



Fundación
J. L. Castaño

Para el desarrollo del Laboratorio clínico

**REPRODUCCIÓN HUMANA
Y LABORATORIO CLÍNICO**

Ed Cont Lab Clín; 32: 54 - 71

SEQC^{ML}

Sociedad Española de Medicina de Laboratorio

2016-2017

EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA

Guadalupe Bueno Rodríguez.

*Laboratorio de Reproducción Humana Asistida. UGC Laboratorios Clínicos.
Complejo Hospitalario Universitario Huelva.*

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de embriología se llevan a cabo las técnicas avanzadas dentro del marco de las Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). La fecundación in vitro (FIV) es un tratamiento ampliamente utilizado dentro del grupo de las TRA. Consiste básicamente en la fecundación del ovocito por el espermatozoide en condiciones de cultivo in vitro, previa obtención y preparación de gametos, y posterior transferencia de los embriones obtenidos a la cavidad uterina. Los embriones que no son transferidos se criopreservan para su uso en posteriores ciclos.

Para obtener el máximo rendimiento con la FIV, es indispensable disponer del mayor número de ovocitos para inseminar, ya que así dispondremos del mayor número de embriones a seleccionar. Para ello se somete a la mujer a un tratamiento de Estimulación Ovárica Controlada que consigue un Desarrollo Folicular Múltiple (DFM), ya descrito en temas anteriores.

El proceso de la fecundación in vitro que se lleva a cabo en el laboratorio de embriología consiste en una serie de procedimientos que precisan de requisitos específicos y condiciones de equipamiento que vienen recogidos en el RD 413/1996, de 1 de Marzo. Recientemente se ha publicado una guía de buenas prácticas: "Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)", Human Reproduction, 2015, en donde se revisa todo el equipamiento necesario. En este tema desarrollaremos los distintos procedimientos que se llevan a cabo en el laboratorio de embriología.

1. PUNCIÓN OVÁRICA, PROCESAMIENTO DEL LÍQUIDO FOLICULAR Y RECOGIDA DE LOS CÚMULOS OVOCITARIOS.

La punción ovárica se realiza en quirófano, a ser posible contiguo al laboratorio de FIV. Consiste en la punción de los folículos ováricos mediante una aguja de punción folicular que va

acoplada a una sonda vaginal ecoguiada. La aguja va conectada a un sistema de aspiración, y a su vez a un tubo estéril donde se recoge el líquido folicular. A los tubos se les añade heparina previo a la recogida del líquido para evitar la formación de coágulos cuando el proceso es muy hemorrágico, también se les puede añadir medio de cultivo para lavado de ovocitos. Una vez se han recogido todos los tubos se llevan a la cabina de flujo laminar calefactada donde se buscan los ovocitos mediante inspección directa en estereomicroscopio. Es importante mantener la temperatura de los tubos a 37°C durante todo el proceso de punción, por ello se debe o bien buscar los ovocitos inmediatamente tras la aspiración o bien mantener los tubos en termobloques calefactados hasta que se termine la punción.

Los materiales necesarios son: tubos para punción, placas de petri para recogida, placas de petri para lavado, medio de cultivo para lavado de ovocitos, pipetas Pasteur de cristal flameadas, jeringas insulina y agujas para deshacer coágulos, estereomicroscopio y cabina de flujo laminar horizontal calefactada y mechero flamear las pipetas.

Una vez tenemos los tubos dentro de la cabina calefactada a 37°C vamos uno a uno, vertiéndolos en placas de petri para la recogida previamente calentadas e inspeccionamos primero macroscópicamente, visualizamos el cúmulo ovocitario (ovocito envuelto por las células de la granulosa) con un aspecto de moco transparente o cúmulo refringente característico que luego se confirma bajo inspección en el estereomicroscopio o lupa (Figura 1). Se debe inspeccionar toda la placa y sobre todo los bordes de la misma puesto que los cúmulos tienden a irse a estos. Una vez localizados el/los ovocitos, se recogen con la pipeta Pasteur y se depositan en la placa de lavado con medio de cultivo. Una vez están todos los ovocitos en la placa de lavado se pasan a otra placa con medio de cultivo para FIV previamente acondicionada (mínimo de 2 horas en el incubador). Los ovocitos ya recuperados se mantendrán dentro del incubador (37° C y 6 % CO₂) hasta el momento de la inseminación.

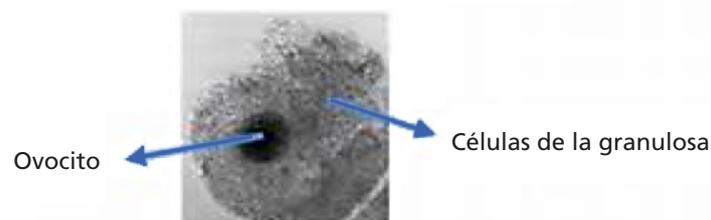


Figura 1: Complejo cúmulo-corona-ovocito.

