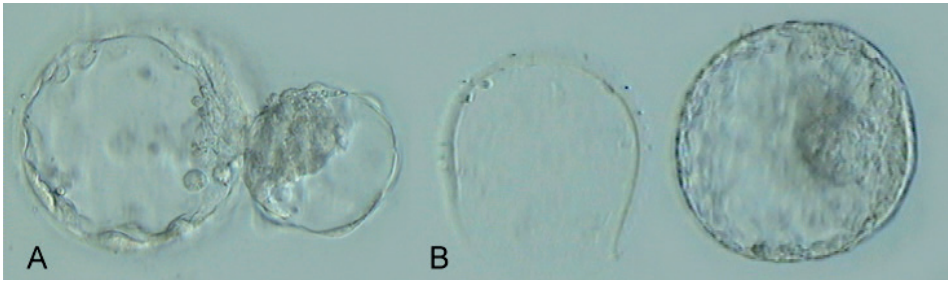


Imagen 49. (A) blastocisto en eclosión; (B) blastocisto eclosionado.

Zona pelúcida

El grosor de la zona pelúcida puede presentar grandes variaciones a lo largo del desarrollo del blastocisto. Con la expansión del blastocele se produce un afinamiento de la misma, alcanzando un grosor mínimo cuando el blastocisto está totalmente expandido y se inicia la eclosión. Algunos autores consideran el adelgazamiento de la zona pelúcida como un factor favorable para la implantación (Balaban et al., 2000; Yoon et al., 2001; Racowsky et al., 2003).

Trofoectodermo (TE)

Esta estructura se caracteriza por presentar una monocapa de células cohesionadas que constituyen la pared del blastocele o cavidad del blastocisto. El número, la forma y el grado de cohesión nos ayudarán a clasificar el blastocisto en las distintas categorías:

- Epitelio homogéneo con células elípticas.
- Epitelio irregular.
- Epitelio irregular con células escasas.

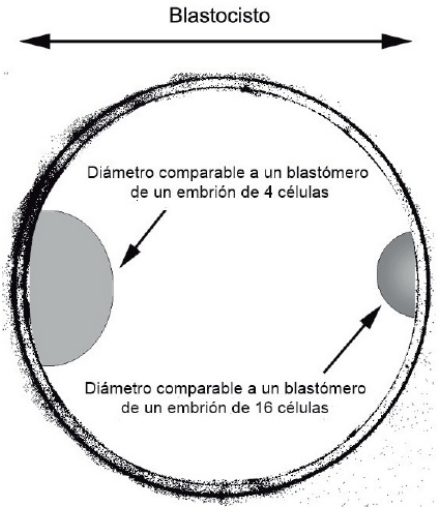


Figura 7. Comparación del tamaño de la MCI con el tamaño de los blastómeros según el estadio de desarrollo.

A pesar de que la calidad morfológica del TE es fundamental para valorar el embrión, los blastocistos con TE subóptimo presentan buenas tasas de implantación, siempre que la MCI tenga una morfología normal (Kovacic et al., 2004; Ahlström et al., 2011; Hill et al., 2013).

Masa celular interna (MCI)

Este es un parámetro importante para definir las distintas categorías de blastocistos, ya que la MCI origina el hipoblasto y el epiblasto, que darán lugar respectivamente a la vesícula vitelina y a los tres linajes celulares, ectodermo, endodermo y mesodermo, además del saco amniótico (Trounson, 2002). La masa celular interna ha de tener una forma ovalada y sus células deben estar compactadas.

El tamaño favorable varía entre 1900 y 3800 μm^2. Tamaños inferiores implicarían un menor potencial implantatorio (Richter et al., 2001). Una MCI de 3800 μm^2 es comparable al tamaño de un blastómero de un embrión en estadio de 4 células; ver figura 7.

Fragmentación y vacuolización

Ambos parámetros son indicativos de inicio de apoptosis, pero no hay referencias bibliográficas que los relacionen directamente con fallos de implantación.

La presencia de vacuolas y la fragmentación son incompatibles con una buena morfología del blastocisto.

3.6. Parámetros en los estadios de D+5 y D+6 incluidos en el sistema de clasificación

Evolución del embrión. Organización del blastocisto, de mejor a peor tasa de implantación:

- Aparición del blastocele en D+5.
- Aparición del blastocele en D+6.
- Aparición del blastocele después de D+6.

Grado de expansión del blastocele:

Cuando el blastocisto está organizado, el blastocele ocupa prácticamente todo el volumen del embrión. Este parámetro se correlaciona favorablemente con la tasa de implantación.

Zona pelúcida, de mejor a peor tasa de implantación:

- Aparece adelgazada en D+5.
- Aparece adelgazada en D+6.

Trofoectodermo, de mejor a peor tasa de implantación:

- Trofoectodermo con epitelio homogéneo y células elípticas.
- Trofoectodermo con epitelio irregular.
- Trofoectodermo con epitelio irregular con células escasas.
- Trofoectodermo con focos degenerativos.

Masa celular interna, de mejor a peor tasa de implantación:

- Tamaño de la MCI de 1900 - 3800 μm^2, con apariencia oval y compactada.
- Tamaño de la MCI de <1900 μm^2, con apariencia diferente a oval y compactada.

Fragmentación y vacuolización:

Su presencia se considera siempre un factor de mal pronóstico.

Gradación de la calidad embrionaria de D+5 y D+6

Los blastocistos de D+5 y D+6 se clasificarán inicialmente de forma independiente, sin tener en cuenta su evolución histórica; ver imagen 50.

Según lo expuesto en la segunda edición del cuaderno de embriología clínica de ASEBIR (ASEBIR, 2008) y el consenso de Estambul (Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology, 2011), la observación del embrión debe realizarse en el intervalo de observación recomendado.

- D+5: 114-118 h posinseminación.
- D+6: 136-140 h posinseminación.

Descripción de la Masa Celular Interna (MCI):

Categoría	Tamaño MCI (μm^2)	Cohesión
A	3800-1900	Compacta
B	3800-1900	No compacta
C	1900	Indiferente
D	Signos de degeneración	
Excluidos	Degenerada	

Descripción del Trofoectodermo (TE):

Categoría	Descripción del Trofoectodermo
A	Homogéneo, cohesionado y muchas células
B	Homogéneo; menos células
C	Pocas células
D	Signos de degeneración
Excluidos	Degenerado

3.7. Recomendaciones

Recomendamos la utilización de algunos de los parámetros siguientes para establecer diferencias entre embriones de calidad morfológica similar.

Favorables:

- Compactación en mórula en D+4.
- Calidad A y B de los embriones en D+3 en el caso de que no se hagan observaciones en D+4.
- Signos de eclosión.

