

# Experiencia en desarrollo a blastocisto en cultivo individual en incubadoras trigas y convencional

Andrea Dematteis, Anahí D'Agostino, Camila Frautschi, Celina Palena, Gustavo Estofan, Mariana Hernández

Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción (CIGOR). Córdoba, Argentina.

Reproducción 2017;32:20-25

## Resumen

Se analizaron los resultados preliminares de un programa de cultivo a blastocisto en pacientes de FIV/ICSI, entre junio de 2014 y diciembre de 2015. Se evaluó el desarrollo embrionario hasta el día 5-6 de cultivo en incubadoras trigas y convencional. Se analizó la relación con la edad de las pacientes y las tasas de embarazo clínico. Se llevó a cabo cultivo individual de embriones por lo que pudimos relacionar la calidad embrionaria observada hasta día 3 con la calidad de los blastocistos obtenidos en día 5-6.

**Palabras claves.** Cultivo individual, calidad embrionaria, blastocisto, incubadora trigas, tasa de embarazo.

We also analyzed blastocyst development according patient age. As we perform individual culture of embryos, we were able to establish a relation between embryo quality, as observed until day tri-gas, with blastocyst development and quality obtained in day 5-6.

**Key words.** Individual culture, embryo quality, blastocyst, tri-gas incubator, pregnancy rate.

## Experience developing to blastocyst in individual culture in tri-gas and conventional incubators

### Summary

In this paper we analyze preliminary results of a blastocyst culture program in IVF cycles performed between June 2014 and December 2015. Embryo development and pregnancy rate were evaluated until day 5-6 comparing three gas and conventional incubators.

**Correspondencia:** Andrea Dematteis  
CIGOR, Chacabuco 1089 1° Piso (5000). Nva Córdoba,  
Córdoba, Argentina.  
Tel: +54 0351 4694433  
Correo electrónico: adematteis@hotmail.com

## Introducción

El desarrollo embrionario a estadio de blastocisto en laboratorios de reproducción asistida tuvo lugar en los años noventa a partir del estudio de los requerimientos metabólicos del embrión durante su desarrollo hasta el día 5-6 de cultivo en medios secuenciales.<sup>1,2</sup> De esta manera se logró mejorar la selección embrionaria más allá del día 3 de cultivo, donde tiene lugar una activación significativa del genoma embrionario,<sup>3,4</sup> y llevar a cabo la transferencia electiva de un único embrión con mayor potencial entre los de su cohorte. Como consecuencia disminuyeron las tasas de embarazo múltiple mientras que aumentaron las tasas de implantación.<sup>5,6</sup> Este advenimiento trajo aparejada la necesidad de los laboratorios de reproducción asistida de implementar condiciones de cultivo óptimas para garantizar el desarrollo embrionario adecuado hasta día 5-6 de cultivo.

En nuestra experiencia, incorporamos el sistema de cultivo secuencial en dos incubadoras diferentes:

en incubadora convencional con humedad a saturación y concentración atmosférica de O<sub>2</sub> (37 °C, 6,2% CO<sub>2</sub>) y en incubadora trigas con concentración reducida de O<sub>2</sub> (37 °C, 6,2% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub>).

Nos propusimos analizar el efecto de estas condiciones de cultivo en el desarrollo embrionario hasta día 5-6 con el objetivo de implementar el cultivo a blastocisto.

Nuestro protocolo de trabajo implica el cultivo embrionario en microgotas individuales bajo aceite desde el momento del ICSI o luego de la evaluación de la fertilización en FIV. Esto nos permite tener en cuenta aspectos morfológicos anteriores al momento de la transferencia, como por ejemplo, la presencia de multinucleación en día 2 para seleccionar el/los embrión/es de mejor pronóstico al momento de transferir en día 2 o 3.<sup>7</sup>

Al criterio de selección embrionaria vigente en nuestro laboratorio hasta día 3 le agregamos, en cultivo prolongado, el criterio de evaluación y clasificación morfológica de blastocistos propuesto por Gardner.<sup>8</sup>

De esta manera, el segundo objetivo de este estudio fue analizar de qué manera se relaciona la evaluación morfológica de blastocistos propuesta por Gardner<sup>8</sup> con nuestra clasificación embrionaria hasta día 3.

