

## 25. Desarrollo embrionario

### CALIDAD EMBRIONARIA

Los resultados de la reproducción asistida dependen de diversos factores, siendo uno de los más importantes la calidad del embrión. Un buen sistema de clasificación embrionario es crucial para:

- Hacer una buena selección del embrión a transferir.
- Estandarizar los tipos de embrión para poder utilizarlo de referencia en los estudios de diferentes centros.
- Reducir los embarazos múltiples, ajustando el número de embriones que se transfieren a la calidad del embrión.
- Permitir la comparación de la calidad de los embriones entre los ciclos de las mismas pacientes.
- Evaluar los distintos métodos de cultivo.

Las principales características morfológicas consideradas en la calidad embrionaria son: número de células (blastómeras), tamaño, forma, multinucleación y porcentaje de fragmentación<sup>(1-3)</sup>. Estos factores han sido combinados de diferentes maneras en las clasificaciones embrionarias para intentar predecir el embarazo. Sin embargo, además de las características que tiene el embrión el día de la transferencia, se deben tener en cuenta otros factores como la morfología de los cigotos y la división temprana (primera división mitótica).

Las características morfológicas (patrón nuclear) en el estadio de cigoto, aunque no determinen la evolución del embrión, ya que son independientes del desarrollo embrionario<sup>(4)</sup>, deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el embrión a transferir. Para ello es necesario trabajar con cultivo individualizado que nos permita seguir el desarrollo de cada embrión. Así el embrión óptimo en D+2 y D+3 debe provenir de un cigoto con buena morfología (pronúcleos centrales, adyacentes y de tamaño similar), teniendo éste una mayor tasa de implantación, embarazo y supervivencia a la descongelación<sup>(5)</sup>.

La división temprana es un indicador de calidad del embrión y su capacidad de desarrollo, ya que estos embriones obtienen mejor clasificación morfológica el día de la transferencia<sup>(6,7)</sup>. La división temprana es también un criterio más para discriminar embriones de la misma calidad<sup>(6)</sup>, lo que nos permite poder escoger el embrión con mayor probabilidad de implantación<sup>(8)</sup>.

Es importante emplear un buen sistema de evaluación que permita efectuar la selección embrionaria con criterios lo más objetivos posibles. De esta manera podrán maximizarse las posibilidades de embarazo, minimizando la frecuencia de embarazo múltiple.	<b>RSAA</b>
La selección del embrión óptimo es la resultante de un proceso evolutivo continuo en el que se valorarán gametos, cigotos, embriones tempranos y tardíos.	<b>RSAA</b>
El cultivo embrionario deberá ser individualizado, con la finalidad de poder seguir el desarrollo de cada embrión por separado.	<b>RSAA</b>
La valoración de los criterios nucleares durante el estadio de cigoto, ayuda a seleccionar embriones que se transfieren en día +2 y +3.	<b>C</b>
La valoración de la calidad del embrión incluye, además, su velocidad de división y sus características morfológicas.	<b>C</b>
Dentro de la valoración de la velocidad de división es importante tener en cuenta la primera división mitótica, que debe producirse entre las 25-27 horas post inseminación o microinyección.	<b>C</b>
El ritmo de división esperado en el embrión es de 2 células a las 25-27 horas, 4 células a las 40-44 horas y 8 células a las 67-71 horas.	<b>C</b>
Los embriones que se dividen lenta o rápidamente no tienen un buen pronóstico respecto a su posibilidad de implantación.	<b>C</b>

### Velocidad de división esperada

#### Día 0

Entre 16 y 18 horas después de la FIV y entre 16 y 20 horas tras ICSI se observa la fecundación normal (2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares).

#### Día +1

Entre 25 y 27 horas en algunos embriones se produce la primera división mitótica, observándose 2 células. Si no es así, el embrión debe tener 2 células a las 30 horas de la FIV o ICSI<sup>(4,9)</sup>.

#### Día +2

Entre 40 y 44 horas después de la fecundación se espera que el embrión de buena calidad se haya dividido en 4 células<sup>(3,4,10-12)</sup>.

### Día + 3

A las 67-71 horas el embrión debe tener 8 células.

Los embriones que se dividen lenta o rápidamente tienen una tasa de embarazo más baja que los que se dividen a un ritmo normal (en día +2: 4 células y en día +3: 7-9 células). Los que se dividen lentamente tienen además mayor incidencia de anomalías cromosómicas<sup>(13)</sup>.

Los embriones con división rápida, 9-10 células o más en día +3, presentan poca capacidad de formar blastocistos normales<sup>(14)</sup>. Además estos embriones también pueden tener altos niveles de aberraciones cromosómicas.

La valoración morfológica del embrión temprano incluye: número, tamaño y forma de las blastómeras, presencia de multinucleación y porcentaje de fragmentos anucleados.

