

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaria de SAMeR: info@samer.org.ar

Experiencia en transferencia electiva de blastocisto único y su análisis morfológico

Mercedes Papayannis, María Ayelén Demarco, Alejandro Oubiña, Mariana Gómez Peña, Evelyn De Martino, Marcos Horton

PREGNA-Medicina Reproductiva.

Reproducción 2015;30:93-98

Resumen

Se analizaron los resultados generales de FIV/ICSI en pacientes que tuvieron transferencia electiva de blastocisto único durante el período 2011-2013. Se evaluaron las características morfológicas de los blastocistos obtenidos de las pacientes incluidas en el estudio y su relación con la tasa de embarazo clínico evolutivo.

Palabras claves. Blastocisto, blastocoele, masa celular interna, trofoectodermo, transferencia electiva de embrión única.

Elective single blastocyst transfer and its morphological analysis

Summary

The overall results of IVF/ICSI patients who had elective single blastocyst transfer during the period 2011-2013 were analyzed. The morphological characteristics of blastocysts obtained from patients

included in the study and its relationship with the ongoing clinical pregnancy rate was evaluated.

Key words. Blastocyst, blastocoele, inner cell mass, trophoctoderm, elective single embryo transfer.

Abreviaturas

FIV: fertilización in vitro.

sET: transferencia de embrión único.

MCI: masa celular interna.

TE: trofoectodermo.

hCG: gonadotrofina coriónica humana.

ICSI: inyección intracitoplasmática del espermatozoide.

M2: metafase 2.

D5: día 5.

En la actualidad, dentro de los tratamientos de reproducción asistida de alta complejidad (FIV/ICSI), un gran esfuerzo está enfocado hacia el desarrollo de métodos confiables para la correcta selección embrionaria dentro de una cohorte de embriones obtenidos por estas técnicas. El objetivo es lograr altas tasas de embarazo disminuyendo la incidencia de embarazos múltiples. Histó-

ricamente, las altas tasas de embarazo múltiple han sido en gran parte debido a la transferencia indiscriminada de varios embriones sin detallar con precisión sus características morfológicas. Sin embargo, un número creciente de países han implementado restricciones legales y directrices para minimizar la transferencia de varios embriones. Estas restricciones no sólo han aumentado el uso de la transferencia de un solo embrión (sET), sino que también han llevado a muchos laboratorios de FIV a buscar enfoques alternativos para la identificación de los embriones con mayor viabilidad o potencial implantatorio.¹⁻⁵

La transferencia de blastocistos es uno de los métodos que se utiliza para lograr una mayor implantación y tasas de nacidos vivos en comparación con los embriones en etapa de clivaje.⁶⁻¹⁰ El retraso de la transferencia y la prolongación del cultivo embrionario hasta la etapa de blastocisto permite mejorar la selección del embrión con mayor potencial,¹¹ así como la sincronidad entre su desarrollo y el del endometrio, asemejándose más a la situación natural y fisiológica.

Varios estudios han demostrado que hay embriones morfológicamente normales en día 2 y 3 que no continúan su desarrollo hasta estadio de blastocisto, mientras que embriones de calidad regular en día 2 y 3 pueden desarrollar a estadio de blastocisto y lograr un embarazo.^{12, 13, 8} Se cree que alrededor del día 3 de desarrollo durante la activación del genoma del embrión ocurre un proceso de autoselección, por lo que muchos embriones quedan detenidos en este estadio debido a anomalías cromosómicas.^{14, 15} Esto produciría a su vez una disminución de la proporción de blastocistos cromosómicamente anormales.¹⁶ Se considera que los embriones que alcanzan el estadio de blastocisto tienen un mayor potencial de implantación por tener un genoma funcional que puede controlar la división celular y la diferenciación en los dos tipos celulares: masa celular interna (MCI) y trofoectodermo (TE). También hay muchos embriones que no logran alcanzar el estadio de blastocisto por una deficiencia en el sistema de cultivo más que por una falla en la funcionalidad del genoma. Por eso, la mejora en los sistemas de cultivo implica un incremento en la proporción de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto. Este aumento notable significa que

varios blastocistos estarán disponibles para la selección en el momento de la transferencia.