Desfavorables:

- Aparición del blastocisto en D+7.

4. Esquema de gradación de la calidad embrionaria en D+5 y D+6

La morfología que tiene un embrión en estadio de blastocisto no debería ser considerada como un parámetro aislado, tal y como se ha comentado para los estadios anteriores. Por lo tanto, se recomienda que a igualdad de calidad de los blastocistos se seleccione los embriones en base al histórico de su evolución en D+3 y D+4.
La observación del embrión se ha de realizar en el margen horario indicado en el texto.

4.1. Gradación embrionaria para D+5

<table>
<tr><th rowspan="2">D+4</th><th colspan="4">D+5</th></tr>
<tr><th>Grado de expansión</th><th>MCI</th><th>Trofoectodermo</th><th>ASEBIR</th></tr>
<tr><td rowspan="13">Mórula compacta</td><td rowspan="12">Desde:
"Iniciando la expansión"

Hasta:
"Eclosionando"</td><td rowspan="4">A</td><td>A</td><td>A</td></tr>
<tr><td>B</td><td>B</td></tr>
<tr><td>C</td><td>C</td></tr>
<tr><td>D</td><td>D</td></tr>
<tr><td rowspan="4">B</td><td>A</td><td>A</td></tr>
<tr><td>B</td><td>B</td></tr>
<tr><td>C</td><td>C</td></tr>
<tr><td>D</td><td>D</td></tr>
<tr><td rowspan="4">C</td><td>A</td><td>A</td></tr>
<tr><td>B</td><td>B</td></tr>
<tr><td>C</td><td>C</td></tr>
<tr><td>D</td><td>D</td></tr>
<tr><td>D</td><td>A,B,C o D</td><td>D</td></tr>
<tr><td colspan="3">Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)</td><td>C</td></tr>
<tr><td>Mórula no compacta</td><td colspan="3">Mórula</td><td>D</td></tr>
</table>

4.2. Gradación embrionaria para D+6

<table>
<tr><th rowspan="2">D+5</th><th colspan="4">D+6</th></tr>
<tr><th>Grado de expansión</th><th>MCI</th><th>Trofoectodermo</th><th>ASEBIR</th></tr>
<tr><td rowspan="13">Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)</td><td rowspan="13">Desde:
"Iniciando la expansión"

Hasta:
"Eclosionando"</td><td rowspan="4">A</td><td>A</td><td rowspan="2">B</td></tr>
<tr><td>B</td></tr>
<tr><td>C</td><td>C</td></tr>
<tr><td>D</td><td>D</td></tr>
<tr><td rowspan="4">B</td><td>A</td><td rowspan="2">B</td></tr>
<tr><td>B</td></tr>
<tr><td>C</td><td>C</td></tr>
<tr><td>D</td><td>D</td></tr>
<tr><td rowspan="4">C</td><td>A</td><td rowspan="2">B</td></tr>
<tr><td>B</td></tr>
<tr><td>C</td><td>C</td></tr>
<tr><td>D</td><td>D</td></tr>
<tr><td>D</td><td>A,B,C o D</td><td>D</td></tr>
<tr><td colspan="3">Blastocisto temprano o cavitando (ZP gruesa)</td><td>D</td></tr>
<tr><td>Mórula no compacta</td><td colspan="2">Mórula</td><td colspan="2">Excluidos de la Clasificación</td></tr>
</table>

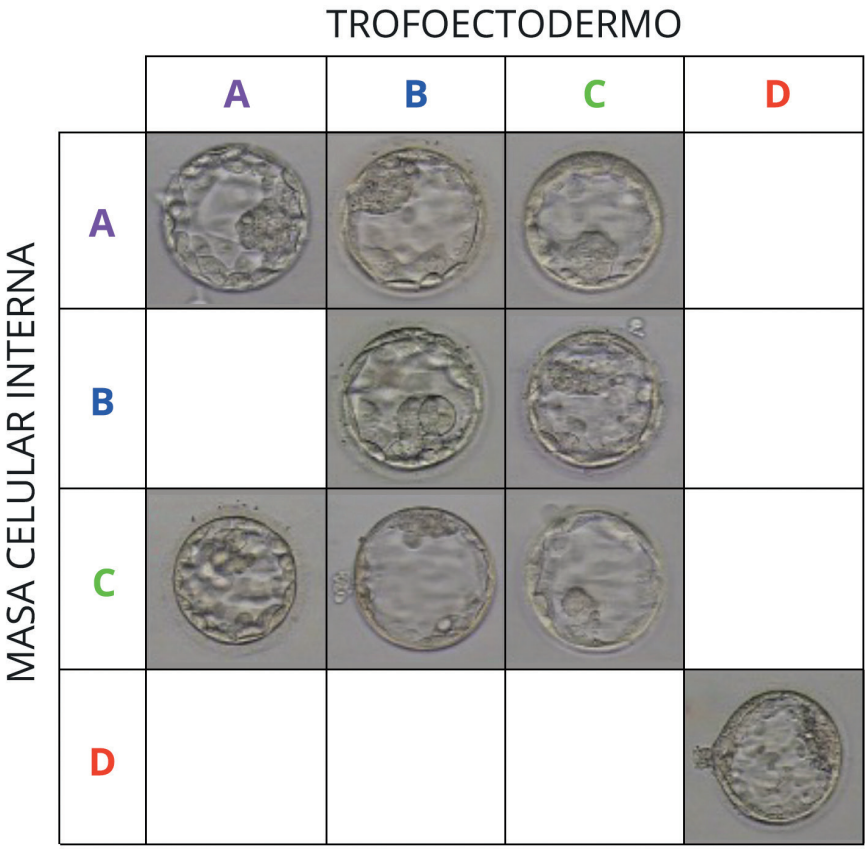


Imagen 50. Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad de la MCI y el TE.

5. Resumen de las recomendaciones.

Valoración morfológica del oocito. D+0

Recomendamos la observación de la zona pelúcida en este estadio.

Desfavorables:

- Acumulaciones de REL.
- Granulosidad central.
- 1erCP gigante (>30µm).
- Vacuolización excesiva.
- Oocitos gigantes: No se deben utilizar.

Valoración morfológica del zigoto. D+1

Favorables:

- La presencia de halo.
- División temprana.

Desfavorables:

- Cualquier estado diferente de 2PN + 2CP.
- Un solo precursor nucleolar en alguno de los PN.
- Pronúcleos separados o de tamaño desigual.
- División directa a 3 células (si se dispone de tecnología *Time-Lapse*).

Descartar:

- 1PN + 1CP.
- 2PN + 1CP, de acuerdo con la Tabla II (pág. 25).
- Más de 2PN.

