

Premio SAMeR Accesit

Ensayo clínico aleatorizado para comparar la *performance* embrionaria y resultados de la fertilización *in vitro* (FIV) entre un sistema de cultivo con baja concentración de O₂ versus uno conteniendo 21% O₂

Daniela S Colaci, Ignacio J de Zuñiga, M Gómez Peña, Fabio L Sobral, Claudio Bisioli, Marcos Horton

Pregna Medicina Reproductiva, Beruti 2853, C1425BBG, CABA, Argentina.

Reproducción 2011;26:42-44

Como resultado de distintos estudios de embriología animal y comparada que muestran mejoras en el desarrollo embrionario bajo condiciones de baja concentración de O₂, se están fabricando nuevas incubadoras que reducen la concentración de O₂ mediante la introducción de nitrógeno, un gas inerte, en la mezcla gaseosa. En la actualidad, a pesar de los resultados promisorios en animales, la mayoría de las incubadoras utilizadas en FIV humana siguen utilizando una mezcla de dos gases (CO₂-O₂) con la tensión de O₂ en niveles atmosféricos (21%), y los estudios con embriones humanos cultivados en un entorno bajo en oxígeno han mostrado resultados controvertidos. Algunos no han demostrado beneficios en términos de tasas de embarazo e implantación, especialmente cuando se cultiva hasta el estadio de blastocisto, y otros muestran un mejor desarrollo embrionario.

El objetivo de nuestro estudio fue comparar el desarrollo embrionario bajo dos diferentes concentraciones de oxígeno (21% O₂ versus 5% O₂) en una población no seleccionada de pacientes de FIV en un programa de transferencia embrionaria predominantemente en día 3.

Entre septiembre de 2009 y junio de 2010, los ovocitos de ciclos de FIV o inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) fueron destinados aleatorizadamente (mediante sobres abiertos al momento de administrar hCG) a una

de dos incubadoras, una *Forma 3111, Thermo Fischer Scientific*, que utiliza una mezcla de gas con 6% de CO₂ en aire atmosférico con 21% de O₂ y otra *Forma 3131 Thermo Fischer Scientific*, que utiliza una mezcla de 3 gases (5% O₂ 6% CO₂-89% N₂).

Los dos grupos en estudio fueron cultivados utilizando el mismo medio de cultivo (*Medicult*,[®] *Jyllinge, Dinamarca*), pero en ambos grupos los medios fueron equilibrados durante la noche previa en una incubadora convencional (O₂ al 21%). El día de la recuperación ovocitaria, los complejos cumulus-corona (CCCs) recuperados fueron enjuagados en medio de lavado sobre una platina caliente, y colocados en una cápsula de 4 pozos conteniendo 500 µl de medio *EmbryoAssist*,[®] cubiertos con parafina líquida y se colocaron en la incubadora correspondiente, según la aleatorización. Las muestras de semen fueron procesadas según protocolos convencionales y para FIV convencional, la inseminación o el ICSI fue realizado entre 4-6 horas luego de la recuperación del ovocito en *EmbryoAssist*,[®] bajo parafina líquida. La fertilización fue observada a las 18-20 horas y los ovocitos en estado pronuclear fueron cultivados en grupos de no más de 4 embriones en microgotas de 40 µL en ISM1[®] bajo parafina líquida en placas de Petri. Los embriones fueron transferidos diariamente a microgotas nuevas hasta el momento de la transferencia.

Los embriones fueron transferidos principalmente en día 3 y en ocasiones en día 2 debido a la programación de tareas del laboratorio. La calidad embrionaria fue evaluada en día 2 y 3 utilizando la clasificación morfológica de Bolton. Adicionalmente, se utilizó el *Score* Embrionario Acumulado (CES) y el *Score* Embrionario Promedio (MES) descripto por Steer.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete *STATA 8.0*.

Se aleatorizaron 257 ciclos de FIV o ICSI correspondientes a 227 pacientes. Se excluyeron 45 ciclos debido a: ausencia de ovocitos maduros (12 ciclos), falla de fertilización (9 ciclos) o detención en el clivaje embrionario (2 ciclos). Otros 22 ciclos no tuvieron transferencia embrionaria por riesgo de hiperestimulación ovárica (n=17) u otras condiciones médicas que impedían la transferencia (n=5). En estos casos los embriones fueron clasificados morfológicamente y vitrificados pero no fueron incluidos en este estudio.

Las características de ambos grupos fueron comparables respecto a edad, parámetros de reserva ovárica, diagnóstico de infertilidad, número de ciclos previos de FIV, unidades de gonadotrofinas requeridas y número de ovocitos recuperados.

Tampoco hubieron diferencias entre los grupos en el número de embriones transferidos, transferencias con al menos un embrión de buena calidad, número de embriones disponibles para criopreservar, tipo de catéter de transferencia utilizado (blandos vs *sets*), calidad de la transferencia embrionaria (fácil vs difícil) (Tabla 1).