Aunque muchos de los nuevos métodos de selección embrionaria están siendo investigados, la morfología simple se utiliza de forma rutinaria en la mayoría de los centros de reproducción asistida hoy en día. El sistema de clasificación morfológica, primero descrito por Gardner y Schoolcraft hace más de una década,¹⁷ es ampliamente utilizado para la selección de blastocistos. De acuerdo con este sistema de tres parámetros, los blastocistos se clasifican según el grado de expansión del blastocelo y eclosión (uno a seis) tamaño y compactación de la MCI (puntaje A, B y C de mayor a menor) y la cohesión y el número de células del TE (puntaje A, B y C de mayor a menor). Un blastocisto de óptima calidad tiene el blastocelo totalmente expandido, una masa celular interna prominente y compacta y un trofoectodermo con gran número de células aglomeradas.^{18, 19}

Sabemos que la clasificación morfológica es un fuerte predictor de la viabilidad de los embriones por lo que la comprensión de la influencia de cada parámetro morfológico de los blastocistos por separado nos puede ayudar a mejorar la selección embrionaria. Sin embargo, seleccionar el mejor blastocisto de una cohorte de embriones con diferentes parámetros morfológicos sigue siendo un desafío al realizar transferencia electiva de embrión único (sET) en el Día 5. Para tomar esta decisión es necesario entender la contribución de cada parámetro en la implantación y en el potencial de un blastocisto. Se han realizado varios estudios para determinar el impacto independiente de cada parámetro en el resultado de la implantación, e incluso clasificar su importancia.

El principal objetivo de este trabajo fue evaluar los resultados generales de las transferencias electivas de blastocisto único en una población de FIV/ICSI y su correlación con la morfología embrionaria observada.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio retrospectivo de 24 pacientes que tuvieron transferencia electiva de blastocisto único en día 5 en nuestra clínica entre 2011 y 2013.

Las causas de infertilidad fueron clasificadas dentro de tres categorías: (i) factor femenino, que

incluye factores tubo-peritoneal, endometriosis, síndrome de ovario poliquístico, y otros factores hormonales; (ii) factor masculino; y (iii) factor combinado.

Todas las pacientes fueron estimuladas utilizando esquemas tanto con antagonistas (*Orgalutran*®, MSD, *Cetrotide*®, Merck Serono) como con agonistas de GnRH (*Lupron*®, Abbott). La estimulación ovárica controlada se realizó con FSH recombinante (*Gonal-F*®, Merck Serono, *Puregon*®, MSD) o gonadotrofina menopáusica humana altamente purificada (*Menopur*®, Ferring). La aspiración folicular se realizó a las 35-36 horas luego de la aplicación de hCG (*Ovidrel*®, Merck Serono, *Gonacor*®, Ferring o *Pregnyl*®, MSD).

Los ovocitos recuperados fueron lavados y colocados en medio GIVF (*Vitrolife AB*, Suecia) a 37°C, pH 7,35 ± 0,5, 6-7% CO₂ y 5% de O₂. La técnica de fertilización utilizada, ya sea FIV o ICSI, se realizó siguiendo los protocolos convencionales. Luego de 16-18 horas post-fertilización,

se confirmó la presencia de dos pronúcleos y los cigotos fueron colocados en gotas de 40 µl de medio G1 (*Vitrolife AB*, Suecia) bajo aceite mineral para el cultivo en la etapa de clivaje. El desarrollo embrionario fue observado cada 24 horas y la calidad embrionaria fue clasificada según el criterio de Estambul.¹⁸ En día 3, los embriones fueron colocados en gotas de 40 µl de medio G2 (*Vitrolife AB*, Suecia) bajo aceite mineral para su posterior cultivo hasta estadio de blastocisto. Las incubadoras utilizadas fueron *K-System Long Term IVF G185*.