Valoración morfológica en D+2 y en D+3

Favorables:

- En caso de observación de un número de células diferente de 2, 4 u 8, debe haber 2 patrones de tamaño celular (embriones "estadio-específicos" según el esquema de

la pág. 42), correspondientes a una asincronía en la división, pero no a una división asimétrica.
- Presencia de uninucleación en todas las células.
- Inicio de adhesión, siempre que aparezca en D+3 y cuando el embrión tenga 7 u 8 células. Evaluar según protocolo de cultivo.

Desfavorables:
- Compactación muy avanzada en D+3. Evaluar según protocolo de cultivo.
- Inicio de adhesión o de compactación en D+2. Evaluar según protocolo de cultivo.
- 3 células del mismo tamaño en D+2.
- Aquellos embriones con >2 anomalías características de la categoría D, o que no hayan realizado una división celular en 24 horas.

Parámetros evaluados en el estadio de D+4

La clasificación en D+4 es dinámica; es una continuación de la clasificación morfológica en estadios celulares tempranos.

Es de consenso que el embrión óptimo en D+4 es el que está compactado o compactando y que ha iniciado la 4ª ronda de divisiones mitóticas (>8 células).

La compactación debe comprender el total del volumen del embrión.

Parámetros evaluados en los estadios de D+5 y D+6

Favorables:
- Compactación en mórula en D+4.
- Calidad A y B de los embriones en D+3 en el caso de que no se hagan observaciones en D+4.
- Signos de eclosión.

Desfavorables:
- Aparición del blastocisto en D+7.

6. Recomendaciones generales

- Participar en programas de control de calidad externo que incluyan la valoración morfológica embrionaria.
- Asegurar una variabilidad intralaboratorio mínima, ya sea mediante un control de calidad interno con inclusión de la calidad embrionaria y/o limitando el número de personas encargadas de esta tarea.
- Disponer de sistemas de captación y almacenamiento de imágenes que, además de facilitar el control interno, permitan evaluar posteriormente los embriones sin necesidad de sacarlos del incubador.
- La transferencia en D+3 permite una mayor probabilidad de seleccionar los mejores embriones, respecto de la transferencia en D+2, respetando siempre las horas de observación establecidas.
- Para los embriones clasificados dentro de la misma categoría morfológica, y en ausencia de otras características diferenciadoras, se recomienda que los embriones estadio-específicos tengan preferencia en la selección frente a sus equivalentes no estadio-específicos.
- Los embriones con más de dos alteraciones morfológicas que caracterizan a la categoría D, o que no se han dividido durante 24 horas, no deberían ser ni transferidos ni congelados, debido a que su tasa de implantación es prácticamente nula.
- Utilizar la valoración por categorías descrita en este Cuaderno, que está abierta a nuevas actualizaciones.

7. Referencias bibliográficas

Agerholm IE, Hnida C, Crüger DG, Berg C, Bruun-Petersen G, Kølvraa S, et al. Nuclei size in relation to nuclear status and aneuploidy rate for 13 chromosomes in donated four cells embryos. J Assist Reprod Genet 2008; 25:95-102.

Aguilar J, Motato Y, Escribá MJ, Ojeda M, Muñoz E, Meseguer M. The human first cell cycle: impact on implantation. Reprod Biomed Online 2014; 28:475-484.

Ahlström A, Westin C, Reismer E, Wikland M, Hardarson T. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. Hum Reprod 2011; 26:3289-3296.

Albertini DF, Sanfins A, Combelles CM. Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. Reprod Biomed Online 2003; 6:410-415.

Alikani M. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. Hum Reprod 2005; 20:3369-3375.

Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro. Hum Reprod 2000; 15:2634-2643.

Alikani M, Cohen J. Patterns of cell fragmentation in the human embryo. J Assist Reprod Genet, 1995; 12:28S.

Alikani M, Palermo G, Adler A, Bertoli M, Blake M, Cohen J. Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. Zygote 1995; 3:283-288.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Hum Reprod 2011; 26: 1270-1283.

Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special Interest Group of Embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. Reprod Biomed Online 2011; 22:632-646.

Arce JC, Ziebe S, Lundin K, Janssens R, Helmgaard L, Sørensen P. Interobserver agreement and intraobserver reproducibility of embryo quality assessments. Hum Reprod 2006; 21:2141-2148.

Arroyo G, Santaló J, Parriego M, Boada M, Barri PN, Veiga A. Pronuclear morphology, embryo development and chromosome constitution. Reprod Biomed Online 2010; 20:649-655.

Arroyo G, Veiga A, Santaló J, Barri PN. Developmental prognosis for zygotes based on pronuclear pattern: usefulness of pronuclear scoring. J Assist Reprod Genet 2007; 24:173-181.

ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica II. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2ª ed. Madrid: Gobalo; 2008.

Aydin S, Cinar O, Demir B, Korkmaz C, Ozdegirmenci O, Dilbaz S, et al. Is pronuclear scoring a really good predictor for ICSI cycles? Gynecol Endocrinol 2011; 27:742-747.

Azevedo AR, Pinho MJ, Silva J, Sá R, Thorsteinsdóttir S, Barros A, Sousa M. Molecular cytogenetics of human single pronucleated zygotes. Reprod Sci 2014; 21:1472-1482.

Azzarello A, Hoest T, Mikkelsen AL. The impact of pronuclei morphology and dynamicity on live birth outcome after time-lapse culture. Hum Reprod 2012; 27:2649-2657.

Balaban B, Urman B. Effect of oocyte morphology on embryo development and implantation. Reprod Biomed Online, 2006; 12:608-615.

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Oocyte morphology does not affect fertilization rate, embryo quality and implantation rate after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13:3431-3433.

Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. Fertil Steril 2000; 74:282-287.

Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. Fertil Steril 2006; 85:559-563.

Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. Reprod Biomed Online 2004; 8:695-700.

Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. Hum Reprod 1997; 12:800-804.

Behr B, Fisch JD, Racowsky C, Miller K, Pool TB, Milki AA. Blastocyst-ET and monozygotic twinning. J Assist Reprod Genet 2000; 17:349-351.

Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhart J, Dasig D. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. Hum Reprod 1999; 14: 454-457.

Bielanska M, Leveille MC. Live births from oocytes with smooth endoplasmic reticulum (SER) dysmorphism. 27th Annual Meeting of ESHRE; 2011 Julio 3-6; Stockholm, Sweden. P-105.

Biggers JD, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? Reprod Biomed Online 2002; 5:133-140.

Blake D, Farquhar C, Johnson N, Proctor, M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. The Cochrane collaboration. John Wiley & Sons, Ltd; 2011.

Boada M, Ponsà M. Características morfológicas y ultraestructurales de cigotos y embriones anormales tras FIV/ICSI. Rev Asoc Est Biol Rep 2008; 13(2):26-37.