C

El grado de fragmentación se expresa como un porcentaje y se define como el volumen de espacio perivitelino y/o de cavidad ocupado por fragmentos citoplasmáticos enucleados.

La presencia de fragmentos embrionarios compromete su viabilidad<sup>(15)</sup>.

Es importante distinguir una blastómera de un resto citoplasmático. Así Johanson *et al.*, 2003<sup>(16)</sup>, determinan el diámetro regular de las blastómeras en embriones en día 2 y en día 3 (D+2 → 65-70 micras; D+3 → de 55-60 micras), existiendo un diámetro límite por debajo del cual se considera "resto citoplasmático", ya que los fragmentos analizados no muestran material genético. El diámetro límite para el día +2 son 45 micras y para el día +3 son 40 micras.

La mayoría de estudios publicados se refieren al efecto que produce la presencia de fragmentos sobre la implantación. Staessen *et al.*, Giorgetti *et al.*, y Ziebe *et al.* afirman que la tasa de implantación baja cuando se transfieren embriones con más de un 10-20% de fragmentación en D+2.

En día +3 además de una fragmentación menor al 20%, pueden ser indicativos de buena calidad las características morfológicas como el incremento de los gránulos y la aparición de diminutos orificios en el citoplasma de las blastómeras, junto con un aumento de compactación de las mismas. En los embriones de buena calidad las blastómeras se expanden y tocan la zona pelúcida dejando muy poco espacio perivitelino<sup>(17)</sup>.

Los embriones con mucha fragmentación presentan una mayor tasa de anomalías cromosómicas, principalmente mosaicismos<sup>(13)</sup>.

Alikani *et al.*, 1999<sup>(17)</sup>, tienen en cuenta los grados y el modelo de fragmentación analizando la incidencia y el impacto en el potencial de implantación. No todo tipo de fragmentación, aunque sea en altos porcentajes, es igual de perjudicial para el embrión. El modelo de fragmentación influye en el desarrollo embrionario, bajo la premisa general de que la pérdida de grandes volúmenes de citoplasma es más perjudicial.

Se sugiere que los fragmentos grandes se originan de blastómeras en estadio de 2 y 4 células, porque estos fragmentos tienen mitocondrias que son más electrondensas que las de las células de estadios posteriores. La liberación de estos fragmentos en estadios tempranos puede dejar al embrión sin orgánulos esenciales como mitocondrias o vacuolas pinocíticas. Además, la porción de célula que tiene el núcleo puede detenerse después de una pérdida grande de citoplasma.

Los embriones con fragmentos grandes que algunas veces pueden llegar a confundirse con blastómeras, tienen una tasa de implantación mucho más baja que los embriones con fragmentación localizada en el espacio perivitelino o asociados a una blastómera.

Así, en caso de poca fragmentación, los modelos espaciales y temporales de fragmentación afectan más al desarrollo del embrión que la fragmentación en sí<sup>(17)</sup>. Por otra parte, en ciertos fenotipos con poca fragmentación, esta puede desaparecer por lisis o por reabsorción<sup>(18)</sup>.

El grado de fragmentación oscilará entre un 0 y un 100%. Cuando es bajo (<20%) no afecta a la implantación. En la mayoría de los casos la fragmentación aparece en el estadio de 2 células y en el de 4-6 células.

La presencia de fragmentos enucleados compromete la viabilidad del embrión.	C
Es importante diferenciar entre blastómera y resto citoplasmático o fragmento. Se considera un fragmento cuando su tamaño es menor de 45 micras en día +2 y menor de 40 micras en día +3.	C
Los embriones con un porcentaje elevado de fragmentación presentan con más frecuencia anomalías cromosómicas.	C
El grado de fragmentación se expresa como un porcentaje, y se define como el volumen de espacio perivitelino y o de cavidad ocupado por fragmentos citoplasmáticos enucleados.	C
La presencia de más del 20% de fragmentos conlleva una disminución importante en la tasa de implantación.	C

La desigualdad en el desarrollo de las blastómeras tiene efectos negativos, tanto en la tasa de implantación como en la de embarazo<sup>(3,18)</sup>.

Se ha descrito que las blastómeras de embriones con división desigual y multinucleación están más afectadas por aberraciones numéricas cromosómicas que las blastómetras de embriones con división uniforme.

Los embriones desiguales presentan una tasa de implantación inferior que la media de los embriones divididos uniformemente.

Al estudiar las aneuploidías de las blastómeras, se ha observado que son más frecuentes en aquellos embriones con blastómeras desiguales. Asimismo, tanto la severidad de dichas aneuploidías, como la proporción de multinucleación son mayores.

Se especula que cuando una blastómera se divide desigualmente, las dos células hermanas podrían recibir cantidades desiguales de proteínas, mRNA, mitocondrias, etc. Recientes estudios sugieren que ciertas proteínas y productos génicos no están distribuidos uniformemente en el ovocito/embrión<sup>(19)</sup>, lo que podría ser la causa de esta división tan desigual.