2. INSEMINACIÓN DE LOS OVOCITOS (DÍA+0)

Llegados a éste punto, tenemos que distinguir entre las técnicas disponibles para realizar la inseminación de los ovocitos y conseguir la fecundación de estos por los espermatozoides, con el fin de llevarlos a cultivo in vitro hasta estadios tempranos de desarrollo embrionario. Disponemos de Fecundación in vitro convencional (FIV) y Microinyección del espermatozoide dentro del ovocito (ICSI) (Figura 2). En función de las indicaciones de la pareja en tratamiento de reproducción asistida, se aplicará una u otra.

- Indicaciones de la FIV: se aplica a parejas con problemas de infertilidad femenina (enfermedad tubárica, endometriosis) y con parámetros seminales normales o moderadamente alterados (oligo, asteno, teratozoospermia moderadas, presencia de anticuerpo antiespermatozoides). Tras fallos de Inseminación Artificial (IA) y en infertilidad no explicada.
- Indicaciones de la ICSI: se emplea en parejas con problemas de infertilidad masculina severa, con parámetros seminales muy alterados (oligo, asteno, teratozoospermia severa). Tras fallos repetidos de IA , tras fallo de fecundación en FIV, en Azoospermias obstructivas o secretoras (se obtienen los espermatozoides de aspiración de epidídimo: o de biopsia de testículo), en sémenes valiosos y en Diagnóstico Genético Preimplantacional (DGP)

La FIV consiste en poner en contacto durante varias horas y en una placa de cultivo los cúmulos ovocitarios (**CCO**) recuperados tras la punción con los espermatozoides, previamente capacitados, de manera que serán los propios espermatozoides (**SPZs**) los encargados de fecundar por si solos a los ovocitos. Para la **inseminación de los ovocitos** con los espermatozoides previamente capacitados tendremos en cuenta los siguientes aspectos:

- Concentración de SPZs a inseminar: 50000-250000 (100000) por ovocito.
- Inseminaremos varios ovocitos juntos (en placas de 4 pocillos) o bien separados uno a uno (en microgotas).
- Tiempo de espera para inseminar: 2-6 h tras punción
- Tiempo de inseminación: 16-18h

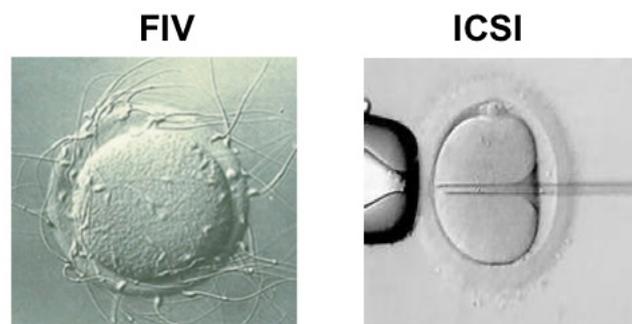


Figura 2: Técnicas de fecundación in vitro.

La ICSI difiere fundamentalmente de la FIV en que se selecciona un SPZ (con mejor morfología y movilidad) y se microinyecta en un ovocito. Este ovocito debe ser primero decumulado (liberado de las células de la granulosa) para así poder visualizar al microscopio su grado de madurez nuclear (valoración de los ovocitos) y segundo microinyectado.

Los materiales y medios necesarios son: placas de 4 pocillos, placas de cultivo en microgotas, placas de microinyección (ICSI), medio de cultivo para lavado de gametos y medio de cultivo para FIV, incubador a 37°C y 5-6 % CO₂, pipetas pasteur estiradas a la llama, microscopio invertido con sistema de micromanipulación adaptado.

1º Decumulación de los ovocitos: se prepara placa de 4 pocillos disponiendo en pocillo 1: hialuronidasa diluida con medio cultivo, pocillos 2,3 y 4 medio cultivo. Los cúmulos que son ricos en ácido hialurónico se pasan al primer pocillo con hialuronidasa mediante una pipeta Pasteur flameada unida a mecanismo de succión manual y, aspirándolos y expulsándolos varias veces se decumula groseramente. En esta solución no deben estar más de un minuto. Luego se pasan los ovocitos al segundo pocillo con medio de cultivo para lavarlos de la hialuronidasa y de aquí al tercer pocillo, en donde los ovocitos están rodeados todavía por algunas células de la granulosa que se irán eliminando mecánicamente con sucesivos pases por pipetas Pasteur estiradas a la llama de diferentes calibres. Una vez eliminadas todas las células de la granulosa, los ovocitos se pasan al cuarto pocillo donde se procederá a su clasificación: (Figura 3)

- **Vesícula germinal (VG):** ovocitos oscuros que se encuentran en profase de la primera división meiótica, se identifica claramente un núcleo en dictiotene llamado vesícula germinal.
- **M I:** son ovocitos inmaduros que se encuentran en estadio de metafase de la primera división meiótica. No se ha extruido todavía el primer corpúsculo polar.
- **Atrésicos o degenerados:** ovocitos deformes, oscuros y sin membrana citoplasmática claramente definida.
- **M - II:** ovocitos en estado preovulatorio que se encuentran en el estadio de metafase de la segunda división meiótica y en los que se observa claramente el corpúsculo polar.