Si bien éste es un estudio preliminar, y los blastocistos obtenidos fueron en su mayoría vitrificados, analizamos las tasas de embarazo obtenidas hasta el momento luego de la transferencia de blastocistos descongelados y transferidos en ciclos diferidos.

Ésta fue nuestra experiencia.

## Materiales y métodos

Diseño retrospectivo de cohorte.

Analizamos los ciclos de FIV/ICSI realizados entre junio de 2014 y diciembre de 2015 en los que se realizó cultivo hasta día 5-6 de todos o algunos de los embriones. Incluimos pacientes de 21 a 42 años que realizaron tratamientos con ovocitos propios y espermatozoides de eyaculado y que tuvieron 3 o más ovocitos fertilizados normales.

La estimulación ovárica se realizó con esquema de antagonista de GnRH. Se realizaron controles periódicos ecográficos y de estradiol sérico. Se aplicó el antagonista con folículos iguales o mayores a 14 mm. Cuando se alcanzó el desarrollo folicular de tres folículos de 18 mm o más se administró 10.000 UI de HCG.

En el laboratorio, se utilizó medio HTF con hepes suplementado (*Irvine SC*) para la recuperación de ovocitos, procesamiento y resuspensión de espermatozoides e ICSI. Las muestras de semen fueron procesadas por *swim-up* o gradientes de densidad (*Isolate, Irvine SC*).

Los ovocitos y embriones se cultivaron de manera individual en microgotas de 20 µl en medios secuenciales bajo aceite (G-IVF plus, G1-plus y G2 plus, *Vitrolife*). Durante el cambio de cápsula en día 3 se respetó el orden de los embriones en las gotas de cultivo. Se usaron dos tipos de incubadora: convencional a 37 °C y 6,2% CO<sub>2</sub> (*Forma, Thermo Scientific*) y trigas a 37 °C, 6,2% CO<sub>2</sub> y 5% O<sub>2</sub> (*K-systems*).

El FIV o el ICSI se realizaron a las 5 h post-aspiración. Luego de 17 h se evaluó la sobrevida y fertilización de los ovocitos. La calidad embrionaria y clivaje se evaluaron a las 41 y 65 h, y la morfología de los blastocistos en día 5 y 6.

Se clasificaron los embriones en día 3 como:

- *Embriones de buena calidad*: embriones con blastómeras no multinucleadas en día 2, que en día 3 presentaron 6 o más blastómeras simétricas o ligeramente asimétricas, sin vacuolas, lagunas o aspecto granuloso oscuro, con menos de 10% de fragmentos.
- *Embriones regulares*: embriones con blastómeras con 0 a 3 núcleos visibles en día 2, que en día 3 presentaron 6 o más blastómeras simétricas o asimétricas; o blastómeras con vacuolas, lagunas o aspecto granuloso u oscuro; o con 10 a 20% de fragmentos. Se incluyen como regulares los embriones lentos: embriones de “buena calidad” pero con 4 a 5 células en día 3.
- *Embriones de mala calidad*: más de 20% de fragmentos; o blastómeras con más de 3 núcleos en día 2.

En base a las categorías morfológicas descriptas por Gardner,<sup>8</sup> se clasificaron los blastocistos en día 5 y 6 como:

- *Blastocistos de buena calidad*: blastocistos morfológicamente iguales o mejores que 3BB.
- *Blastocistos de calidad regular*: blastocistos con grado de expansión 1 y 2, o blastocistos 3BC o 3CB.
- *Embriones detenidos*: embriones no compactados o no cavitados, o blastocistos de aspecto atrésico en día 5-6.

Los blastocistos se vitrificaron y desvitrificaron con medios, soportes y protocolos de *Cryotech Lab*, modificados del método de *cryotop*.<sup>9</sup>

**Análisis de datos y estadística.** Se analizó el desarrollo a blastocisto según la calidad embrionaria en día 3 (embriones de buena, regular y mala calidad), según la edad de las pacientes (hasta 34 años, 35 a 39 años y 40 años o más); y según el tipo de incubadora utilizada (convencional o trigas). Se compararon entre los grupos el porcentaje obtenido de blastocistos de buena calidad (en día 5 y 6, o en día 5 vs 6), de blastocistos de calidad regular y de embriones detenidos.