Brezinova J, Oborna I, Svobodova M, Fingerova H. Evaluation of day one embryo quality and IVF outcome--a comparison of two scoring systems. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7:9.

Bruna I, Pérez Milán F, Tur Padró R, Ricciarelli E, De la Fuente Hernández A, Monzó Miralles A, et al. Embarazo múltiple derivado de FIV-ICSI en España: incidencia y criterios sobre la transferencia embrionaria. Rev Iberoam Fertilidad 2005; 22:99-110.

Calderón G, Prados N, Caligara C, Navarro J, Pellicer A, Remohi J. Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad. En: Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J, editores. Reproducción Humana. 2ª Ed. Madrid. McGraw-Hill Interamericana; 2002. Pp. 463-468.

Carceller R, Sáenz Moreno I, Gracia Cervero E, Bassecourt Serra M, Ureña Hornos T, García-Dihinx Villanova J, et al. Carta al Editor. Triploidía complete 69XXY. An Pediatr (Barc), 2004; 61:562-564.

Castilla JA, Ruiz de Assín R, Gonzalvo MC, Clavero A, Ramírez JP, Vergara F, Martínez L. External quality control for embryology laboratories. Reprod Biomed Online 2010; 20:68-74.

Chen C, Kattera S. Comparison of pronuclear zygote morphology and early cleavage status of zygotes as additional criteria in the selection of day 3 embryos: a randomized study. Fertil Steril 2006; 85:347-352.

Ciotti PM, Notarangelo L, Morselli-Labate AM, Felletti V, Porcu E, Venturoli S. First polar body morphology before ICSI is not related to embryo quality or pregnancy rate. Hum Reprod 2004; 19:2334-2339.

Ciray HN, Aksoy T, Goktas C, Ozturk B, Bahceci M. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media--a sibling oocyte study. J Assist Reprod Genet 2012; 29:891-900.

Ciray HN, Karagenç L, Ulug U, Bener F, Bahceci M. Use of both early cleavage and day 2 mononucleation to predict embryos with high implantation potential in intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril 2005; 84:1411-1416.

Ciray HN, Karagenç L, Ulug U, Bener F, Bahçeci M. Early cleavage morphology affects the quality and implantation potential of day 3 embryos. Fertil Steril 2006; 85:358-365.

Ciray N. Even early cleavage and day 2 embryo score. Reprod Biomed Online 2007; 14:666; author reply 666.

Cockburn K, Rossant J. Making the blastocyst: lessons from the mouse. J Clin Invest 2010; 120:995-1003.

Cuadros M, Andrés Criado L, Sanchez de Burgos M, Morales Morales M, Ricciarelli E, Gómez Palomares JL, et al. Análisis comparativo de las tasas de implantación de embriones mononucleados y embriones multinucleados en D+2. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16:168.

Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update 2014; 20:439-448.

De los Santos MJ, Arroyo G, Busquet A, Calderón G, Cuadros J, Hurtado de Mendoza MV, Moragas M, Herrer R, Ortiz A, Pons C, Ten J, Vilches MA, Figueroa MJ, ASEBIR Interest Group in Embryology. A multicenter prospective study to assess the effect of early cleavage on embryo quality, implantation, and live birth rate. Fertil Steril 2014; 101:981-987.

De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, et al. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. Hum Reprod 2002; 17:2402-2409.

Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. Hum Reprod 2000; 15:2190-2196.

De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, et al. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. Reprod Biomed Online 2005; 11:36-42.

De Sutter P, Dozortsev D, Qian C, Dhont M. Oocyte morphology does not correlate with fertilization rate and embryo quality after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1996; 11:595-597.

Dokras A, Sargent IL, Barlow DH. Human blastocyst grading: an indicator of developmental potential? Hum Reprod 1993; 8:2119-2127.

Ebner T, Balaban B, Moser M, Shebl O, Urman B, Ata B, et al. Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development. Fertil Steril 2010; 94:913-920.

Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Tews G. Morphological analysis at compacting stage is a valuable prognostic tool for ICSI patients. Reprod BioMed Online 2009; 18: 61-66.

Ebner T, Moser M, Shebl O, Sommergruber M, Tews G. Prognosis of oocytes showing aggregation of smooth endoplasmic reticulum. Reprod Biomed Online 2008; 16:113-118.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al. Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. Fertil Steril 2005a; 83(6):1635-1640.

Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Yaman C, Pfleger U, Tews G. First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. Hum Reprod 2002; 17:2415-2418.

Ebner T, Moser M, Tews G. Is oocyte morphology prognostic of embryo developmental potential after ICSI? Reprod Biomed Online 2006; 12:507-512.

Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. Fertil Steril 1999; 72:599-603.

Ebner T, Tews G, Sommergruber M, Moser M. Cytoplasmic pitting has a negative influence on implantation outcome. J Assist Reprod Genet 2005b; 22:239-244.

Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Feichtinger O, Tews G. Prognostic value of first polar body morphology on fertilization rate and embryo quality in intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 2000; 15:427-430.

Edwards RG, Fishel SB, Cohen J, Fehilly CB, Purdy JM, Slater JM, et al. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. J In Vitro Fert Embryo Transf 1984; 1:3-23.

Elder K, Cohen J. Human preimplantation embryo selection. Londres:Taylor-Francis; 2007.

El Shafie M, Sousa M, Windt ML, Kruger TF. An atlas of the ultrastructure of human oocytes. A guide for assisted reproduction. New York: The Parthenon Publishing Group Inc.; 2000.

Emiliani S, Fasano G, Vandamme B, Vannin AS, Verdoodt M, Biramane J, et al. Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. Reprod Biomed Online 2006; 13:255-260.

Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, Olivennes F, Schönauer LM, Frydman R. Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. Hum Reprod 2001; 16:1115-1119.

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; 19:545-549.

Fauque P, Audureau E, Leandri R, Delaroche L, Assouline S, Epelboin S, et al. Is the nuclear status of an embryo an independent factor to predict its ability to develop to term? Fertil Steril 2013; 99:1299-1304.

Feil D, Henshaw RC, Lane M. Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. Hum Reprod 2008; 23:1505-1510.

Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. Hum Reprod 2002; 17:407-412.

Figueira RCS, Ferreira Braga DP, Semião-Francisco L, Madaschi C, Iaconelli A Jr., Borges E Jr. Metaphase II human oocyte morphology: contributing factors and effects on fertilization potential and embryo developmental ability in ICSI cycles. Fertil Steril 2010; 94:1115-1117.

Finn A, Scott L, O'Leary T, Davies D, Hill J. Sequential embryo scoring as a predictor of aneuploidy in poor-prognosis patients. Reprod Biomed Online 2010; 21:381-390.