Figura 3: Clasificación de los ovocitos.

Los ovocitos M- II son los se consideran aptos para la microinyección.

2º Microinyección de los ovocitos: una vez se tienen los ovocitos decumulados y los espermatozoides capacitados, se procede a realizar la microinyección. Los pasos a seguir son los siguientes:

- Colocación y alineación de las pipetas en microscopio invertido: se utilizan dos pipetas, una de sujeción o HOLDING y otra de microinyección o ICSI.
- Preparación de la placa de microinyección (placa de ICSI): en esta placa se ponen dos gotas de 5 µl de PVP (polivinilpirrolidona). A la derecha de estas y haciendo una fila se ponen gotas de 5 µl de medio de cultivo tamponado, tantas como ovocitos se vayan a microinyectar. Se cubren todas las gotas con aceite mineral.

- En la placa de ICSI se colocan los ovocitos en las gotas de medio y los espermatozoides en una de las dos gotas de PVP. Se lleva la placa así preparada al microscopio invertido con platina calefactada. Se bajan las pipetas y se aspira una pequeña cantidad de PVP.
- Se busca, captura e inmoviliza un espermatozoide: para ello se introduce la pipeta de microinyección en la gota de PVP limpia y se aspira un pequeño volumen de medio. Se pasa a la gota de PVP con espermatozoides, seleccionar uno con morfología normal e inmovilizarlo mediante un golpe en la cola con la pipeta de ICSI. Se inmovilizan los espermatozoides para evitar que el movimiento del flagelo dañe las estructuras celulares del ovocito y para facilitar la fecundación, ya que con la desestructuración de la membrana del espermatozoide se facilita la descondensación del núcleo de éste y la posterior formación del pronúcleo masculino.
- Se aspira el espermatozoide inmóvil con la pipeta de ICSI preferiblemente por la cola, se aspira con la HOLDING el ovocito y se coloca con el corpúsculo polar en posición de las 6 ó las 12 horarias (para evitar dañar el huso meiótico que suele estar en la porción del citoplasma adyacente al corpúsculo).
- Se acerca la pipeta de ICSI a la zona pelúcida por la zona de las 3 y se aproxima el espermatozoide a la punta de la pipeta. Se presiona el ovocito con la pipeta hasta atravesar la zona pelúcida y se aspira una pequeña cantidad de citoplasma para confirmar que la membrana se ha roto. Se deposita el espermatozoide en el interior del citoplasma del ovocito y se retira la ICSI con suavidad.

Una vez se ha finalizado la microinyección se pasan los ovocitos a placas con medio de cultivo para FIV (medio para desarrollo embrionario desde d+0 hasta d+1) que previamente han sido equilibradas en el incubador.

3. EVALUACIÓN DE LA FECUNDACIÓN (DÍA +1)

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo se procede a la valoración de la fecundación mediante observación directa en microscopio invertido (Figura 4). Se debe realizar ésta observación entre las 16 a 19 horas post-inseminación.

- **Fecundación normal (A):** visualización de dos pronúcleos (con nucleolos en su interior) en el citoplasma del ovocito y de dos corpúsculos polares en el espacio perivitelino.
- **Fecundación anómala (B):** presencia de un único pronúcleo en el citoplasma del ovocito, o de tres o más pronúcleos.
- **No fecundación:** ausencia de pronúcleos en el citoplasma del ovocito.

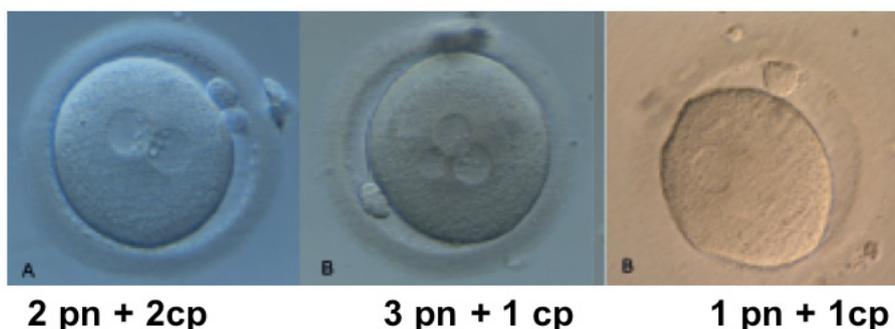


Figura 4: Tipos de fecundación. A: Normal y B: anómala.

