	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>	<b>Código</b>	
		PS-DC-024	
<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 1 de 7

## 1. OBJETIVO

Mantenimiento de los embriones en cultivo y su respectiva evaluación para el acompañamiento de su desarrollo antes de la transferencia o vitrificación.

## 2. ALCANCE

Desde la evaluación de fecundación hasta la evaluación para la transferencia de embriones

## 3. CAMPO DE APLICACIÓN

Este protocolo está orientado para el personal profesional del laboratorio de Embriología.

## 4. RESPONSABLE

- Embriólogo

## 5. REFERENCIAS

- Instructivo Preparación de Medios y Reactivos
- Protocolo de Transferencia de Embriones

## 6. DEFINICIÓN

Para aumentar las tasas de éxito de los tratamientos de reproducción, es necesario aislar y mantener los embriones en las mejores condiciones de cultivo; esto incluye todo el control de calidad en los medios, concentración de los gases y temperatura e ir evaluando poco a poco el potencial de estos, para que más tarde puedan ser transferidos o vitrificados uno o dos embriones considerados óptimos. La evaluación es realizada con base a la morfología que presenten.


## 7. SIGLAS

FIV - Fertilización In vitro

ICSI – Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoide

## 8. TIPO DE MUESTRA

- Embriones en cultivo de día 2 hasta día 5 de desarrollo.

	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-024	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 2 de 7

## 9. INFORMACIÓN GENERAL

### 9.1. Orientaciones

- Los tiempos de observación de los embriones están enlistados en la tabla 2 de este procedimiento.
- Los embriones son muy sensibles a variaciones de temperatura y pH, es muy necesario que todas las actividades que se desarrollen fuera de la incubadora sean realizadas con máximo cuidado y rapidez.
- Trabajar siempre en superficies térmicas.
- Todos los procedimientos en que se tenga que llevarse a cabo cambios de medios o placas, deben ser realizados con máxima atención, teniendo muy en cuenta la numeración de los embriones y la identificación de la paciente.
- Antes de iniciar las observaciones, tener listo el formulario de FIV/ICSI de la paciente en la zona de trabajo; escribir la fecha, hora y nombre de la persona que está evaluando el caso.

## 10. MATERIAL NECESARIO

Material descartable	Equipos	Medios y reactivos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puntas de Stripper 135 ò 175 µm</li> <li>• Placas de Petri 35mm</li> <li>• Placas de Petri 60mm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cámara de Flujo Laminar con Superficie Térmica</li> <li>• Incubadora 37°C, 5% O<sub>2</sub> y 6.5% CO<sub>2</sub></li> <li>• Micropipeta Stripper</li> <li>• Microscopio Óptico Invertido</li> <li>• Estereomicroscopio con Superficie Térmica</li> <li>• Lápiz de Punta de Diamante</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Global Total</li> <li>• Lite Oil</li> </ul>

**Tabla 1.** Materiales necesarios para la realización de este procedimiento.


## 11. EQUIPOS DE PROTECCIÓN PERSONAL

- Tapabocas
- Gorro desechable

## 12. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO

### 12.1. Día 2 ó D2

1. Comprobar cuál es la incubadora y compartimiento de la paciente y retirar las placas a evaluar.
2. Retirar la primera placa de embriones de la paciente y colocarla en el microscopio invertido (Objetivo 60X) para proceder a la evaluación de los parámetros listados en la Tabla 3 y clasificar los embriones de acuerdo con la Tabla 4. Importante toda esta información colectada registrarla en el respectivo protocolo de la paciente FIV/ICSI.

	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-024	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 3 de 7

3. En cada observación es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso; al finalizar volver a colocar en la incubadora designada las cajas de cultivo.
4. Preparar la caja de Petri y el medio pertinente de transferencia para el D3, de acuerdo con la IT "Preparación de Medios y Reactivos" y el material necesario para vitrificación de acuerdo con el POE "Vitrificación de Embriones".

### **12.2. Día 3 ó D3**


1. Comprobar cuál es la incubadora y compartimiento de la paciente y retirar las placas a evaluar.
2. Evaluar los embriones en el microscopio invertido (Objetivo 60X) y decidir cuáles serán transferidos de acuerdo con el POE "Transferencia Embrionaria". Realizar la evaluación de los parámetros listados en la Tabla 3 y clasificar los embriones de acuerdo con la Tabla 4.
3. Los embriones que no se transfieren, y que tengan buena calidad, se procederá a dejarlos a cultivo prolongado o vitrificar de acuerdo con el POE "Vitrificación de Embriones", no se hacen cambio de placas ya que los medios que se utilizan son de cultivo único.
4. Es recomendable hacer registro fotográfico pertinente, con el fin de tener un soporte y poder evaluar más a fondo cada estructura y cada caso.
5. Según el destino que tendrán los embriones, se pueden organizar dentro de las mismas gotas del medio de cultivo y se vuelven a colocar las placas en la misma incubadora hasta el momento que se utilizarán de nuevo.

