

Puesta en marcha de un programa de cultivo a blastocisto

Camila Frautschi, Constanza Peretti, Anahí D'Agostino, Mariana Hernández, Gustavo Estofan, Andrea Dematteis

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

Reproducción 2019;34(1):16-20

Resumen

Objetivos. Evaluar eficacia de transferencia en día 5, comparando resultados entre pacientes que realizaron cultivo, transferencia y criopreservación de embriones solo hasta día 3, mixto y solo hasta día 5. **Materiales y métodos.** Estudio retrospectivo que compara tres grupos según día de transferencia y/o vitrificación: Día 3 (911 ciclos), Mixto (530 ciclos), y Día 5 (408 ciclos). Se comparó edad de las pacientes, cantidad de ovocitos clivados, embriones detenidos, viables y transferidos, tasa de embarazo clínico por transferencia y acumulada por ciclo, y tasa de embarazo gemelar. Se usaron test de Kruskal Wallis, y Chi-cuadrado o Chi-cuadrado para tendencia lineal. Un $p < 0,05$ se consideró significativo. **Resultados.** Los grupos Día 3, Mixto y Día 5 mostraron porcentajes crecientes de embriones detenidos, menos transferencias por paciente y menos embriones por transferencia.

Los grupos D3 y Mixto fueron comparables para embarazo clínico por transferencia y acumulada por ciclo, mientras que Día 5 tuvo valores mayores en ambos. La tasa de embarazo múltiple disminuyó significativamente entre los grupos D3, Mixto y D5. **Conclusión.** Nuestro programa a blastocisto logra una mejor selección embrionaria, permitiendo transferir el mejor embrión en menor tiempo y

con mayor tasa de embarazo, con una disminución de las tasas de embarazo múltiple y del número de embriones criopreservados.

Palabras claves. Embriones, blastocisto, embarazo acumulado.

Implementation of a blastocyst culture program

Summary

Objectives. To evaluate efficacy of culture until Day 5, comparing results between patients who performed culture, transfer and cryopreservation of embryos only until Day 3, Mixed and only until Day 5. **Materials and methods.** Retrospective study that compares three groups according to day of transfer and/or vitrification: Day 3 (911 cycles), Mixed (530 cycles), and Day 5 (408 cycles). The age of the patients, number of clivated oocytes, arrested, viable and transferred embryos, clinical pregnancy rate per transfer and cumulative pregnancy per cycle, and multiple pregnancy rates were compared. We used Kruskal Wallis test, and Chi-square or Chi-square test for trend. $p < 0.05$ was considered significant. **Results.** The groups Day 3, Mixed and Day 5 showed increasing percentages of embryos arrested, lower number of transfers per patient and fewer embryos per transfer.

Groups D3 and Mixed were comparable for clinical pregnancy per transfer and cumulative pregnancy per cycle, while Day 5 had higher values in

Correspondencia: Camila Frautschi
Chacabuco 1089. Córdoba 5000. CIGOR (Centro Integral de Ginecología, Obstetricia y Reproducción). Córdoba, Argentina.
Correo electrónico: camifrautschi@gmail.com

both. The multiple pregnancy rates decreased significantly between the groups D3, Mixed and D5. Conclusion. Our blastocyst program achieves a better embryo selection, allowing transferring the best embryo in less time and with higher pregnancy rate, with a decrease of the rates of multiple pregnancy and the number of cryopreserved embryos.

Key words. Embryos, blastocyst, cumulative pregnancy.

Introducción

En el laboratorio de FIV, contar con un buen programa de cultivo de embriones es fundamental para lograr las mejores tasas posibles de embarazos.¹ El desarrollo embrionario hasta día 5 posibilita la selección de un único embrión a transferir ya que permite seleccionar el mejor en su cohorte. Su introducción en los laboratorios ha sido posible gracias a la aparición de medios de cultivo adaptados a los requerimientos metabólicos necesarios para lograr el desarrollo embrionario hasta día 5-6.²⁻⁴

En nuestro centro, históricamente se realizó cultivo embrionario hasta día 3 de desarrollo, transfiriendo en día 2 o 3 y criopreservando en día 3.

A partir de la comercialización en el país de medios de cultivo secuenciales, pudimos incorporar los para realizar la selección embrionaria más allá del día 3.