Los ovocitos correctamente fecundados se pasan a placa con medio de cultivo nuevo previamente equilibrada en incubador y se dejan hasta el día siguiente (D+2) donde se valorará la división embrionaria.

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*	
> 2 PN	Descartar	

Tabla I: Recomendaciones de cultivo en función del número de corpúsculos y pronúcleos. Tomado de Cuadernos de Embriología clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 3ª Edición, 2015.* En caso de encontrar 2PN + 1CP es preciso descartar el cigoto dado que si no es partenogénesis existe riesgo de diginia, con las implicaciones correspondientes de riesgo fetal (Carceller, 2004).

En esta tabla se representan las recomendaciones de continuar el cultivo o no en función de los pronúcleos y corpúsculos polares observados.

4. CULTIVO EMBRIONARIO Y EVALUACIÓN DE LOS EMBRIONES

Existen medios de cultivo de diferentes casas comerciales, todos ellos se basan en soluciones acuosas estériles con los nutrientes necesarios para cada una de las etapas del desarrollo embrionario y generalmente incorporan un antibiótico para evitar contaminaciones.

Se pueden utilizar dos tipos de métodos de cultivo:

- **Cultivo secuencial:** se basa en utilizar un medio distinto (con diferentes requerimientos en concentraciones de sales, aminoácidos, lactato, piruvato, etc) en función de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el embrión.
- **Etapa I (cultivo corto):** imita las condiciones del microambiente existente en el oviducto durante la fecundación y el desarrollo del embrión hasta que llega al útero (d+0 hasta d+3)

- **Etapa II (cultivo largo):** imita condiciones del microambiente uterino, desde que se produce la activación genómica del embrión (d+3) hasta blastocisto (d+5, d+6 o d+7).
- **Cultivo único:** se basa en que son los gametos o es el embrión los que van utilizando los nutrientes según sus necesidades. Dichos nutrientes están todos en el mismo medio (medio único).

En ambos métodos, las condiciones de cultivo óptimas son: 37 °C y entre 5-6 % de CO₂ en el incubador para gasificar los medios y ajustar el pH. Se puede realizar el cultivo en placas de cuatro pocillos pero preferentemente se hace en microgotas: se preparan placas de cultivo con gotas de 40 µl de medio cubierta con aceite mineral. En cada gota se dispone un embrión para así poder seguir su grado de desarrollo.

El éxito de las TRA depende tanto de la receptividad endometrial como de la calidad embrionaria. Por ello es de gran importancia tanto la preparación del endometrio como la correcta selección embrionaria, la cual consiste en la elección del embrión de mejor calidad y con mayor potencial implantatorio para su transferencia al útero. La capacidad de identificar el / los embriones de mejor calidad implica también poder reducir el número de embriones a transferir sin disminuir la tasa de gestación, acercándonos más a la transferencia de un único embrión y minimizando el riesgo de embarazo múltiple. El método más habitual para valorar la calidad embrionaria es el que se basa en la utilización de los parámetros morfológicos, tales como el número de blastómeras, aspecto de las mismas, presencia de fragmentación, multinucleación, etc. Según sean estos parámetros, el embrión tendrá mejor o peor calidad. De manera clásica, la calidad embrionaria se valoraba fundamentalmente en el segundo o tercer día de cultivo (d+2 y d+3).

Actualmente se siguen los criterios de clasificación morfológica de ASEBIR (Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción) cuyas recomendaciones vienen recogidas en **Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos, 3ª Edición, 2015**. En esta se desarrollan todos los aspectos morfológicos que nos ayudan a identificar los embriones con mayor capacidad de desarrollo y mayor potencial implantatorio, desde el estadio de ovocito, pasando por cigoto, embrión en día 2 y 3 de desarrollo, embrión compactado en día 4 hasta llegar a blastocisto a partir de día 5.

- Intervalo de observación postinseminación en día +2 y día +3:
 - Día +2: 45-47 horas postinseminación
 - Día +3: 67-69 horas postinseminación
- Parámetros evaluados en día +2 y día +3:
 - Número de células y ritmo de división
 - Porcentaje y tipo de fragmentación celular
 - Tamaño de los blastómeros estadio-específico
 - Visualización de los 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:

- Evaluación en d+2: según el número de células se clasifican de mejor a peor tasa de implantación.
 - 4 células
 - 5 células
 - 2,3,6 células
 - 1 o más de 6 células
- Evaluación en d+3: la valoración del embrión en d+3 es dependiente del ritmo de división entre d+2 y d+3

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	<0,0001
3 → >4	3,1 %	3	94	<0,0001
No división o incremento de una cél de D+2 a D+3	<1,5 %	3	63	

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

Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015



Figura 5: Estadios de 2 a 5 blastómeros.

Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

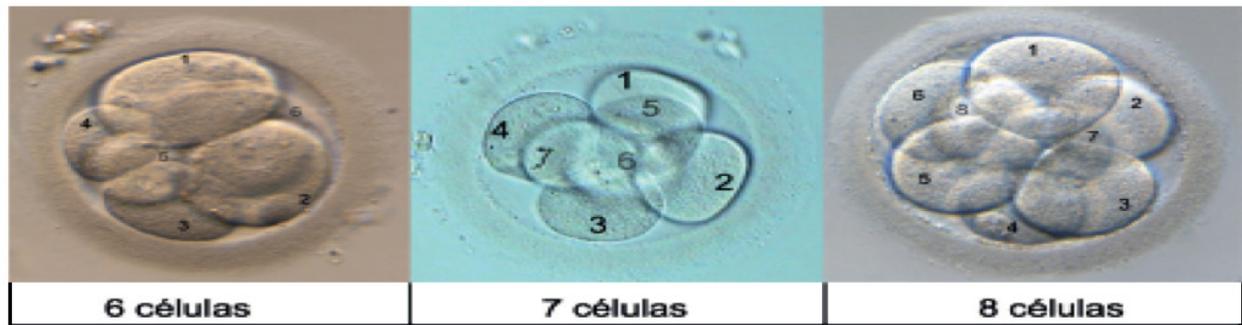


Figura 6: Estadios de 6 a 8 blastómeros.

Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Porcentaje de fragmentación: se establecen 4 categorías de calidad embrionaria de mejor a peor tasa de implantación tanto en d+2 como d+3

- <10% de fragmentos
- 10-25 % de fragmentos
- 25-35 % de fragmentos
- >35 % de fragmentos

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 los núcleos, de mejor a peor tasa de implantación:

- Presencia de un 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/celula) o micronúcleos

Anillo citoplasmático en d+3, de mejor a peor tasa de implantación:

- Ausencia de anillo
- Presencia de anillo

Vacuolas, de mejor a peor tasa de implantación:

- Ausencia de vacuolas
- <50 % de 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



Figura 7: Imágenes de embriones.

Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Con todos estos parámetros se establece una gradación embrionaria en d+2 y d+3, clasificando al embrión en 4 categorías en función del potencial implantatorio:

- 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 de regular calidad con probabilidad de implantación media
- Categoría D:** embrión de mala calidad con probabilidad de implantación baja

Es importante reseñar que no se debe valorar un embrión mediante una observación aislada en un momento puntual de su desarrollo, si no, tras múltiples observaciones realizadas a lo largo del mismo. La valoración de un embrión en un momento determinado debe tener en cuenta los aspectos observados en estadios anteriores.

Un esquema de gradación propuesto para la práctica en el laboratorio sería el siguiente:

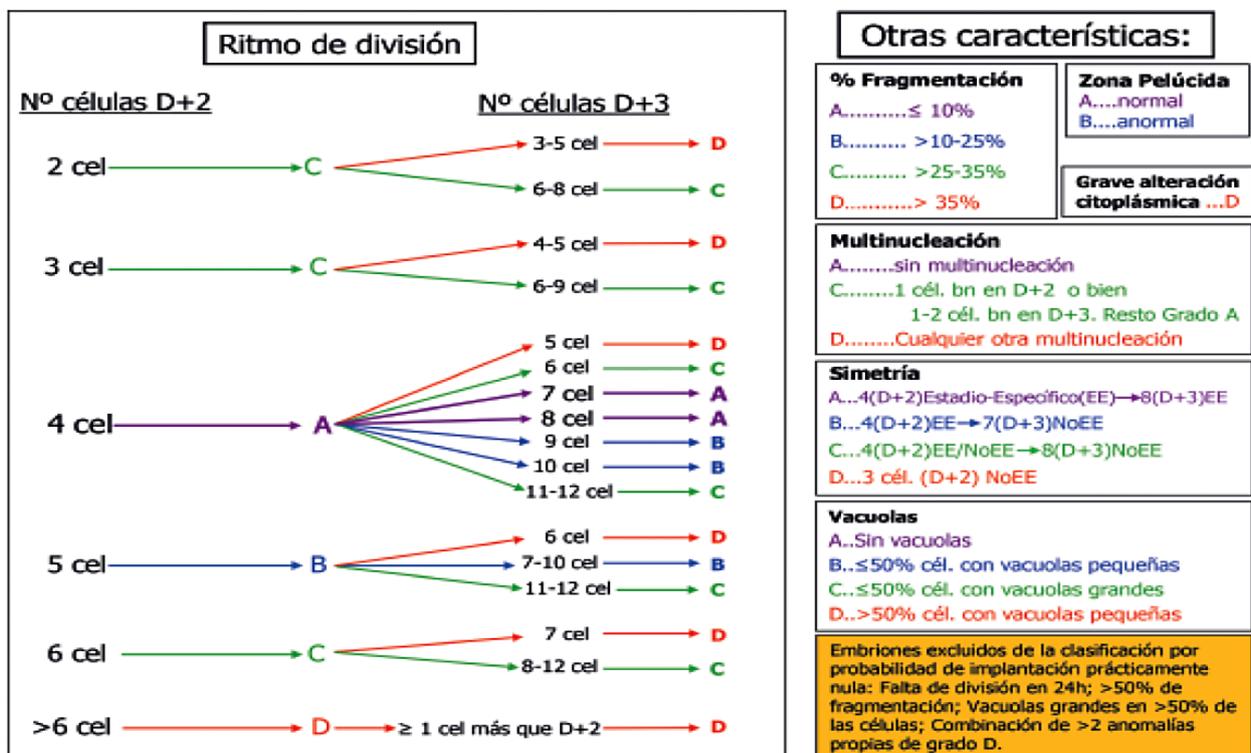


Tabla III. Esquema de gradación propuesto para el trabajo diario. Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Evaluación morfológica del estadio de mórula al blastocisto (día +4, día+5 y día +6)

- Intervalo de observación postinseminación en d+4,+5 y +6
 - Día +4: 90-94 horas posinseminación
 - Día +5: 114-118 horas posinseminación
 - Día +6: 136-140 horas posinseminación
- Parámetros evaluados en día +4
 - División celular
 - Adhesión celular
 - Compactación celular
 - Fragmentación y vacuolización

El **embrión óptimo** es el que está compactado o compactando y ha iniciado la 4ª ronda de divisiones mitóticas (tiene más de 8 células)

La compactación debe comprender el total del volumen del embrión.



⇒ Mórula con compactacion total

Figura 8: Mórula. Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Esquema de gradación en día +4:

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

Cualquier embrión que presente en D+4:

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

→ **D**

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

Tabla IV. Esquema de gradación embrionaria en d+4. Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

– Parámetros evaluados en día +5 y día +6

Se considera que un embrión cultivado in vitro que alcanza el estadio de blastocisto en d+5 o d+6, tiene un alto potencial de implantación. Los parámetros a valorar son:

- Blastocelo
- Zona pelúcida
- Masa celular interna (MCI)
- Trofoectodermo (TE) polar y mural

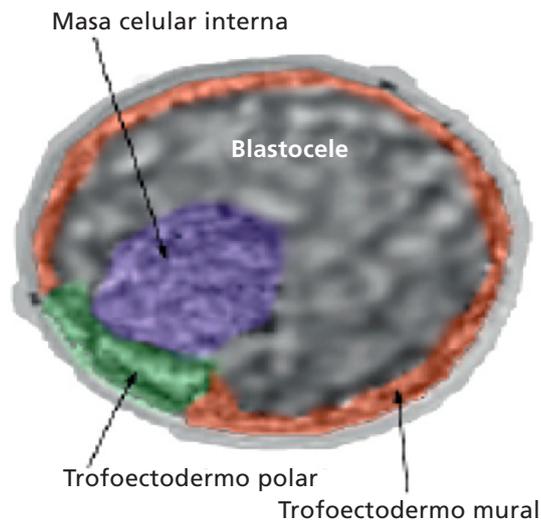


Figura 9: Blastocisto. Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Grado de expansión del blastocelo: cuando el blasto se expande aumenta el volumen del blastocelo o cavidad del blastocisto. La observación de la expansión del blastocelo se relaciona con altas tasas de implantación



Figura 10: (A) blastocisto temprano; (B) blastocisto en expansión; (C) blastocisto expandido. Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Zona Pelúcida: con la expansión del blastocelo se va afinando la zona pelúcida, alcanzando un grosor mínimo cuando el blastocisto está totalmente expandido y se inicia la eclosión

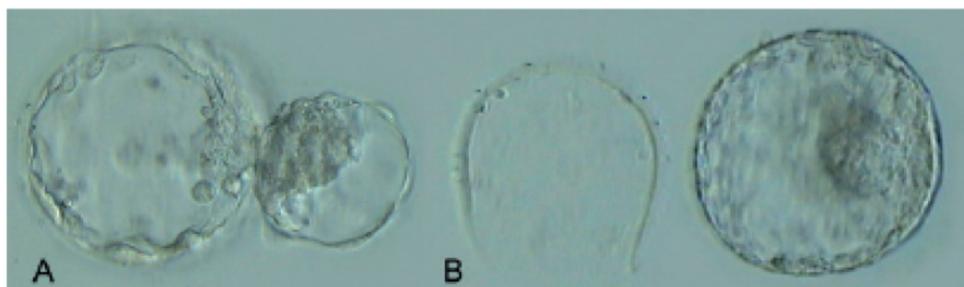


Figura 11: (A) blastocisto en eclosión; (B) blastocisto eclosionado.
Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Trofoectodermo: se caracteriza por presentar una monocapa de células cohesionadas que constituyen la pared del blastocelo. Según el número, forma y grado de cohesión de éstas células se clasifica el blastocisto en distintas categorías:

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

Masa celular interna (MCI): debe tener forma ovalada y sus células deben estar compactadas. El tamaño de la MCI varía entre 1900 y 3800 μm^2 , si es inferior se corresponde con menor potencial implantatorio. Una MCI de 3800 μm^2 es comparable al tamaño de un blastómero de un embrión en estadio de 4 células.

Fragmentación y vacuolización : su presencia se consideran de mal pronóstico.

Los blastocistos se clasifican de manera independiente, sin tener en cuenta su evolución previa. Sólo en casos de igualdad de calidad de los blastocistos se seleccionarán los embriones en base al histórico de su evolución en día +3 y día 4.

		TROFOECTODERMO			
		A	B	C	D
MASA CELULAR INTERNA	A				
	B				
	C				
	D				

Figura 12: Clasificación ASEBIR de los blastocistos en función de la calidad de la MCI y el TE.
Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Gradación embrionaria para D+5

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

Tabla V. Gradación embrionaria D+5.

Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Gradación embrionaria para D+6

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

Tabla VI. Gradación embrionaria D+6.

Tomada de Cuadernos de embriología de ASEBIR, 3ª Edición, 2015.

Recientemente han surgido nuevas tecnologías que aportan información de la cinética embrionaria y permiten una mejor selección de los embriones con mayor capacidad implantatoria. **El sistema de monitorización Time-lapse (TMS)** es una nueva tecnología que permite mantener estables las condiciones de cultivo de los embriones, no hay que extraer los embriones del incubador en ningún momento para analizarlos. El sistema TMS permite la continua evaluación del desarrollo del embrión, a través de un sistema automático que capta imágenes cada 5-20 minutos, sin tener que depender de una observación estática para analizar todo un proceso dinámico. El TMS ha puesto de manifiesto ciertas anomalías del desarrollo embrionario que no se habían visto con el sistema convencional expuesto anteriormente y que deben tenerse en cuenta para realizar la selección embrionaria. La información que proporciona el time-lapse se está integrando en los nuevos sistemas de clasificación embrionaria. Algunos TMS tienen asociado un ordenador que permite hacer anotaciones y comparaciones entre embriones, siendo posible ver toda la secuencia de imágenes en formato vídeo, disponiendo así de mucha más información de la que se tenía hasta el momento. Como resultado de ello, el TMS puede disminuir la variabilidad intra e interobservador.

5. TRANSFERENCIA EMBRIONARIA

La transferencia intrauterina es el último paso de todo el proceso de la fecundación in vitro. La transferencia embrionaria se debe realizar de forma muy meticulosa pues es esencial en el éxito de la FIV ya que la implantación embrionaria se sustenta en tres pilares: el embrión, la receptividad endometrial y la técnica de la transferencia. Se utiliza un catéter de transferencia y de forma ecoguiada para asegurar que la punta del catéter está dentro de la cavidad uterina y a la distancia adecuada (1.5 cm del fondo uterino). Se debe intentar no tocar el fondo uterino y no realizar maniobras bruscas evitando sangrados que disminuyan la posibilidad de implantación.

Un punto clave también es el momento en el que se debe realizar la transferencia: día+2, día +3 o en blastocisto. La transferencia tanto en día +2 como día +3, ofrece prácticamente las mismas tasas de embarazo. **Se transfiere en día +2** cuando se tenga un número limitado de embriones o cuando se tenga un número elevado de embriones de mala calidad y no merezca la pena llevar a cultivo largo. **Se transfiere en día +3** cuando se tengan un número elevado de embriones de buena calidad pues parece que los embriones en día +3 tienen mayor potencial de implantación que en día +2.

La transferencia de embriones en estadio de blastocisto ofrece varias ventajas:

- Mejor selección embrionaria
- Mejor sincronía entre el estadio embrionario y el ambiente uterino
- Menor contractibilidad uterina en el momento de la transferencia

El cultivo y transferencia de blastocisto ofrece mayores tasas de gestación y recién nacido

vivo que la transferencia de embriones en día +3, consiguiendo una mejor selección embrionaria y la reducción del número de gestaciones múltiples.