### **12.3. Día 4 ó D4**

1. No se realiza observación el día 4.
2. Preparar las cajas de Petri de transferencia para el D5 de acuerdo con la IT "Preparación de Medios y Reactivos" y el material necesario para vitrificación de acuerdo con el POE "Vitrificación de Embriones" y también se debe diligenciar el formulario de Vitrificación.

### **12.4. Día 5 ó D5**

1. Evaluar los embriones y decidir cuál, o cuáles, serán transferidos de acuerdo con el POE "Transferencia Embrionaria".
1. Si los demás embriones son de buena calidad se procede a la vitrificación de acuerdo con el POE "Vitrificación de Embriones".

	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-024	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 4 de 7

- Volver a colocar los embriones en el incubador designado, hasta el momento en que serán utilizados.

### 13. RECOMENDACIONES PARA SELECCIÓN DE EMBRIONES

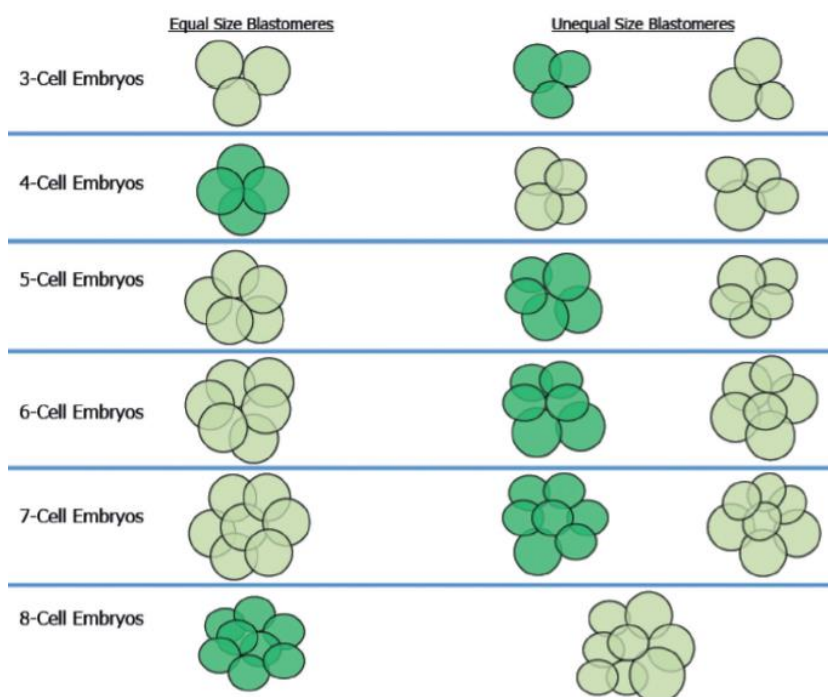
Recomendamos la utilización de algunos de los parámetros siguientes para realizar una selección más fina entre embriones de calidad morfológica similar.


#### 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 la figura 1) 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 D3 y cuando el embrión tenga 7 u 8 células.
- Evaluar según protocolo de cultivo.

#### Desfavorables:

- Inicio de adhesión o de compactación en D2. Evaluar según protocolo de cultivo.
- Compactación muy avanzada en D3. Evaluar según protocolo de cultivo.
- 3 células del mismo tamaño en D2.
- Aquellos embriones con >2 anomalías características de embriones de mala calidad, o que no haya realizado una división celular en 24 horas.



	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-024	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 5 de 7

**Figura 1.** 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).

#### 14. TABLAS DE REFERENCIAS


Observaciones	Horas Posinseminación	Estado de Desarrollo
D0 – Inseminación	0	Óvulo
D1 – Fecundación	17 – 20	Zigoto (Pronúcleo)
D2 – Cultivo	43 – 45	Embrión en clivaje
D3 – Cultivo / Transferencia	67 – 69	Embrión en clivaje
D4 – Cultivo	91 – 93	Mórula
D5 – Cultivo / Transferencia	115 – 117	Blastocisto

**Tabla 2.** Tiempos de observación de óvulos, cigotos y embriones y los estados esperados de desarrollo. En el día 4 no se realiza observación. (*Istanbul consensus* 2011).