Se analizaron las tasas de embarazo clínico obtenidas luego de 103 transferencias de blastocistos desvitrificados, realizadas en pacientes de hasta 39 años, hasta diciembre de 2015.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico *Med Calc* (10.2.0.0). Se compararon los resultados mediante Chi-cuadrado o Chi-cuadrado para tendencia lineal. Un  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## Resultados

Se analizaron 394 ciclos de FIV/ICSI realizados por 383 pacientes. En estas pacientes se llevaron a cultivo a blastocisto 1.445 embriones de día 3. De estos embriones, 376 (26%) desarrollaron blastocistos de buena calidad, 193 desarrollaron blastocistos de calidad regular (13%) y 876 (61%) se detuvieron durante el cultivo.

**Desarrollo a blastocisto de acuerdo a la calidad embrionaria.** Se partió de 688 (47%) em-

briones de buena calidad, 420 (29%) embriones regulares y 337 (23%) embriones de mala calidad. En la Tabla I se muestra el desarrollo hasta día 5-6 de acuerdo a la calidad de los embriones en día 3. En ella se observa que el 46% de los embriones de buena calidad se desarrollan en blastocistos de buena calidad, lo que es significativamente mayor que el desarrollo logrado por embriones regulares y de mala calidad. Por otro lado, un 36% de embriones de buena calidad se detienen durante su desarrollo; este porcentaje es menor que los detenidos provenientes de embriones regulares y de mala calidad ( $p < 0,0001$ ).

En base a los valores mostrados en la Tabla I, al analizar la predicción de desarrollo a blastocisto a partir de embriones clasificados en día 3, vemos que:

- De los 569 embriones que llegan a blastocisto, 437 eran embriones de buena calidad en día 3, lo que corresponde a una sensibilidad de la clasificación en día 3 de 76,8%.
- De los 876 embriones detenidos, 625 eran embriones de calidad regular y mala en día 3, lo que corresponde a una especificidad de 71,3%.
- La precisión en la predicción de desarrollo a blastocisto es de 73,5%.
- Del mismo modo, al analizar la predicción de desarrollo a blastocistos de buena calidad a partir de embriones clasificados en día 3, vemos que:
  - De los 376 blastocistos de buena calidad obtenidos, 317 eran embriones de buena calidad en día 3, lo que corresponde a una sensibilidad de 84,3%.
  - De los 1.069 embriones que formaron blastocistos de calidad regular o se detuvieron, 698 eran embriones de calidad regular y mala en día 3, lo que corresponde a una especificidad de 65%.
  - La precisión en la predicción de desarrollo a blastocistos de buena calidad es de 70,2%.

**Influencia de la edad materna en el desarrollo a blastocisto.** Para analizar la influencia de la edad de las pacientes en el desarrollo a blastocisto, en base a los resultados de la Tabla I analizamos solo el grupo de embriones de buena calidad en día 3.

Observamos que en los tres grupos etarios que

definimos (hasta 34 años, 35 a 39 años y 40 años o más), tanto la proporción de embriones que llegan a blastocistos como la de embriones que se detienen en su desarrollo es comparable (65%, 63% y 62%; y 36%, 37% y 38% respectivamente, Tabla II). De todos modos, observamos que las pacientes jóvenes (hasta 34 años) tienden a desarrollar blastocistos de buena calidad (3BB o mejores) en mayor proporción que las pacientes mayores de 34 años (50%, 43% y 37%,  $p = 0,080$ ).

**Tabla I.** Desarrollo hasta blastocistos según la calidad de los embriones en día 3.

	Calidad embrionaria en día 3			Total
	Buena	Regular	Mala	
Embriones cultivados	688	420	337	1445
Blastocistos de buena calidad (día 5 y 6)	317 (46)	54 (13)	5 (1)	376
Blastocistos de calidad regular (día 5 y 6)	120 (17)	53 (13)	20 (6)	193
Embriones detenidos	251 (36)	313 (75)	312 (93)	873

Los valores son n y (%) (\*)  $p < 0,0001$  entre los grupos.

**Tabla II.** Desarrollo hasta blastocisto de embriones de buena calidad en día 3 según la edad de la paciente.

	Edad de la paciente (años)		
	Hasta 34	35 a 39	40 o más
Embriones cultivados	369	267	52
Blastocistos totales en día 5 y 6	238 (65)	167 (63)	32 (62)
Blastocistos de calidad buena	184 (50)*	114 (43)*	19 (37)*
Blastocistos de calidad regular	54 (15)*	53 (20)*	13 (25)*
Embriones detenidos	131 (36)	100 (37)	20 (38)

Los valores son n y (%) (\*)  $p = 0,0080$  para tendencia lineal entre blastocistos de calidad buena vs regular entre los grupos.