En día 5, los blastocistos fueron clasificados según el criterio de Estambul. De acuerdo a este consenso, un blastocisto óptimo en este momento del desarrollo debería estar completamente expandido, con una MCI prominente, fácil de distinguir, compacta y con un gran número de células; y el trofoectodermo debería tener varias células formando un epitelio cohesivo.¹⁸ El sistema de clasificación de los blastocistos según el criterio de Estambul está descrito en la siguiente tabla:

Tabla 1. Descripción de la clasificación de los blastocistos según el criterio de Estambul.

	Grado	Score	Descripción
Estadio de desarrollo	1		Temprano
	2		Blastocisto expandido
	3		Blastocisto completamente expandido
	4		Blastocisto eclosionado
ICM	1	Bueno	Prominente, fácil de distinguir, con un gran número de células compactadas y unidas.
	2	Regular	Fácil de distinguir, con un gran número de células agrupadas.
	3	Malo	Difícil de distinguir, con pocas células.
TE	1	Bueno	Muchas células formando un epitelio cohesivo.
	2	Regular	Pocas células formando un epitelio suelto.
	3	Malo	Pocas células.

La transferencia embrionaria se realizó en D5, eligiendo el blastocisto de mejor calidad para ser transferido y vitrificando los restantes de buena calidad. Los blastocistos se criopreservaron utilizando una técnica de vitrificación. El protocolo utilizado se basó en 2 pasos (*Cryotech*®). Los medios utilizados contienen diferentes concentraciones de etilenglicol, dimetilsulfóxido y trealosa. Los blastocistos se almacenaron en *Cryolocks* (Biotech, EE.UU.) en nitrógeno líquido.

La transferencia embrionaria se realizó con cánula flexible, *EchotipSoft Pass*® (Cook Medical, EE.UU.), o rígida, *PM TRANS SET* (Prince Medical, Francia), dependiendo de la dificultad de la misma; todas ellas se realizaron bajo control ecográfico. A los 13-15 días post-transferencia embrionaria, se realizó el primer dosaje de beta hCG en sangre; en caso de resultado positivo, se repitió a las 48 horas. Aquellas pacientes con beta hCG evolutivas, realizaron control ecográfico a

los quince días posteriores al resultado positivo para comprobar actividad cardíaca. Se realizó un segundo control ecográfico a las 8 semanas para controlar evolución del embarazo y posteriormente fueron derivadas al obstetra.

El análisis estadístico se realizó utilizando el *test* de Chi cuadrado. Consideramos el nivel de significancia en $p = 0,05$.

Resultados

Durante este período, 24 pacientes realizaron transferencia electiva de blastocisto único, según criterio médico y consensuado con la paciente y/o su pareja. Los parámetros evaluados fueron: número total de ovocitos recuperados, número de metafase 2 (M2), de embriones de buena calidad en D3, la tasa de formación de blastocistos, la tasa de blastocistos vitrificados y las tasas de embarazo evolutivo, de aborto e implantación. Los mismos se encuentran descriptos en la Tabla 2. El promedio de edad de las pacientes incluidas en este estudio fue $34,5 \pm 3,5$ años. El promedio de ovocitos recuperados fue $14,63 \pm 4,68$, de los cuales, en promedio se obtuvieron $12,21 \pm 4,31$ ovocitos en M2. Entre las 24 pacientes estudiadas, a 16 se les realizó la fertilización de sus ovocitos por FIV convencional y a 8 se les realizó ICSI. El promedio de embriones de buena calidad obtenidos en día 3 fue $6,87 \pm 2,80$. El promedio de blastocistos obtenidos en cada paciente fue $5,38 \pm 1,91$.

Tabla 2. Resultados generales de las pacientes con transferencia electiva de blastocisto única.