Los embriones divididos uniformemente tienen una mayor tasa de implantación y de embarazo.

Los embriones de buena calidad en día +2 y día +3 deben tener las blastómeras del mismo tamaño.

La presencia de blastómeras de diferente tamaño disminuye la tasa de implantación y de embarazo.	C
La presencia de blastómeras de diferente tamaño se asocia con más frecuencia a aneuploidías embrionarias.	C

La multinucleación ha sido relacionada con un aumento en la tasa de aneuploidías y otras anomalías cromosómicas<sup>(20,21,12)</sup>.

Hay una clara relación entre la multinucleación y el modelo de división: en día +2 la ausencia de multinucleación coincide con el modelo óptimo de desarrollo embrionario; los embriones con menos o más de 4 células, muestran un aumento significativo de multinucleación en este día de desarrollo. En día +3 el embrión óptimo de 8 células muestra la menor tasa de multinucleación, e igualmente los embriones con más o menos blastómeras presentan más multinucleación.

Hay dos modelos distintos de multinucleación:

- Uno ocurre en día +2 y día +3 de desarrollo y está relacionado con anomalías cromosómicas en la mayoría de las blastómeras del embrión.
- El otro modelo sucede en el día +4 ó más tarde, dando un patrón cromosómico normal en la mayoría de las blastómeras.

En los embriones con multinucleación observada en día +2 y día +3, las blastómeras presentan normalmente tres o más núcleos, mientras que en los embriones en los que la multinucleación se observa en día +4, la mayoría de las blastómeras tienen dos núcleos.

Kligman *et al.*, 1996, estudian la incidencia de anomalías cromosómicas y no encuentran diferencias en embriones con pocas blastómeras multinucleadas con los que tienen todas la blastómeras multinucleadas ni tampoco entre lentos o de desarrollo normal, ni entre los embriones obtenidos por FIV o ICSI, ni entre embriones con multinucleación detectada en día +2 o día +3.

La mejor etapa para ver la multinucleación es después de la primera división del embrión.

La razón de que la multinucleación tenga un fuerte impacto en la implantación obedece a la elevada frecuencia de anomalías cromosómicas<sup>(21,18)</sup>. Analizando anomalías cromosómicas en embriones con blastómeras multinucleadas, el 85% presentaban anomalías cromosómicas en más del 50% de sus blastómeras. El número de blastómeras anormales excede el número de blastómeras multinucleadas, lo que significa que en un embrión en el que se observan una o más blastómeras multinucleadas lo más probable es que el resto de las blastómeras también sean anormales.

La presencia de blastómeras multinucleadas se asocia con mayor incidencia de anomalías cromosómicas embrionarias, siendo las más frecuentes las aneuploidías.	<b>C</b>
Los embriones que el día +2 o +3 presentan blastómeras multinucleadas, tienen más frecuentemente anomalías cromosómicas en la totalidad del embrión, que aquellos en los que la multinucleación aparece a partir del día +4.	<b>C</b>
El mejor momento para valorar la multinucleación de las blastómeras es a partir de la primera división mitótica.	<b>C</b>
La transferencia de embriones con blastómeras multinucleadas tiene una tasa de implantación y embarazo menor que la de embriones con blastómeras mononucleadas.	<b>C</b>

<p>Se considera que un embrión es de buena calidad en día +2 cuando cumple todos los siguientes criterios (ASEBIR):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4-5 blastómeras a las 44-47 horas postinseminación.</li> <li>- Fragmentación inferior al 20%.</li> <li>- Semejanza de tamaño entre las blastómeras.</li> <li>- Citoplasma sin vacuolas ni granulación excesiva.</li> <li>- Ausencia de multinucleación.</li> <li>- Zona pelúcida sin anomalías.</li> <li>- Pronúcleos, a las 16-22 horas, centrados, adyacentes, de tamaño semejante y bien definidos.</li> </ul>	<p><b>RSAA</b></p>
<p>Se considera que un embrión es de buena calidad en día +3 cuando cumple todos los siguientes criterios (ASEBIR):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 7-12 blastómeras a las 67-71 horas postinseminación con 4-5 en el margen horario de 44-47 horas.</li> <li>- Fragmentación inferior al 20%.</li> <li>- Semejanza de tamaño entre las blastómeras.</li> <li>- Citoplasma sin vacuolas ni granulación excesiva.</li> <li>- Ausencia de multinucleación.</li> <li>- Zona pelúcida sin anomalías.</li> <li>- Pronúcleos centrados, adyacentes, de tamaño semejante y bien definidos.</li> </ul>	<p><b>RSAA</b></p>
<p>Se considera que un embrión es de óptima calidad en día +2 cuando cumple todos los siguientes criterios (ASEBIR):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 blastómeras a las 44-47 horas postinseminación.</li> <li>- Fragmentación menor del 15%.</li> <li>- Semejanza de tamaño entre las blastómeras.</li> <li>- Citoplasma sin vacuolas ni granulación excesiva.</li> <li>- Ausencia de multinucleación.</li> <li>- Zona pelúcida sin anomalías.</li> <li>- Pronúcleos, a las 16-22 horas, centrados, adyacentes, de tamaño semejante y bien definidos.</li> </ul>	<p><b>RSAA</b></p>
<p>Se considera que un embrión es de óptima calidad en día +3 cuando cumple todos los siguientes criterios (ASEBIR):</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 7-8 blastómeras a las 67-71 horas postinseminación con 4-5 en el margen horario de 44-47 horas.</li> <li>- Fragmentación inferior al 15%.</li> <li>- Semejanza de tamaño entre las blastómeras.</li> <li>- Citoplasma sin vacuolas ni granulación excesiva.</li> <li>- Ausencia de multinucleación.</li> <li>- Zona pelúcida sin anomalías.</li> <li>- Pronucleos centrados, adyacentes, de tamaño semejante y bien definidos.</li> </ul>	<p><b>RSAA</b></p>