**Desarrollo a blastocisto según el cultivo en incubadora trigas o convencional.** Para analizar el impacto de la incubadora utilizada en el desarrollo embrionario, en base a los resultados de las Tablas I y II analizamos solo el grupo de embriones de buena calidad en día 3, de pacientes de hasta 34 años.

Este análisis se muestra en la Tabla III. Se observa que tanto la tasa de embriones detenidos (34% vs 38%) como la de blastocistos de calidad buena y regular (51% vs 48% y 15% vs 14%) son comparables entre incubadoras. Sin embargo, es diferente la velocidad de desarrollo de los blastocistos de buena calidad, siendo más rápidos los de la estufa trigas (46% vs 31%,  $p < 0,0004$ ).

**Tabla III.** Desarrollo hasta blastocisto de embriones de buena calidad en día 3 según la incubadora utilizada en pacientes hasta 34 años.

	Incubadora	
	Trigas	Convencional
Embriones cultivados	224	125
Blastocistos totales en día 5 y 6	113 (51)	60 (48)
Blastocistos de calidad buena día 5	102 (46)*	39 (31)*
Blastocistos de calidad buena día 6	11 (5)*	21 (17)*
Blastocistos de calidad regular día 5 y 6	34 (15)	17 (14)
Embriones detenidos	77 (34)	48 (38)

Los valores son n y (%) (\*)  $p < 0,0004$  entre los grupos.

**Embarazo clínico obtenido luego de transferencias de blastocistos desvitrificados.** La mayoría de los blastocistos en esta población fueron vitrificados. En este estudio se analizaron 103 transferencias de blastocistos desvitrificados, realizadas en pacientes menores a 40 años hasta diciembre de 2015.

De estas 103 transferencias, 31 fueron de blastocistos de calidad regular y 72 de blastocistos de buena calidad. Las tasas de embarazo clínico obtenidas fueron respectivamente de 23% y 42% ( $p = 0,064$ , NS).

Al analizar los resultados de las 72 transferencias de blastocistos de buena calidad desvitrificados, no encontramos diferencias en las tasas de embarazo obtenidas entre incubadora convencional vs trigas, ni entre blastocistos vitrificados en día 5 o 6, si bien el número de pacientes es bajo para sacar conclusiones definitivas (Tabla IV).

**Tabla IV.** Tasa de embarazo clínico postdescongelación de blastocistos de buena calidad.

	Blastocistos desvitrificados		Total
	Día 5	Día 6	
Incubadoras convencionales	3/10 (46)	9/17 (58)	12/27 (45)
Incubadora trigas	16/33 (48)	2/12 (17)	18/45 (40)
<b>Total</b>	19/43 (44)	11/29 (38)	30/72 (42)

Los valores son embarazo clínico / transferencias y %. No se encontraron diferencias significativas.

## Discusión

En base a los resultados obtenidos podemos concluir en primer lugar que el porcentaje de embriones que se desarrollan a blastocistos es comparable en ambos tipos de incubadoras. De todos modos, el porcentaje de blastocistos que alcanzan su estadio de expansión en día 5 de cultivo es mayor en la estufa trigas, lo que nos indica que en estas condiciones de cultivo (5% de  $O_2$ ) los embriones se desarrollan con más rapidez. Fisher y Bavister demostraron que la concentración fisiológica de  $O_2$  en el tracto reproductor femenino es alrededor del 5%, lo que fundamenta que el sistema de cultivo logrado en las estufas trigas es más fisiológico para el desarrollo embrionario.<sup>10</sup>

Kirkegaard K y col habían encontrado una mayor velocidad de clivaje en los primeros estadios embrionarios (clivaje a 4 y 8 células) cuando se

incubaron los embriones en 5%  $O_2$ .<sup>11</sup> Estos autores sostienen que la proporción de blastocistos de buena calidad obtenidos en estufa convencional es significativamente menor. Efectos negativos por exposición de los embriones a concentración ambiental de  $O_2$  fueron también publicados por otros autores.<sup>12,13</sup> Como ya explicamos, esto no concuerda con nuestros resultados, en donde la proporción de blastocistos de buena calidad logrados en ambos tipos de incubadoras es semejante estadísticamente (aunque difiere la velocidad), así como la proporción de embriones que detienen su desarrollo.