Edad de las pacientes (promedio)	$34,5 \pm 3,5$
Ovocitos recuperados (promedio)	$14,63 \pm 4,68$
Ovocitos M2 (promedio)	$12,21 \pm 4,31$
FIV (n)	16
ICSI (n)	8
N embriones buena calidad	
D3 (promedio)	$6,87 \pm 2,80$
N blastocistos (promedio)	$5,38 \pm 1,91$
Tasa de formación de blastocistos	
(blastocistos/ Ovocitos M2 fertilizados)	57,85 (129/223)
N blastocistos sobrantes vitrificados (promedio)	$3,38 \pm 1,44$
Embarazos evolutivos (%)	7 (29,17)
Abortos (%)	4 (36)
Embarazos ectópicos (%)	0
Implantación (%)	45,83 (11/24)

La tasa de formación de blastocistos (blastocitos/ ovocitos M2 fertilizados) fue 57,85%. Los blastocistos de buena calidad que no fueron transferidos se vitrificaron. El promedio de blastocistos vitrificados por cada paciente fue de $3,38 \pm 1,44$. Entre las 24 pacientes, 11 lograron un embarazo clínico ($11/24 = 45,8\%$), y 7 de ellos resultaron evolutivos, lo que representa una tasa de embarazo evolutivo de 29,17%. La tasa de implantación fue 45,83% (11/24).

En la Tabla 3, observamos nuestros resultados según la morfología de los blastocistos transferidos. La tabla se divide en 3 partes: expansión, MCI y TE. Para cada punto analizado está descripto el número de pacientes, la tasa de embarazos evolutivos y de abortos obtenidos. En nuestra experiencia, el 79% de los blastocistos transferidos presentaron un grado de expansión completa (expansión 3) y el 92% una calidad de MCI y de TE de grado 1.

Tabla 3. Resultados según la morfología de los blastocistos.

Expansión	1	2	3	4
N pacientes	0	2	19	3
Evolutivos (%)	0	1 (50)	4 (21,05)	2 (66,67)
Abortos (%)	0	1 (100)	3 (42,85)	0
MCI	1	2	3	
N pacientes	22	2	0	
Evolutivos (%)	5 (22,72)	2 (100)	0	
Abortos (%)	4 (44,44)	0	0	
TE	1	2	3	
N pacientes	22	2	0	
Evolutivos (%)	6 (27,27)	1 (50)	0	
Abortos (%)	4 (40)	0	0	

Discusión

Nuestros resultados demuestran una alta tasa de implantación y de embarazo evolutivo al transferir en forma electiva un único blastocisto en pacientes seleccionadas. En esta población de buen pronóstico la existencia de un número alto de blastocistos facilita la selección de los mismos basándose en parámetros de morfología óptima.

La clasificación morfológica de los blastocistos se basa en el sistema definido por Gardner y Schoolcraft.¹⁷ Los estudios que evalúan la validez de este sistema de clasificación han demostrado

que la transferencia de blastocistos resulta en un aumento en la tasa de implantación. Muchos estudios se encuentran limitados por el hecho de que la clasificación del trofoectodermo y la masa celular interna se realizó en conjunto y además varios blastocistos fueron transferidos de manera simultánea. Esto hace difícil interpretar de manera separada la influencia del trofoectodermo y de la masa celular interna de cada embrión en la tasa de implantación y de nacido vivo. Se ha reportado que la calidad de la masa celular interna tiene una correlación positiva con la tasa de embarazo, pero recientemente Ahlström ha publicado dos estudios donde la calidad del trofoectodermo está correlacionada con tasa de embarazo tanto en transferencia en fresco y congelados.^{20, 21}

El valor predictivo del TE podría deberse a que la calidad del mismo reflejaría su funcionalidad, y en este estadio de desarrollo un blastocisto listo para iniciar el proceso de implantación necesita de un buen TE, con capacidad de invadir el endometrio.²² Una función fundamental del TE es la secreción de hCG, una glicoproteína que tiene un rol importante en la relación embrión-endometrio.^{23, 24} Otros mecanismos que podrían explicar también la importancia del trofoectodermo en la tasa de embarazo son:

1- El trofoectodermo está involucrado en el proceso de implantación; aquellos blastocistos con mejor calidad de trofoectodermo secretan hCG de manera más temprana, la cual está involucrada en la interacción blastocisto-endometrio.