## **CULTIVO EMBRIONARIO: CULTIVO CORTO VS CULTIVO LARGO**

Los avances en el conocimiento de la fisiología del embrión en sus estadios iniciales de evolución han ayudado al desarrollo de nuevos sistemas de cultivo capaces de prolongar el cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto. Esto ha llevado a la presentación de sistemas que incluyen más de un medio de cultivo (los llamados medios secuenciales), los cuales se han diseñado para aportar al embrión los requerimientos nutritivos y metabólicos específicos en cada momento del desarrollo preimplantatorio<sup>(22,23)</sup>. También existen medios de cultivo en el mercado diseñados de forma que con un único medio el embrión pueda alcanzar el estadio de blastocisto.

La utilización de dichos medios secuenciales en ensayos preliminares de transferencia de embriones en día +5 vs día +3, demostraron un incremento significativo en la tasa de implantación<sup>(24-26)</sup>. Estudios prospectivos posteriores, mostraron que la tasa de embarazo no era significativamente diferente (71% vs 66%), pero en éstos se transfirió mayor número de embriones en día +3<sup>(23,27)</sup> que en día +5<sup>(24-26)</sup>. Sin embargo, la tasa de implantación por blastocisto era de un 50,5% mientras que la tasa de implantación por embrión de día 3, fue de 30,1%, siendo así significativamente diferente, apoyando el concepto de que la transferencia de blastocistos, por su elevada tasa de implantación, puede aportar altas tasas de embarazo clínico sin exponer a las pacientes a riesgos elevados de gestaciones múltiples de alto grado. Así, la transferencia de 2 blastocistos resulta en un 53% de tasa de embarazo gemelar sin embarazos triples, mientras que con la transferencia de 3 blastocistos se pueden obtener tasas de hasta el 31% de trillizos<sup>(24,25)</sup>.

Las transferencias de blastocistos obtenidos mediante el empleo de diferentes medios secuenciales existentes en el mercado, han sido estudiadas por diferentes autores<sup>(27-31)</sup>, y sus resultados y conclusiones son similares.

Además de los cultivos secuenciales, existen sistemas de co-cultivo con diferentes células. Este sistema de co-cultivo se basa en la idea del beneficio mutuo, tanto de aporte de sustancias nutrientes como de eliminación de sustancias de desecho del metabolismo embrionario. El co-cultivo con células epiteliales de endometrio humano, consigue una elevada tasa de blastocistos de buena calidad y de implantación<sup>(32)</sup>.

La transferencia de blastocistos se ha asociado con altas tasas de implantación y de embarazo sin diferencias en la tasa de abortos, en varios estudios incluidos en una revisión sistemática de la base de datos Cochrane publicada en el 2002 y revisada posteriormente en el 2005<sup>(33,34)</sup>.

Aunque aproximadamente el 40-60% de los embriones alcanzan el estadio de blastocisto con medios secuenciales<sup>(24-27,34)</sup>, uno de los riesgos del cultivo de blastocistos es la posi-



bilidad de no obtener embriones para transferir. Se ha publicado que la estrategia de estimulación ovárica estrictamente controlada, puede aumentar la probabilidad de obtener ovocitos con el mayor potencial de desarrollo, lo que disminuiría el riesgo de que ninguno de los embriones llegase hasta el estadio de blastocisto<sup>(24,26)</sup>. Otra medida es establecer criterios de evaluación del desarrollo embrionario en día +3, como número de blastómeras y presencia y porcentaje de fragmentación, antes de continuar el cultivo<sup>(27)</sup>, y si los criterios no se cumplen, los embriones se pueden transferir sin continuar hasta blastocisto. Ambas estrategias pueden disminuir el número de ciclos sin transferencia por no obtención de blastocistos, si bien lo más importante es la calidad del programa de reproducción asistida en general y la del laboratorio de embriología en particular.