Si bien nuestros resultados de embarazo luego de transferencia de blastocistos son preliminares, no vimos diferencias en las tasas de embarazo clínico comparando ambos tipos de incubadoras.

En segundo lugar, el cultivo embrionario individual nos permitió relacionar la calidad embrionaria en día 3 con el desarrollo hasta blastocisto y la calidad de los mismos.

Al analizar nuestra clasificación embrionaria en día 3 vimos que esta clasificación tiene buena predicción para desarrollo a blastocisto (73,5%) y a blastocistos de buena calidad (70,2%). Sin embargo, la presencia de un 36% de los embriones de buena calidad en día 3 que detuvieron su desarrollo durante el cultivo prolongado, señala la ventaja del desarrollo a blastocisto, que nos permite llevar a cabo una mejor selección embrionaria, evitando transferir embriones con probabilidades de detener su desarrollo.

Esto concuerda con las investigaciones que demuestran que alrededor del día 3 de cultivo tiene lugar una activación significativa del genoma embrionario,<sup>3</sup> a partir de la cual algunos embriones detienen su desarrollo debido a la presencia de anomalías genéticas.<sup>14,15</sup>

Por último, al estudiar el impacto de la edad de las pacientes sobre el desarrollo a blastocisto, vemos que la proporción de embriones de buena calidad que llegan a desarrollarse hasta día 5-6 es comparable entre pacientes de los diferentes grupos etarios. De todos modos, existe diferencia significativa en la formación de blastocistos de calidad buena vs regular entre los grupos, siendo el grupo de pacientes más jóvenes el que logra una proporción mayor de blastocistos de buena calidad.

Para concluir, al analizar los resultados obtenidos hasta el momento, vemos que el programa de



desarrollo a blastocisto llevado a cabo en nuestro laboratorio aporta un sistema de selección embrionaria más sensible y ventajoso con respecto a nuestro sistema de cultivo y selección embrionaria a día 3, que nos permite distinguir aquellos embriones que detendrían su desarrollo en cultivo, transfiriendo de esta manera embriones con mayor potencial de viabilidad y vitrificando blastocistos con un mejor pronóstico de embarazo acumulativo.

Queda pendiente analizar una población de mayor tamaño para poder concluir si la diferencia de velocidad observada en la formación de blastocistos entre incubadoras se traslada a las tasas de embarazo clínico, que hasta el momento son estadísticamente comparables.

## Referencias

1. Gardner DK, Leese HJ. Non-invasive measurement of nutrient uptake by single cultured pre-implantation mouse embryo. *Hum Reprod.* 1986; 1: 25-27.
2. Leese HJ, Lenton EA. Glucose and Lactate in human follicular fluid: concentration and interrelationship. *Hum Reprod.* 1990; 5: 915-919.
3. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of pre-implantation development. *Nature* 1988; 332: 459-461.
4. Zhang P, Zucchelli M, Bruce S y col. Transcriptome profiling of human pre-implantation development. *PLoS one* 2009; 4(11): e7844.
5. Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L y col. A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 3434-3440.
6. Gardner DK, Vella P, Lane M y col. Culture and transfer of human blastocyst increases implantation rates and reduce the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998b; 69: 84-88.
7. Van Royen E, Mangelschots K, Vercruyssen M y col. Multinucleation in cleavage stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 18: 1062-1069.
8. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T y col. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73: 1155-1158.
9. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67: 73-80.
10. Fisher B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of Rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993; 99: 673-679.
11. Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ. Effect of oxygen concentration on human embryo development evaluated by time-lapse monitoring. *Fertil Steril* 2013; 99: 738-744.
12. Pabon JE, Findley WE, Gibbons WE. The toxic effect of short exposures to the atmospheric oxygen concentration on early mouse embryonic development. *Fertil Steril* 1989; 51: 896-900.
13. Wale PL, Gardner DK. Time lapse analysis of mouse embryo development in oxygen gradients. *Reprod. Biomed. Online* 2010; 21: 402-410.
14. 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: 1654-1958.
15. Staessen C, Platteau P, Van Asche 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.