Fisch JD, Rodriguez H, Ross R, Overby G, Sher G. The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. Hum Reprod 2001; 16:1970-1975.

Gabrielsen A, Lindenberg S, Petersen K. The impact of the zona pellucida thicknes variation of human embryos on pregnancy outcome in relation to suboptimal embryo development. A prospective randomized controlled study. Hum Reprod 2001; 16:2166-2170.

Gámiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simón C, Remohí J, et al. The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. Hum Reprod 2003; 18:2413-2419.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril 2000; 73:1155-1158.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. Fertil Steril 2001; 76:1175-1180.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rate and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil Steril 1998; 69:84-88.

Gardner RL. Cell allocation and lineage in the early mouse embryo. Ciba Found Symp 1989; 144:172-181; discussion 181-186, 208-211.

Gardner RL, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. En: Cansen R, Mortimer D, editores. Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond. Carnforth: The Parthenon Publishing Group Inc.; 1999. Pp. 378-388.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. Fertil Steril 2003; 80:341-349.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo chromosomal complement. Hum Reprod 2007; 22:241-249.

Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update 2008; 14:159-177.

Giorgetti C, Hans E, Terriou P, Salzmann J, Barry B, Chabert-Orsini V, et al. Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. Reprod Biomed Online 2007; 14:85-91.

Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst Rev 2012; 7:CD002118. doi: 10.1002/14651858.CD002118.pub4.

Goyanes VJ, Ron-Corzo A, Costas E, Maneiro E. Morphometric categorization of the human oocyte and early conceptus. Hum Reprod 1990; 5:613-618.

Grifo JA, Boyle A, Fischer E, Lavy G, DeCherney AH, Ward DC, et al. Preembryo biopsy and analysis of blastomeres by in situ hybridization. Am J Obstet Gynecol 1990; 163(6 Pt 1): 2013-2019.

Gu YF, Lu CF, Lin G, Lu GX. A comparative analysis of the zona pellucida birefringence of fresh and frozen-thawed human embryos. Reproduction 2010; 139:121-127.

Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O, et al. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. Hum Reprod 2007; 22:1973-1981.

Guerif F, Lemseffer M, Leger J, Bidault R, Cadoret V, Chavez C, et al. Does early morphology provide additional selection power to blastocyst selection for transfer? Reprod Biomed Online 2010; 21:510-519.

Haggarty P, Wood M, Ferguson E, Hoad G, Srikantharajah A, Milne E, et al. Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. Hum Reprod 2006; 21:766-773.

Hamamah S. Oocyte and embryo quality: is their morphology a good criterion? J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) 2005; 34(7 Pt 2):5S38-5S41.

Hardarson T, Hanson C, Sjögren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. Hum Reprod 2001; 16:313-318.

Hartshorne G, Montgomery S, Klentzeris L. A case of failed oocyte maturation in vivo and in vitro. Fertil Steril 1999; 71:567-570.

Hassan-Ali H, Hisham-Saleh A, El-Gezeiry D, Baghdady I, Ismaeil I, Mandelbaum J. Perivitelline space granularity: a sign of human menopausal gonadotrophin overdose in intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13:3425-3430.

Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM 3rd, Osteen KG, et al. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 1989; 52:801-806.

Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED. Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. Fertil Steril 2013; 99:1283-1289.

Hnida C, Engenheiro E, Ziebe S. Computer-controlled, multilevel, morphometric analysis of blastomere size as biomarker of fragmentation and multinuclearity in human embryos. Hum Reprod 2004; 19:288-293.

Holte J, Berglund L, Milton K, Garello C, Gennarelli G, Revelli A, et al. Construction of an evidence-based integrated morphology cleavage embryo score for implantation potential of embryos scored and transferred on day 2 after oocyte retrieval. Hum Reprod 2007; 22: 548-557.

Hurtado de Mendoza MV. Uso en el laboratorio de la catalogación embrionaria de ASEBIR. Estado actual. Rev Asoc Est Biol Reprod 2011; 16(2): 20-26.

Jackson KV, Ginsburg ES, Hornstein MD, Rein MS, Clarke RN. Multinucleation in normally fertilized embryos is associated with an accelerated ovulation induction response and lower implantation and pregnancy rates in in vitro fertilization-embryo transfer cycles. Fertil Steril 1998; 70:60-66.

James AN, Hennessy S, Reggio B, Wiemer K, Larsen F, Cohen J. The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. Hum Reprod 2006; 21:1599-1604.

Kahraman S, Kumtepe Y, Sertyel S, Dönmez E, Benkhalifa M, Findikli N, et al. Pronuclear morphology scoring and chromosomal status of embryos in severe male infertility. Hum Reprod 2002; 17:3193-3200.

Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, et al. Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 2000; 15:2390-2393.

Keefe D, Liu L, Wang W, Silva C. Imaging meiotic spindles by polarization light microscopy: principles and applications to IVF. Reprod Biomed Online 2003; 7:24-29.

Khorram O, Shapiro SS, Jones JM. Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization. Fertil Steril 2000; 74:163-165.

Kiltz RJ, Woodhouse DJ, Miller DB, Sciera AM, Corona JT. Efficacy of day 4 embryo transfer (ET) in minimizing weekend staffing requirements. Fertil Steril 2003; 80 (Suppl 3): 126.

Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. Reprod Biomed Online 2004; 8:687-694.

Kovalevsky G, Carney SM, Morrison LS, Boylan CF, Neithardt AB, Feinberg RF. Should embryos developing to blastocysts on day 7 be cryopreserved and transferred: an analysis of pregnancy and implantation rates. Fertil Steril 2013; 100:1008-1012.

Lan KC, Huang FJ, Lin YC, Kung FT, Hsieh CH, Huang HW, et al. The predictive value of using a combined Z-score and day 3 embryo morphology score in the assessment of embryo survival on day 5. Hum Reprod 2003; 18:1299-1306.

Leese HJ. Metabolic control during preimplantation mammalian development. Hum. Reprod Update 1995; 1:63-72.

Leese HJ. Quiet please, do not disturb: a hypothesis of embryo metabolism and viability. Bioessays 2002; 24:845-849.

Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K. Early human embryo metabolism. Bioessays 1993; 15:259-264.

Leese HJ, Sturmey RG, Baumann CG, McEvoy TG. Embryo viability and metabolism: obeying the quiet rules. Hum Reprod 2007; 22:3047-3050.

Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. Reprod Biomed Online 2008; 17:385-391.

Levron J, Munné S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J. Male and female genomes associated in a single pronucleus in human zygotes. Biol Reprod 1995; 52:653-657.

Loutradis D, Drakakis P, Kallianidis K, Milingos S, Dendrinos S, Michalas S. Oocyte morphology correlates with embryo quality and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 1999; 72:240-244.

Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. Hum Reprod 2001; 16:2652-2657.

Machtinger R, Politch JA, Hornstein MD, Ginsburg ES, Racowsky C. A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome? Fertil Steril 2011; 95:573-576.

Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. Fertil Steril 2007; 87:534-541.

Magli MC, Jones GM, Lundin K, van den Abbeel E. Atlas of human embryology. Hum Reprod 2012;27 Suppl 1.

Marchesi DE, Qiao J, Feng HL. Embryo manipulation and imprinting. Semin Reprod Med 2012; 30(4):323-334.

Mateizel I, Van Landuyt L, Tournaye H, Verheyen G. Deliveries of normal healthy babies from embryos originating from oocytes showing the presence of smooth endoplasmic reticulum aggregates. Hum Reprod 2013; 28:2111-2117.

Mateo S, Parriego M, Boada M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A. In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2013; 99:897-902.

Menezes J, Sjoblom P, Tristen C, Wrambsby H. Day 4 embryo transfer offers more flexibility in an

IVF program without compromising the outcome. 26th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology; 2010 Junio 27-30; Roma, Italia. O-006.

Meriano JS, Alexis J, Visram-Zaver S, Cruz M, Casper RF. Tracking of oocyte dysmorphisms for ICSI patients may prove relevant to the outcome in subsequent patient cycles. Hum Reprod 2001; 16:2118-2123.

Meriano J, Clark C, Cadesky K, Laskin CA. Binucleated and micronucleated blastomeres in embryos derived from human assisted reproduction cycles. Reprod Biomed Online 2004; 9:511-520.

Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohí J. The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. Hum Reprod 2011; 26:2658-2671.

Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. Hum Reprod Update 2009; 15: 573-585.

Mikkelsen AL, Lindenberg S. Morphology of in-vitro matured oocytes: impact on fertility potential and embryo quality. Hum Reprod 2001; 16:1714-1718.

Milki AA, Hinckley MD, Behr B. Three is a crowd with blastocyst transfer. Fertil Steril 2000; 73(3):15.

Montag M, Köster M, van der Ven K, van der Ven H. Gamete competence assessment by polarizing optics in assisted reproduction. Hum Reprod Update 2011a; 17:654-666.

Montag M, Liebenthron J, Köster M. Which morphological scoring system is relevant in human embryo development? Placenta 2011b; 32 Suppl 3:S252-S256.

Montag M, Schimming T, Köster M, Zhou C, Dorn C, Rösing B, et al. Oocyte zona birefringence intensity is associated with embryonic implantation potential in ICSI cycles. Reprod Biomed Online 2008; 16:239-244.

Montag M, van der Ven H; German Pronuclear Morphology Study Group. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. Hum Reprod 2001; 16:2384-2389.

Montag M, van der Ven H. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. Reprod Biomed Online 2008; 17:454-460.

Moragas M, Torelló MJ, Prados F, Hurtado de Mendoza V, de los Santos MJ, Busquets A, et al. Grupo de Interés de Embriología ASEBIR. Revisión morfológica y categorización embrionaria en D+4. Rev Asoc Est Biol Reprod 2014; 19(2): 26-29.

Moriwaki T, Suganuma N, Hayakawa M, Hibi H, Katsumata Y, Oguchi H, et al. Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei. Hum Reprod 2004; 19:152-156.

Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. Reprod Biomed Online 2006; 12:234-253.

Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, et al. Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. Reprod Biomed Online 2007; 14:628-634.

Munné S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, et al. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. Hum Reprod 1997; 12:780-784.

Munné S, Tomkin G, Cohen J. Selection of embryos by morphology is less effective than by a combination of aneuploidy testing and morphology observations. Fertil Steril 2009; 91:943-945.

Munné S, Wells D. Preimplantation genetic diagnosis. Curr Opin Obstet Gynecol 2002; 14:239-244.

Navarro PA, de Araújo MM, de Araújo CM, Rocha M, dos Reis R, Martins W. Relationship between first polar body morphology before intracytoplasmic sperm injection and fertilization rate, cleavage rate, and embryo quality. Int J Gynaecol Obstet 2009; 104:226-229.

Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. Hum Reprod 2003; 18:1307-1312.

Nicoli A, Capodanno F, Moscato L, Rondini I, Villani MT, Tuzio A, et al. Analysis of pronuclear zygote configurations in 459 clinical pregnancies obtained with assisted reproductive technique procedures. Reprod Biol Endocrinol 2010; 8:77.

Nicoli A, Valli B, Di Girolamo R, Di Tommaso B, Gallinelli A, La Sala GB. Limited importance of pre-embryo pronuclear morphology (zygote score) in assisted reproduction outcome in the absence of embryo cryopreservation. Fertil Steril 2007; 88(4 Suppl):1167-1173.

Norppa H, Falck GC. What do human micronuclei contain? Mutagenesis 2003; 18:221-233.

Otsuki J, Nagai Y, Chiba K. Lipofuscin bodies in human oocytes as an indicator of oocyte quality. J Assist Reprod Genet 2007; 24:263-270.

Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H. The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. Hum Reprod 2004; 19:1591-1597.

Palermo GD, Munné S, Colombero LT, Cohen J, Rosenwaks Z. Genetics of abnormal human fertilization. Hum Reprod 1995; 10 Suppl 1:120-127.

Pantos K, Makrakis E, Chronopoulou M, Biba M, Perdikaris A, Dafereras A. Day 4 versus day 3 embryo transfer: a prospective study of clinical outcomes. Fertil Steril 2008; 89:573-577.

Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, Van Landuyt L, Van Steirteghem A, Devroey P. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. N Engl J Med 2006; 354:1139-1146.

Parriego M, Nadal S, Boada M, Tuñón D, Mateo S, Coroleu B, et al. Evolución y análisis cromosómico de embriones multinucleados. VII Congreso ASEBIR; 2013 Noviembre 20-22; Sevilla, España.

Paternot G, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe TM, Spiessens C. Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos. Reprod Biol Endocrinol 2009; 7:105.

Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. Hum Reprod 1997; 12:532-541.

Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1998; 13:960-963.

Pelinck MJ, Hoek A, Simons AH, Heineman MJ, van Echten-Arends J, Arts EG. Embryo quality and impact of specific embryo characteristics on ongoing implantation in unselected embryos derived from modified natural cycle in vitro fertilization. Fertil Steril 2010; 94:527-534.

Pelletier C, Keefe DL, Trimarchi JR. Noninvasive polarized light microscopy quantitatively distinguishes the multilaminar structure of the zona pellucida of living human eggs and embryos. Fertil Steril 2004; 81 Suppl 1:850-856.