Se han sugerido diferencias en la proporción de niños/niñas nacidos por transferencia de blastocistos y en la proporción de gemelos monozigóticos. Un estudio multicéntrico reciente revela un 5% de gemelos monozigóticos, es decir, una incidencia 10 veces mayor que la que existe de forma natural<sup>(28,35)</sup>.

El cultivo hasta blastocisto también supone una reducción en el número de embriones criopreservables, resultando en una reducción de la tasa de embarazo acumulado por punción tras la transferencia de los embriones frescos y congelados<sup>(36)</sup>.

Por otro lado, la transferencia de blastocistos en presencia de blastocistos excedentes congelables se asocia con muy altas tasas de embarazo e implantación. Por ello, en estos casos se debe considerar la transferencia de un único blastocisto. Por el contrario, en los casos en los que existen blastocistos excedentes pero no congelables, o bien no existen blastocistos sobrantes, la tasas de embarazo e implantación son menores<sup>(37,38)</sup>.

Las condiciones de cultivo influyen en la tasa de blastocisto obtenida. De hecho, cultivando en microgotas recubiertas de aceite o en un sistema de pocillos sin aceite, no se observan ventajas en cuanto a la tasa fecundación, desarrollo embrionario ni embarazo tras el cultivo de los ovocitos hasta día 2 o 3 bajo condiciones de 5% CO<sub>2</sub>/90% N<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub>, en vez del 5% CO<sub>2</sub>/95% aire (20% O<sub>2</sub> atmosférico). Sólo cuando se prolonga el cultivo hasta blastocisto, se observa una ligera pero significativa mejoría del desarrollo del blastocisto al utilizar el 5% de oxígeno, que se evidencia tanto en la tasa de blastocisto como en el número de células que poseen<sup>(39)</sup>. Por otro lado, se ha demostrado que el equilibrar los medios de cultivo demasiadas horas a 37°C puede degradar componentes químicos de los medios que posteriormente influyen en el desarrollo embrionario<sup>(40)</sup>. Todos estos condicionantes del cultivo influyen sobre el número de células finales del blastocisto. Al estudiar cuantitativamente las células de la masa celular interna del blastocisto, los resultados sugieren que la masa celular es indicativa del potencial de implantación del mismo. Así, blastocistos con una masa relativamente grande y oval tienen mayores probabilidades de implantación<sup>(39,40)</sup>.

Una indicación del cultivo de blastocistos podría ser la mejor selección de embriones de mala calidad en día +2/+3<sup>(41,42)</sup>. De hecho, las tasas de implantación son significativamente mejores transfiriendo blastocistos procedentes de embriones de mala calidad, sin diferencia en las tasa de gestación múltiple ni de aborto<sup>(43,44)</sup>.

Otra indicación posible es en casos de fallos de implantación (al menos 2-3 intentos previos con transferencia de 2-3 embriones de buena calidad en día +2/ día +3). Así, se ha visto que la tasa de nacidos vivos y de implantación es mayor en la transferencia de embriones en día +5, además de una menor tasa de múltiples por la transferencia de un menor número de embriones<sup>(45)</sup>. En otros estudios prospectivos y randomizados, se observa igualmente un incremento significativo en la tasa de implantación, así como un incremento no significativo de la tasa de embarazo por punción y por transferencia, pero sin una reducción de los embarazos múltiples. Además se observa una alta tasa de cancelación en las tranferencias de blastocistos, la cual se reduce significativamente si la decisión de continuar el cultivo se hace en el día +3, necesitando por lo menos 2-3 embriones en 8 células para tener una alta probabilidad de obtener blastocistos transferibles<sup>(46)</sup>. Estos resultados pueden justificarse por una mejor selección embrionaria y una mejor receptividad uterina.

Aunque la técnica del cultivo de blastocistos parece muy prometedora para los resultados de la FIV, se precisan estudios controlados randomizados con condiciones de cultivo estandarizadas y laboratorios con buenas condiciones de calidad, para determinar si el cultivo prolongado supone realmente una ventaja para pacientes no seleccionadas. Además los propios laboratorios deben de testar sus sistemas de cultivo antes de ofertar esta técnica a las pacientes con garantías, como por ejemplo en ciclos de donación de ovocitos, en los cuales los beneficios del cultivo a blastocistos parece claro<sup>(38)</sup>.

Por todo ello, aunque la transferencia de embriones en estadio de blastocisto parece ofrecer algunas ventajas en muchos aspectos, no está indicado actualmente recomendar este tipo de cultivo en todos los casos.