Parámetros	Descripción
<b>Número de Células</b>	D2: 2 – 4. D3: 7 – 8.
<b>Fragmentación</b>	Leve: ≤10% Moderada: 10 – 25% Severa: ≥ 25% (Equivale, en un embrión de 4 células a un blastómero)
<b>Multinucleación</b>	Visualización de núcleos y grado de Multinucleación, más en D2.
<b>Tamaño Celular</b>	Tamaño de los blastómeros estadio-específico; deben ser preferiblemente simétricas.
<b>Otros</b>	Anillo citoplasmático. Presencia de vacuolas. Pitting o moteado. Zona pelúcida. Grado de compactación/adhesión temprana.

**Tabla 3.** Parámetros para observar clasificación de los embriones en D2 y D3 de desarrollo. (*Istanbul consensus* 2011).

Categoría	Calidad	Descripción
1	Buena	<ul style="list-style-type: none"> <li>≤10% de fragmentación</li> <li>Tamaño/simetría celular específica del día de cultivo</li> </ul>

	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-024	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 6 de 7

<b>2</b>	<b>Razonable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ausencia de multinucleación</li> <li>D2 (2 – 4) y D3 (7 – 8)</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>10 – 25% de fragmentación</li> <li>Tamaño/simetría celular específica del día de cultivo en la mayoría de las células</li> <li>Sin multinucleación aparente</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>≥ 25% de fragmentación</li> <li>Tamaño/simetría celular inadecuada del día de cultivo</li> <li>Multinucleación</li> </ul>


**Tabla 4.** Sistema de categorización y clasificación de los embriones de día 2-3 (en clivaje). Estos parámetros son para ser observados en conjunto con el número de células. (*Istanbul consensus* 2011).

		<b>Grado</b>	<b>Calidad</b>	<b>Descripción</b>
<b>Estadio de Desarrollo</b>		1	<b>B<sub>T</sub></b>	Blastocito Joven
		2	<b>B<sub>C</sub></b>	Blastocito Cavitado
		3	<b>B<sub>E</sub></b>	Blastocito Expandido
		4	<b>B<sub>Hi</sub></b>	Blastocito en eclosión o eclosionado
<b>MCI</b>		1	<b>Buena</b>	Muchas células compactadas y adheridas
		2	<b>Razonable</b>	Algunas células agrupadas
		3	<b>Mala</b>	Difícilmente reconocible, pocas células
<b>TE</b>		1	<b>Buena</b>	Muchas células formando un epitelio unido
		2	<b>Razonable</b>	Pocas células formando un epitelio poco unido
		3	<b>Mala</b>	Pocas células

**Tabla 5.** Sistema de clasificación para blastocistos. \*MCI= Masa Celular Interna; \*TE= Trofoectodermo. (*Istanbul consensus* 2011).

## 15. ACCIONES CORRECTIVAS EN CASO DE NO CONFORMIDADES

- Medios de cultivos contaminados o que presenten una posible contaminación en las placas de cultivo, preparar inmediatamente otra con las mismas características con otro medio y si está en el frasco original debe ser descartado.
- En caso de contaminación enviar a analizar los medios de cultivo para identificar el tipo de microorganismo implicado en la contaminación; comunicar el incidente al director del laboratorio.
- Placa que deben ser utilizadas y no sean preparadas, comunicar en la mayor brevedad a los técnicos del laboratorio para que sean preparadas lo más pronto posible. Si no es posible, las placas serán preparadas por el embriólogo y el medio se deberá equilibrar en la incubadora por un periodo mínimo de 1 hora.

	<b>CULTIVO Y VALIDACIÓN EMBRIONARIA</b>		<b>Código</b>	
			PS-DC-024	
	<b>Fecha de Vigencia</b>	11/03/2022	<b>Versión</b> 1	<b>Página</b> 7 de 7

## 16. CONTROL DE CALIDAD

- Todas las superficies en las que se trabaja con los embriones deben estar a temperaturas cercanas a los 37°C, pero no superior a esta.
- Todas las incubadoras deben haber sido monitorizadas para los parámetros CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> y Temperatura.
- Todos los equipos utilizados (incubadoras, filtros de cámaras de flujo laminar, estereoscopio, microscopios, etc.) deberán someterse a una revisión / calibración anual por representantes acreditados.