2- Se ha reportado que aquellos blastocistos con mejor calidad de trofoectodermo tendrían reducida la posibilidad de presentar anomalías cromosómicas.

Se cree que el grado de expansión del blastocelo está relacionado con la calidad del trofoectodermo, debido a que el número y las uniones entre las células del trofoectodermo reflejarían la capacidad del blastocisto de bombear iones de manera eficiente dentro de la cavidad causando un flujo de fluidos y previniendo la pérdida del mismo. Estas uniones estrechas intercelulares conducirían a la expansión del blastocelo. Debido a esto, según algunos autores, la clasificación del grado de expansión no sería necesaria.²⁰

Dado que la cantidad de pacientes incluidas en el estudio es pequeña, es evidente que los blas-

tocistos seleccionados para ser transferidos presentaban calidad óptima en sus tres parámetros morfológicos, no permitiendo así una evaluación detallada de los mismos y no pudiendo identificar en nuestro trabajo cuál de los tres parámetros estudiados es el mejor predictor para nacido vivo.

Nuestro objetivo a largo plazo es aumentar la cantidad de pacientes que realizan transferencia electiva de blastocisto único y así poder estudiar la incidencia en la tasa de embarazo de cada parámetro morfológico por separado para predecir el potencial de implantación de los blastocistos tanto en ciclos frescos como en congelados.

Sabemos que la clasificación morfológica es un fuerte predictor de la viabilidad de los embriones por lo que entendiendo la influencia de cada parámetro morfológico de los blastocistos por separado nos puede ayudar a mejorar la selección embrionaria.

Referencias

1. Bergh C. How to promote singletons. *Reprod Biomed Online* 15 2007(Suppl 3):22-27.
2. ASRM Practice Committee. Guidelines on number of embryos transferred. *Fertil Steril* 90 2008;SI63-SI64.
3. Karlstrom PO, Bergh C. Reducing the number of embryos transferred in Sweden-impact on delivery and multiple birth rates. *Human Reprod* 2007;22:2202-2207.
4. Kutlu P, Atvar O, Vanlioglu OF y col. Effect of the new legislation and single-embryo transfer policy in Turkey on assisted reproduction outcomes: preliminary results. *Reprod Biomed Online* 2011;22:208-214.
5. Maheshwari A, Griffiths S, Bhattacharya S. Global variations in the uptake of single embryo transfer. *Human Reprod Update* 2011;17:107-120.
6. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, y col. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;CD002118.
7. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, y col. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998;13:3434-3440.
8. Gardner DK, Vella P, Lane M, y col. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998;69:84-88.
9. Papanikolaou EG, Camus M, Kolibianakis EM, y col. In vitro fertilization with single blastocyst-stage versus single cleavage-stage embryos. *N Engl J Med* 2006;354:1139-1146.
10. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, y col. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* 2008;23:91-99.

11. Gardner DK, Lane M, Calderon I, y col. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 1996;65:349-53.
12. Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, y col. Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1989;6:30-35.
13. Bolton VN, Wren ME, Parsons JH. Pregnancies after in vitro fertilization and transfer of human blastocysts. *Fertil Steril* 1991;55:830-832.
14. Hardarson T, Caisander G, Sjogren A, y col. A morphological and chromosomal study of blastocysts developing from morphologically suboptimal human pre-embryos compared with control blastocysts. *Hum Reprod* 2003;18:399-407.
15. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M y col. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 2001;16:1954-1958.
16. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, y col. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective and randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19:2849-2858.
17. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999;11:307-311.
18. Alpha Scientists. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011.
19. Racowsky C, Vernon M, Mayer J, y col. Standardization of grading embryo morphology. *Fertil Steril* 2010;94:1152-1153.
20. Ahlström, A, Westin, C, Reisner, E, y col. Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Rep* 2011;26:3289-3296.
21. Ahlström, A, Westin, C, Wikland, M, y col. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw blastocyst morphology. *Hum Rep*.
22. Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med* 2011;345:1400-1408.
23. Cole LA. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:8.
24. Cole LA. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 2010;8:102.