Es posible que la utilización de distintas condiciones de cultivo en los laboratorios, así como los criterios de selección embrionaria para los embriones a transferir<sup>(47)</sup>, la calidad del blastocisto a transferir<sup>(48-50)</sup>, así como la selección de los embriones según el consumo de determinados nutrientes del medio de cultivo<sup>(51)</sup>, la técnica de transferencia embrionaria<sup>(30,31,52)</sup>, la realización o no de eclosión asistida o adelgazamiento de la zona pelúcida pre transferencia<sup>(53,54)</sup>, y el daño sobre la cromatina del espermatozoide<sup>(55)</sup>, sean, por lo menos en parte, responsables de las discrepancias entre los diferentes estudios que comparan los resultados transfiriendo en D+3 o en D+5.

El cultivo embrionario debe realizarse con medios capaces de aportar las sustancias necesarias para el correcto metabolismo de los embriones.	<b>RSAA</b>
Existen dos tipos de cultivo embrionario: corto, con transferencia en día +2 o día +3 y largo, con transferencia en día +5.	<b>RSAA</b>
No existen diferencias, en cuanto a la tasa de embarazo e implantación, entre la transferencia de embriones en día +2 o día +3.	<b>C</b>
La transferencia de embriones en día +5 (blastocisto) vs día +2 o +3, en población seleccionada, aumenta la tasa de implantación pero no la de gestación, si se transfiere mayor número de embriones en día +2 o +3.	<b>C</b>
Se necesitan más estudios para saber si el cultivo largo de los embriones supone realmente una ventaja, en pacientes no seleccionadas.	<b>RSAA</b>
El cultivo largo para obtener blastocistos presenta los siguientes riesgos: no tener embriones para la transferencia y disponer de un menor número de embriones criopreservados.	<b>C</b>
El cultivo largo para obtener blastocistos presenta las siguientes ventajas: se reduce el número de embriones a transferir, se disminuye la tasa de gestaciones múltiples, se hace una mejor selección embrionaria y permite el diagnóstico genético preimplantacional.	<b>C</b>

## BIBLIOGRAFÍA

1. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod* 1987; 2: 705-8.
2. Staessen C, Camus M, Bollen N, Devroey P, Van Steirteghem AC. The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 1992; 57: 626-30.
3. 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: 1545-9.
4. De Placido G, Wilding M, Strina I, Alviggi E, Alviggi C, Mollo A, Varicchio MT, Tolino A, Schiattarella C, Dale B. High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* 2002; 17: 2402-9.
5. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Aubriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P, Dumont-Hassan M. 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: 1396-9.
6. Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2658-61.
7. Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnes 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: 182-7.
8. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplan-

- tation development: a review. *Hum Reprod Update* 2003; 9: 251-62.
9. Tesarik J, Grecco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 1999; 14: 1318-23.
  10. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J. Characterisation of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14: 2345-9.
  11. 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: 1970-5.
  12. Laverge H, De Sutter P, Van der Elst J, Dhont M. A prospective, randomized study comparing day 2 and day 3 embryo transfer in human IVF. *Hum Reprod* 2001; 16: 476-80.
  13. Munné S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 1998; Update 4: 842-55.
  14. 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: 2634-43.
  15. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R. Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers *Hum Reprod*. 1995; 10: 2427-31.
  16. Johansson M, Hardarson T, Lundin K. There is a cutoff limit in diameter between a blastomere and a small anucleate fragment. *J Assist Reprod Genet* 2003; 20: 309-13.
  17. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-42.
  18. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001; 16: 313-8.
  19. Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999; 14: 429-47.
  20. Munné S, Cohen J. Unsuitability of multinucleated human blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 1993; 8: 1120-5.
  21. Kligman I, Benadiva C, Alikani M, Munne S. The presence of multinucleated blastomeres in human embryos is correlated with chromosomal abnormalities. *Hum Reprod* 1996; 11: 1492-8.
  22. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable human blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3: 367-82.
  23. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Physiology and culture of the human blastocyst. *Reprod Immunol* 2002; 55: 85-100.
  24. Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts increase implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998; 69: 84-8.
  25. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-40.
  26. Gardner D, Schoolcraft W. No longer neglected: the human blastocyst. *Hum Reprod* 1998; 13: 3289-92.
  27. Behr B. Blastocyst culture without co-culture: role of embryo metabolism. *J Assist Reprod Genet* 1997; 14 (Suppl): 13S.
  28. Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Genhardt J, Dasig D. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 454-7.
  29. Da Motta ELA, Alegretti JR, Baracat EC, Olive D, Serafini PC. High implantation and pregnancy rates with transfer of human blastocysts developed in preimplantation stage one and blastocyst media. *Fertil Steril* 1998; 70: 659-63.
  30. Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod Biomed Online* 2003; 16: 470-81.
  31. Gardner DK, Lane M. Blastocyst transfer. *Clin Obstet Gynecol* 2003; 46: 231-8.
  32. Mercader A, García-Velasco JA, Escudero E, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5-year follow-up study. *Fertil Steril*. 2003; 80:1162-8.
  33. Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2002; 2: CD002118.