Petersen CG, Oliveira JB, Mauri AL, Massaro FC, Baruffi RL, Pontes A, et al. Relationship between visualization of meiotic spindle in human oocytes and ICSI outcomes: a meta-analysis. Reprod Biomed Online 2009; 18:235-243.

Pickering SJ, Taylor A, Johnson MH, Braude PR. An analysis of multinucleated blastomere formation in human embryos. Hum Reprod 1995; 10:1912-1922.

Picton HM, Elder K, Houghton FD, Hawkhead JA, Rutherford AJ, Hogg JE, et al. Association between amino acid turnover and chromosome aneuploidy during human preimplantation embryo development in vitro. Mol Hum Reprod 2010; 16:557-569.

Pons MC, De los Santos MJ, Múgica A, Vilches MA, Arroyo G, González B, Moragas M, García-Cerrudo E, Figueroa MJ, Prados F, Busquets A, Hurtado de Mendoza MV. Estudio multicéntrico para la validación del criterio de la Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción de valoración morfológica de embriones tempranos en día +3 y su asociación con la tasa de nacido vivo. Med Reprod Embriol Clin 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.medre.2014.10.001

Reprod Embriol Clin 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.medre.2014.10.001

Prados FJ, Debrock S, Lemmen JG, Agerholm I. The cleavage stage embryo. Hum Reprod 2012; 27 Suppl 1:i50-71.

Racowsky C, Combelles CM, Nureddin A, Pan Y, Finn A, Miles L, et al. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. Reprod Biomed Online 2003; 6:323-331.

Racowsky C, Ohno-Machado L, Kim J, Biggers JD. Is there an advantage in scoring early embryos on more than one day? Hum Reprod 2009; 24:2104-2113.

Racowsky C, Stern JE, Gibbons WE, Behr B, Pomeroy KO, Biggers JD. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. Fertil Steril 2011; 95:1985-1989.

Racowsky C, Stern JE, Gibbons WE, Behr B, Pomeroy KO, Biggers JD. National collection of embryo morphology data into Society for Assisted Reproductive Technology Clinic Outcomes Reporting System: associations among day 3 cell number, fragmentation and blastomere asymmetry, and live birth rate. Fertil Steril 2011; 95:1985-1989.

Rama Raju GA, Prakash GJ, Krishna KM, Madan K. Meiotic spindle and zona pellucida characteristics as predictors of embryonic development: a preliminary study using PolScope imaging. Reprod Biomed Online 2007; 14:166-174.

Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST, Shapiro BS. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. Fertil Steril 2001; 76:1157-1167.

Rienzi L, Balaban B, Ebner T, Mandelbaum J. The oocyte. Hum Reprod 2012; 27 Suppl 1:i2-21.

Rienzi L, Ubaldi FM, Iacobelli M, Minasi MG, Romano S, Ferrero S, et al. Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. Fertil Steril 2008; 90:1692-1700.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, et al. Significance of morphological attributes of the early embryo. Reprod Biomed Online 2005; 10:669-681.

Rienzi L, Ubaldi F, Minasi MG, Iacobelli M, Martinez F, Tesarik J, Greco E. Blastomere cytoplasmic granularity is unrelated to developmental potential of day 3 human embryos. J Assist Reprod Genet 2003; 20:314-317.

Rienzi L, Vajta G, Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. Hum Reprod Update 2011; 17:34-45.

Rubio I, Kuhlmann R, Agerholm I, Kirk J, Herrero J, Escribá MJ, et al. Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. Fertil Steril 2012; 98:1458-1463.

Ruiz A, Herrer R, Romero JLl. Calidad y transferencias embrionarias. En: Remohí J, Romero JLl, Pellicer A, editores. Manual Práctico de Esterilidad y Reproducción Humana. Madrid: McGraw-Hill Interamericana; 1999.

Sadowy S, Tomkin G, Munné S, Ferrara-Congedo T, Cohen J. Impaired development of zygotes with uneven pronuclear size. Zygote 1998; 6:137-141.

Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. Hum Reprod 1998; 13:182-187.

Saldeen P, Sundström P. Nuclear status of four-cell preembryos predicts implantation potential in in vitro fertilization treatment cycles. Fertil Steril 2005; 84:584-589.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. Hum Reprod 2003; 18:821-825.

Salumets A, Hydén-Granskog C, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T. The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality. Hum Reprod 2001; 16:2177-2181.

Sathananthan AH. Ultrastructural changes during meiotic maturation in mammalian oocytes: unique aspects of the human oocyte. Microsc Res Tech 1994; 27:145-164.

Scott L. Predicting Embryo Development. En: Rabe T, Diedrich K, Strowitzki T, editores. Manual on Assisted Reproduction. 2º ed. Berlin: Springer; 2000. pp 321-338.

Scott L. Pronuclear scoring as a predictor of embryo development. Reprod Biomed Online 2003a; 6:201-214.

Scott L. The biological basis of non-invasive strategies for selection of human oocytes and embryos. Hum Reprod Update 2003b; 9:237-249.

Scott L, Berntsen J, Davies D, Gundersen J, Hill J, Ramsing N. Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Human oocyte respiration-rate measurement--potential to improve oocyte and embryo selection? Reprod Biomed Online 2008; 17:461-469.

Scott L, Finn A, O'Leary T, McLellan S, Hill J. Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. Hum Reprod 2007; 22:230-240.

Scott LA, Smith S. The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. Hum Reprod 1998; 13:1003-1013.

Sela R, Samuelov L, Almog B, Schwartz T, Cohen T, Amit A, et al. An embryo cleavage pattern based on the relative blastomere size as a function of cell number for predicting implantation outcome. Fertil Steril 2012; 98:650-656.

Serhal PF, Ranieri DM, Kinis A, Marchant S, Davies M, Khadum IM. Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 1997; 12:1267-1270.

Setti AS, Figueira RC, Braga DP, Colturato SS, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Relationship between oocyte abnormal morphology and intracytoplasmic sperm injection outcomes: a meta-analysis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2011; 159:364-370.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R. Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. Fertil Steril 2008; 89:20-26.

Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST. A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. Fertil Steril 2001; 75:1126-1130.

Shaw-Jackson C, Van Beirs N, Thomas AL, Rozenberg S, Autin C. Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? A systematic mini-review. Hum Reprod 2014; 29:1380-1386.

Shen Y, Stalf T, Mehnert C, Eichenlaub-Ritter U, Tinneberg HR. High magnitude of light retardation by the zona pellucida is associated with conception cycles. Hum Reprod 2005; 20:1596-1606.

Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. Hum Reprod 1997; 12:1531-1536.

Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Bischof P, Sakkas D. The rate of development and time of transfer play different roles in influencing the viability of human blastocysts. Hum Reprod 1998; 13:676-681.