Finalmente, se debe decidir cuáles y cuantos serán los embriones para transferir. Se decide en función de la calidad de los embriones. El número de embriones a transferir dependerá de la calidad embrionaria, la edad de la mujer, el deseo reproductivo de la pareja, el resultado de transferencias anteriores y se valorarán también los posibles riesgos obstétricos, existencia de enfermedades crónicas, etc.

Habitualmente se realiza transferencia de dos embriones, pero las recomendaciones y la tendencia actual es de realizar **transferencia de un solo embrión** para evitar la gestación múltiple.

Técnica de la transferencia: se colocan encima de la cabina de flujo laminar calefactada a 37°C el catéter de transferencia, jeringa de insulina para la carga y guantes sin polvo unos 10-20 min minutos antes de la transfer para que se atemperen. En el momento en que se vaya a realizar la transferencia, se saca la placa de cultivo con los embriones a transferir del incubador y bajo observación en esteromicroscopio en cabina se realiza el siguiente procedimiento:

- Se confirma identificación de la paciente.
- Se acopla jeringa al catéter y se carga alternativamente columnas de aire y medio: primero aire, luego medio con los embriones (10-20 μ l) y otra vez aire
- Se lleva catéter a la sala de transferencia o quirófano donde se realice la transferencia debiendo transcurrir el menor tiempo posible desde la carga hasta la descarga.
- Por último, se debe confirmar que en catéter como en la vaina externa, no se han quedado adherido los embriones.

6. CRIOPRESERVACIÓN DE LOS EMBRIONES

Se criopreservan los embriones de buena calidad que no han sido transferidos. Así, la congelación del excedente de embriones supernumerarios tras la transferencia en fresco nos permitirá rentabilizar un ciclo de estimulación ovárica y aumentar las tasas de éxito sin tener que volver a comenzar otro ciclo de estimulación. Otras indicaciones para la criopreservación de embriones son:

- Cuando se desaconseje la transferencia en fresco o bien cuando se dé algún impedimento para la transferencia (riesgo de SHO, aparición de pólipos, hidrosalpinx)
- Casos de mala receptividad o insuficiente preparación endometrial.
- Tratamientos de quimioterapia o radioterapia.

Las tasas de gestación con embriones congelados se aproximan hoy en día a las obtenidas con embriones frescos, a lo que ha contribuido en gran medida la optimización de los procedimientos desarrollados en el laboratorio.

Hay dos métodos de criopreservación : lenta y vitrificación. El soporte utilizado en ambos es la pajuela de congelación y se necesitan también agentes crioprotectores, son sustancias químicas que protegen las células de la congelación /descongelación evitando la formación de cristales intracelulares y la deshidratación excesiva. Existen diferentes soluciones de crioprotectores y de diferentes casas comerciales.

- **Lenta** (sólo para embriones)

- **Vitrificación** (embriones y ovocitos)

Hasta hace pocos años los protocolos más utilizados eran los de congelación lenta, para los que se necesitaba un congelador programable y los tiempos de congelación oscilaban entre 90 minutos y 5 horas.

Actualmente, la vitrificación prácticamente ha reemplazado a la congelación lenta ya que, además de que reduce el tiempo de congelación a unos pocos minutos y se alcanzan velocidades de enfriamiento de hasta 25.000°C/minuto, los resultados conseguidos tanto en la tasa de supervivencia embrionaria como en la tasa de implantación y embarazo tras transferencia son mucho mejores.

BIBLIOGRAFÍA

Real Decreto 413/1996, de 1 de Marzo, por el que se establecen los requisitos técnicos y funcionales precisos para la autorización y homologación de los centros y servicios sanitarios relacionados con las técnicas de reproducción humana asistida.

Cuadernos de embriología clínica. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos, 3ª Edición, 2015.

Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015)", Human Reproduction, vol 0, No. Opp.1-9 ,2016.

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.

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.

Manual práctico de esterilidad y reproducción humana . J. Remohi y otros, 2000.

COMISIÓN DE ANDROLOGÍA Y TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Presidenta: Inmaculada García Cobaleda (2013)

Miembros: Guadalupe Bueno Rodríguez, Jose Antonio Castilla Alcalá, Maria Isabel Jiménez García, María Dolores Lozano Arana, Joan de Monserrat Vallvé, José Manuel Moreno Cebeira, Cristina Sánchez Pozo (Coordinadora), Isabel Sánchez Prieto

Residentes: Covadonga de Miguel Fernández-Miranda, Tamara Rodríguez Pérez

ACTIVIDADES FORMATIVAS DEL COMITÉ DE EDUCACIÓN

D. Balsells, B. Battikhi (Residente), R. Deulofeu, M. Gassó, N. Giménez, J.A. Lillo, A. Merino, A. Moreno, A. Peña (Residente), N. Rico, M. Rodríguez (Presidente), MC. Villà.

ISSN 1887-6463 – Marzo 2017 (recibido para publicación Noviembre 2016).