34. Blake DA, Proctor M, Johnson NP. The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2004; 19: 795-807.
35. Jain JK, Boostanfar R, Slater CC, Francis MM, Paulson RJ. Monozygotic twins and triplets in association with blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 103-7.
36. Anderson AR, Weikert ML, Crain JL. Determining the most optimal stage for embryo cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2004; 8: 207-11.
37. Urman B, Balaban B, Yakin K, et al. Outcome of blastocyst transfer according to availability of excess blastocysts suitable for cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 587-92.
38. 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: 243-5.
39. Dumoulin JC, Meijers CJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on human in-vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reproduc* 1999; 14: 465-9.2190-6.
40. Bavister BD, Poole KA. Duration and temperature of culture medium equilibration affect frequency of blastocyst development. *Reprod Biomed Online* 2005; 10: 124-9.
41. Balaban B, Urman B, Alatas C, Mercan R, Aksoy S, Isiklar A. Blastocyst-stage transfer of poor-quality cleavage-stage embryos results in higher implantation rates. *Fertil Steril* 2001; 75: 514-8.
42. Balaban B, Urman B, Isiklar A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R, Mumcu A, Nuhoglu A. The effect of pronuclear morphology on embryo quality parameters and blastocyst transfer outcome. *Hum Reprod* 2001; 16: 2357-61.
43. Balaban B, Yakin K, Isiklar A. Outcome of blastocyst transfer according to availability of excess blastocysts suitable for cryopreservation. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 587-92.
44. Balaban B, Urman B. Embryo culture as a diagnostic tool. *Reprod Biomed Online* 2003; 7: 671-82.
45. Guerif F, Bidault R, Gasnier O, Couet ML, Gervereau O, Lansac J, Royere D. Efficacy of blastocyst transfer after implantation failure. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 630-6.
46. Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, Albotiano S, Sonin Y, Hackmon-Ram R, Potashnik G. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2004; 81: 567-71.
47. Isiklar A, Mercan R, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Urman B. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage. A simple, effective indicator of implantation and pregnancy in intracytoplasmic sperm injection. *J Reprod Med* 2002; 47: 540-4.
48. 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: 1155-8.
49. Gardner DK, Lane M, Schoolcraft WB. Culture and transfer of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF. *Hum Reprod* 2000; 15 (Suppl 6): 9-23.
50. 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: 282-7.
51. 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: 1175-80.
52. Schoolcraft WB, Surrey ES, Gardner DK. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril* 2001; 76: 863-70.
53. Urman B, Balaban B, Alatas C, Aksoy S, Mumcu A, Isiklar A. Zona-intact versus zona-free blastocyst transfer: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2002; 78: 392-6.
54. Utsunomiya T, Ito H, Nagaki M, Sato J. A prospective, randomized study: day 3 versus hatching blastocyst stage. *Hum Reprod* 2004; 19: 1598-603.
55. Seli E, Gardner DK, Schoolcraft WB, Moffatt O, Sakas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004; 82: 378-83.