Skiadas CC, Missmer SA, Benson CB, Gee RE, Racowsky C. Risk factors associated with pregnancies containing a monochorionic pair following assisted reproductive technologies. Hum Reprod 2008; 23:1366-1371.

Skorupski JC, Stein DE, Acholonu U, Field H, Keltz M. Successful pregnancy rates achieved with day 4 embryo transfers. Fertil Steril 2007; 87:788-791.

Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC. Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. Hum Reprod 1993; 8:221-223.

Staessen C, Van Steirteghem AC. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. Hum Reprod 1997; 12:321-327.

Staessen C, Van Steirteghem A. The genetic constitution of multinuclear blastomeres and their derivative daughter blastomeres. Hum Reprod 1998; 13:1625-1631.

Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum Reprod 1992; 7:117-119.

Styer AK, Wright DL, Wolkovich AM, Veiga C, Toth TL. Single-blastocyst transfer decreases twin gestation without affecting pregnancy outcome. Fertil Steril 2008; 89:1702-1708.

Sundström P, Saldeen P. Early embryo cleavage and day 2 mononucleation after intracytoplasmatic sperm injection for predicting embryo implantation potential in single embryo transfer cycles. Fertil Steril 2008; 89:475-477.

Suzuki K, Yoshimoto N, Shimoda K, Sakamoto W, Ide Y, Kaneko T, et al. Cytoplasmic dysmorphisms in metaphase II chimpanzee oocytes. Reprod Biomed Online 2004; 9:54-58.

Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. Hum Reprod 2002; 17:1513-1518.

Tarín JJ, Pellicer A. Oocyte maturation in human in vitro fertilisation programmes. Ann Acad Med Singapore 1992; 21:492-497.

Tejera A, Herrero J, de Los Santos MJ, Garrido N, Ramsing N, Meseguer M. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. Fertil Steril 2011; 96:618-623.

Ten J, Mendiola J, Vioque J, de Juan J, Bernabeu R. Donor oocyte dysmorphisms and their influence on fertilization and embryo quality. Reprod Biomed Online 2007; 14:40-48.

Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Hum Reprod 1999; 14:1318-1323.

Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, et al. Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. Hum Reprod 2000; 15:1396-1399.

Tomari H, Honjou K, Nagata Y, Horiuchi T. Relationship between meiotic spindle characteristics in human oocytes and the timing of the first zygotic cleavage after intracytoplasmic sperm injection. J Assist Reprod Genet 2011; 28:1099-1104.

Torelló MJ. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos. III Congreso ASEBIR; 2005; Zaragoza.

Trounson A. Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types. Reprod Biomed Online 2002; 4 Suppl 1:58-63.

Van Blerkom J. Occurrence and developmental consequences of aberrant cellular organization in meiotically mature human oocytes after exogenous ovarian hyperstimulation. J Electron Microsc Tech 1990; 16:324-346.

Van Blerkom J. Translocation of the subplasmalemmal cytoplasm in human blastomeres: possible effects on the distribution and inheritance of regulatory domains. Reprod Biomed Online 2007; 14:191-200.

Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. Hum Reprod 2000; 15:2621-2633.

Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 1995; 10:415-424.

Van Blerkom J, Henry G. Oocyte dysmorphism and aneuploidy in meiotically mature human oocytes after ovarian stimulation. Hum Reprod 1992; 7:379-390.

Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. Hum Reprod 2004; 19:2103-2108.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Laureys I, Ryckaert G, Gerris J. Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model. Hum Reprod 2001; 16:326-332.

Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. Hum Reprod 1999; 14:2345-2349.

Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, et al. Multinucleation in cleavage stage embryos. Hum Reprod 2003; 18:1062-1069.

Veeck LL. Preembyo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. En: An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group Inc.; 1999a. pp. 46-51.

Veeck LL. Abnormal morphology of the human oocyte and conceptus. En: An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group Inc.; 1999b. pp. 57-68.

Veeck LL. The cleaving human preembryo. En: An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group Inc.; 1999c. pp. 40-45.

Veeck, LL, Zaninovic N. Human morulae in vitro. En: Veeck LL, Zaninovic N, editores. An Atlas of Human Blastocysts. New York: The Parthenon Publishing Group Inc.; 2003. pp. 61-82.

Verlinsky Y, Lerner S, Illkevitch N, Kuznetsov V, Kuznetsov I, Cieslak J, et al. Is there any predictive value of first polar body morphology for embryo genotype or developmental potential? Reprod Biomed Online 2003; 7:336-341.

Watson AJ. The cell biology of blastocyst development. Mol Reprod Dev 1992; 33:492-504.

Webster M, Witkin KL, Cohen-Fix O. Sizing up the nucleus: nuclear shape, size and nuclear-envelope assembly. J Cell Sci 2009; 122(Pt 10):1477-1486.

Wiemer KE, Garrisi J, Steuerwald N, Alikani M, Reing AM, Ferrara TA, et al. Beneficial aspects of co-culture with assisted hatching when applied to multiple-failure in-vitro fertilization patients. Hum Reprod 1996; 11:2429-2433.

Wiley LM. Cavitation in the mouse preimplantation embryo: Na/K-ATPase and the origin of nascent blastocoele fluid. Dev Biol 1984; 105:330-342.

Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongières C, Nisand I, Gerlinger P. Zygote evaluation: an efficient tool for embryo selection. Hum Reprod 2000; 15:2591-2597.

Wong CC, Loewke KE, Bossert NL, Behr B, De Jonge CJ, Baer TM, et al. Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. Nat Biotechnol 2010; 28:1115-1121.

Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. Hum Reprod 1997; 12:1750-1755.

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; 83:243-245.

Yoon HJ, Yoon SH, Son WY, Im KS, Lim JH. High implantation and pregnancy rates with transfer of human hatching day 6 blastocysts. Fertil Steril 2001; 75:832-833.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. Hum Reprod 1997; 12:1545-1549.

Zollner U, Zollner KP, Hartl G, Dietl J, Steck T. The use of a detailed zygote score after IVF/ICSI to obtain good quality blastocysts: the German experience. Hum Reprod 2002; 17:1327-1333.

Notas

Notas

ASEBIR

Asociación para el Estudio
de la Biología de la Reproducción

JUNTA DIRECTIVA

Montserrat Boada Palá

Mª José Torelló Ybañez

Josep Santaló Pedro

Anna Serra Peruchet

Francisco Javier Vendrell Montón

José Luis De Pablo Franco

Mª Dolores Lozano Arana

Inmaculada Campos Ramírez

Abel Gayo Lana

Enrique Olaya Vila

Laura Marqués Soler

Aránzazu Galán Rivas

CON LA COLABORACIÓN DE:

ANGELINI