Tabla 1. Datos embrionarios y pronósticos de laboratorio en ambos grupos.

	Dos gases (21% O ₂)	Tri gas (5% O ₂)	p
# embriones transferidos	2,11 ± 0,6	2,09 ± 0,6	0,7
% al menos 1 EAQ	80,4%	86,4%	0,2
% catéteres blandos en la ET	86,7%	87,2%	0,9
% transferencias buena calidad	94,3%	92,7%	0,6
% buen pronóstico de laboratorio	33,6%	33,3%	0,9
% ciclos con criopreservación embrionaria	47,9	44,9%	0,6
# apertura diaria de puertas en incubadora	9,4 ± 5,0	9,1 ± 5,1	0,7

EAQ: embrión de alta calidad. ET: transferencia embrionaria

De los 212 ciclos que fueron aleatorizados, 103 fueron cultivados bajo condiciones de oxígeno atmosféricas (21%) y 109 cultivados a baja concentración de oxígeno (5%). En total se analizaron 1.145 embriones, 579 (50,6%) correspondientes a la incubadora con mezcla de dos gases y 566 (49,4%) de la incubadora trigas. No encontramos diferencias significativas respecto a la morfología ni a la dinámica de desarrollo embrionaria en día 2 ni en día 3 de cultivo, de acuerdo a la clasificación morfológica convencional, ni en la comparación de scores embrionarios (promedio y acumulativo) (Tablas 2 y 3). De los ciclos aleatorizados a la incubadora de bajo oxígeno, 29 resultaron en embarazos clínicos, de los cuales 26 fueron embarazos evolutivos. La tasa de embarazo clínico por embrión transferido fue 26,6% (19/109) y la tasa de embarazo evolutivo fue 23,8% (26/109). Observamos 32 embarazos en ciclos aleatorizados a la incubadora con oxígeno atmosférico, y la tasa de embarazo clínico por embrión transferido fue 31,1% (32/103) y 27 embarazos evolutivos (26,2%; 27/103). Las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas ($P = 0,75$). Las tasas de implantación de ambos grupos fueron también similares (11,7% en la incubadora de bajo oxígeno y 13,5% en la incubadora de oxígeno ambiental, $P = 0,6$).

Tabla 2. Distribución morfológica de embriones en día 3.

Día 3	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Grado 4	p
21% O ₂	61	227	195	46	-
5% O ₂	48	221	175	65	-
Total (n)	109	448	370	111	0,1

Tabla 3. Score embrionario en día 2 y 3.

	Dos gases (21% O ₂)	Tri gas (5% O ₂)	p
CES día 2	36,8 + 3,3	35,1 + 3,2	0,7
MES día 2	7,6 + 0,4	7,4 + 0,5	0,8
CES día 3	70,8 + 5,7	77,6 + 6,9	0,4
MES día 3	13,8 + 0,7	14,8 + 0,7	0,3

CES: Cumulative embryo score, score embrionario acumulativo (clase morfológica x núm. blastómeros x núm. embriones)²⁵ MES: Mean embryo score, score embrionario medio (CES/núm. embriones)²⁵

No encontramos diferencias significativas en este trabajo prospectivo aleatorizado que compara el desarrollo embrionario en dos medios gaseosos con diferente concentración de oxígeno. La tasa de implantación y la tasa de embarazo fueron similares en ambos grupos. De haber una diferencia, podría ser que nuestro estudio no haya tenido el poder suficiente para detectarla debido al tamaño muestral. Otro motivo posible por el cual las tasas de embarazo fueron similares, es que la población de pacientes incluidas en este estudio no fue seleccionada y con una media de edad de 36 a 37 años. En nuestro centro la media de embarazo clínico por transferencia es 42% en mujeres menores de 35 años, 33% en mujeres de 35 a 39 años y 16,5% en mujeres mayores de 40 años. Más aún, existe la probabilidad de que los beneficios del cultivo bajo condiciones de oxígeno re-

ducido no sean visibles en la morfología básica convencional o que sólo se manifiesten durante el cultivo prolongado hasta el estadio de blastocisto. También existe la posibilidad de que el cultivo con oxígeno reducido pudiera beneficiar a algún subgrupo de pacientes; por ejemplo, mujeres de edad reproductiva avanzada, aquellas con mala respuesta ovárica o pacientes con endometriosis.

En conclusión, en el presente estudio el cultivo a baja concentración de O_2 no muestra beneficios en la práctica clínica habitual cuando se cultivan embriones hasta el día 3 de desarrollo en un programa de fertilización *in vitro*. Se necesitan más estudios prospectivos con un mayor número de pacientes para evaluar si el desarrollo embrionario y los resultados clínicos son mejores con esta técnica al cultivar hasta el estadio de blastocisto.