## Bibliografía adicional

- Pool TB, Atiee SH, Martin JE. Oocyte and embryo culture. Basic concepts and recent advances. In: May JV, ed. Assisted Reproduction: Laboratory Considerations. Infert Reprod Med Clinics of North America 1998; 9: 181-203.
- Menezo Y, Hamamah S, Hazout A, Dale B. Time to switch from co-culture to sequential defined media for transfer at the blastocyst stage. Hum Reprod 1998; 13: 2043-44.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. Curr Opin Obstet Gynecol 1999; 11: 307-11.
- Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. Fertil Steril 1999; 72: 604-9.
- Marek D, Langley M, Gardner DK, Confer N, Doody KM, Doody KJ. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. Fertil Steril 1999; 72: 1035-40.
- Langley MT, Marek DM, Gardner DK, Doody KM, Doody KJ. Extended embryo culture in human assisted reproduction treatments. Hum Reprod 2001; 16: 902-8.
- Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocyst versus day 2 or 3 transfer. Semin Reprod Med 2001; 19: 259-68.
- Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. Fertil Steril 2004; 81: 551-5.
- Fisch JD, Milki AA, Behr B. Sibling embryo blastocyst development correlates with the in vitro fertilization day 3 embryo transfer pregnancy rate in patients under age 40. Fertil Steril 1999; 71: 750-2.
- Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. Hum Reprod 2000; 15: 1947-52.
- Plachot M, Belaisch-Allart J, Mayenga JM, Chouraqi A, Serkine AM, Tesquier L. Blastocyst stage transfer: the real benefits compared with early embryo transfer. Hum Reprod 2000; 15(Suppl 6): 24-30.
- Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all patients. Fertil Steril 2002; 77: 693-6.
- Van der Auwera I, Debrock S, Spiessens C, Afschrift H, Bakelants E, Meuleman C, Meeuwis L, D'Hooghe TM. A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer. Hum Reprod 2002; 17: 1507-12.
- Abdelmassih V, Balmaceda JP, Nagy ZP, Abdelmassih S, Abdelmassih R. ICSI and day 5 embryo transfers: higher implantation rates and lower rate of multiple pregnancy with prolonged culture. Reprod Biomed Online 2001; 3: 216-20.
- Virant-Klun I, Tomazevic T, Zorn B, Bacer-Kermavner L, Mivsek J, Meden-Vrtovec H. Blastocyst formation a good indicator of clinical results after ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod 2003; 18: 1070-6.
- De los Santos MJ, Mercader A, Galán A, Albert C, Romero JL, Pellicer A. Implantation rates after two, three, or five days of embryo culture. Placenta 2003; 24 (Suppl B): S13-9.
- Pantos K, Makrakis E, Karantzis P, Stavrou D, Grammatidis M, Chronopoulos K. Blastocyst versus early cleavage embryo transfer: a retrospective analysis of 4,165 transfers. Clin Exp Obstet Gynecol 2004; 31: 42-4.
- Hreinsson J, Rosenlund B, Fridstrom M, Ek I, Levkov L, Sjoblom P, Hovatta O. Embryo transfer is equally effective at cleavage stage and blastocyst stage: a randomized prospective study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 1: 194-200.
- Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R. Integration of blastocyst transfer for all patients. Fertil Steril 2002; 77: 693-6.
- Blake D, Proctor M, Johnson N, Olive D. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception (Cochrane Review). The Cochrane Library. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2005: Issue 2.
- Behr B, Fisch JD, Milki AA, Racowski C, Miller K, Pool TB. Blastocyst transfer is associated with an increased incidence of monozygotic twinning. ESHRE, 1999; (submitted abstract).
- Dumoulin JC, Vanvuchelen RC, Land JA, Pieters MH, Geraedts JP, Evers JL. Effect of oxygen concentration on in vitro fertilization and embryo culture in the human and the mouse. Fertil Steril 1995; 63: 115-9.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. Hum Reprod Update 1995; 1: 91-148.

- Byatt-Smith JG, Leese HJ, Gosden RG. An investigation by mathematical modelling of whether mouse and human preimplantation embryos in static culture can satisfy their demands for oxygen by diffusion. *Hum Reprod* 1991; 6: 52–7.
- Fukui Y, McGowan LT, James RW, Pugh PA, Tervit HR. Factors affecting the invitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 125–31.
- Voelkel SA, Hu YX. Effect of gas atmosphere on the development of one-cell bovine embryos in two culture systems. *Theriogenology* 1992; 37: 1117–31.
- Ali J, Whitten WK, Shelton JN. Effect of culture systems on mouse early embryo development. *Hum Reprod* 1993; 8: 1110–4.
- Bavister BD, Poole KA. Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 484–6.
- Magnusson C, Hillensjo T, Hamberger L, Nilsson L. Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown in vitro. *Hum Reprod* 1986; 1: 183–4.
- 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: 1157–67.
- Barrenetxea G, López de Larruzea A, Ganzabal T, Jimenez R, Carbonero K, Mandiola M. Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: a comparison of day 5 and day 6 transfers. *Fertil Steril* 2005; 83: 49–53.
- Schoolcraft WB, Gardner DK. Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertil Steril* 2000; 74: 482–6.
- 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.
- Tsirigotis M. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. *Hum Reprod* 1998; 13: 3285–9.
- Desai NN. The road to blastocyst transfer. *Hum Reprod* 1998; 13: 3292–94.
- Quinn P. Some arguments on the pro side. *Hum Reprod* 1998; 13: 3294–5.
- Bavister BD, Boatman DE. The neglected human blastocyst revisited. *Hum Reprod* 1997; 12: 1507–609.
- Blastocyst production and transfer in Clinical assisted reproduction. A practice committee report. A Committee Opinion. American Society for Reproductive Medicine and Society for Assisted Reproductive Technology. Reviewed May 2003; released January 2001.
- 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: 960–3.
- 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: 2190–6.
- Gerris JM. Single embryo transfer and IVF/ICSI outcome: a balanced appraisal. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 105–21.
- Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM 3rd, Osteen KG, Wentz AC. The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization–embryo transfer. *Fertil Steril* 1989; 52: 801–6.
- Hunault CC, Eijkemans MJ, Pieters MH, te Velde ER, Habbema JD, Fauser BC, Macklon NS. A prediction model for selecting patients undergoing in vitro fertilization for elective single embryo transfer. *Fertil Steril* 2002; 77: 725–32.
- Rijnders PM, Jansen CAM. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998; 13: 2869–73.
- 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: 2103–8.
- Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M, De Neubourg D, Valkenburg M, Ryckaert G, Gerris J. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 1062–9.
- 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: 326–32.