Esta incorporación requiere poner a punto el cultivo prolongado y evaluar si los embriones de aspecto viable en día 3 que detienen su desarrollo en los días posteriores lo hacen por su propia competencia embrionaria o por fallas en el sistema de cultivo.⁵

Por otra parte, requiere la elección y validación de un criterio de evaluación de morfología reproducible en día 5 y con capacidad para predecir los resultados, y un adecuado programa de vitrificación de blastocistos para asegurar su viabilidad para futuras transferencias.

Finalmente, durante la puesta a punto del programa de cultivo prolongado se debe realizar controles de calidad para verificar que los resultados sean iguales o mejores que con el programa de cultivo hasta día 3.

La incorporación del cultivo prolongado en nuestro laboratorio se hizo de manera gradual, primero transfiriendo y congelando en día 3 y dejando a día 5 solo embriones de viabilidad dudosa; luego transfiriendo y congelando en día 3 y dejando a día 5 uno o dos embriones viables. A medida que se transferían los primeros blastocistos desvitrificados,⁶ fuimos adquiriendo confianza y se comenzó a transferir en fresco en día 5, congelando a veces algunos embriones en día 3, hasta que finalmente logramos transferir y vitrificar ciclos completos en día 5-6.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficacia del programa de transferencia en día 5, comparando los resultados acumulados obtenidos entre pacientes que realizaron cultivo, transferencia y criopreservación solo hasta día 3, mixto y solo hasta día 5.

Materiales y métodos

Diseño: retrospectivo de cohorte.

Pacientes

Se analizaron retrospectivamente los tratamientos de alta complejidad realizados entre enero de 2011 y diciembre de 2017. Se incluyeron pacientes de 20 a 39 años (promedio 34.1±3.4) que realizaron ICSI con ovocitos propios frescos, sin diagnóstico genético preimplantatorio, con espermatozoides de eyaculado o recuperados mediante biopsia testicular, y que tuvieron 4 o más ovocitos fertilizados clivados en el día 2 de cultivo.

Estimulación ovárica, sistema de cultivo y criopreservación

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 y se realizó la aspiración 36 horas después.

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*, gradientes de den-

sidad (Isolate, Irvine SC) o solo centrifugación.

Los ovocitos y embriones se cultivaron de manera individual en microgotas de 20 μ l bajo aceite. Se usaron medios convencionales en los pacientes que se cultivaron solo hasta día 3 durante 2011 y 2012 (HTF suplementado con SSS, Irvine SC) y medios secuenciales a partir de agosto de 2012 (Vitrolife o Sage).⁷ Dos tipos de incubadoras fueron utilizadas: convencional (Forma, Thermo Scientific) y trigas (K-system), ajustando el CO₂ de las incubadoras para cada medio de cultivo, de modo tal que se lograra un pH entre 7,2 y 7,3.

El ICSI se realizó a las 5 h posaspiración. 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 respectivamente, y la morfología de los blastocistos en días 5 y 6.

La clasificación embrionaria en día 3 fue hecha en base a multinucleación en día 2, cantidad y simetría de blastómeros en día 3, presencia de fragmentos extra citoplasmáticos y aspecto del citoplasma (vacuolas, gránulos, etc).⁶ La clasificación embrionaria en día 5-6 se basó en las categorías morfológicas descriptas por Gardner.⁸

Siempre que hubiera embriones o blastocistos de buena y mediana calidad, se eligieron estos para transferir y vitrificar. Solo se transfirieron o vitrificaron embriones de calidad regular o mala en los casos en los que no hubo otra posibilidad de elección dentro de la cohorte.

Los embriones y blastocistos se vitrificaron y desvitrificaron con medios, soportes y protocolos de Cryotech lab, modificados del método de cryotop.⁹

Para las transferencias se realizó eclosión asistida en caso de zona pelúcida engrosada o en pacientes de 38 y 39 años, y para todos los casos de blastocistos y embriones criopreservados.

Las transferencias de embriones y blastocistos descongelados se realizaron en ciclos naturales o estimulados según indicación médica.

Análisis de datos y estadística

Los ciclos se dividieron de acuerdo con el día de transferencia y vitrificación en tres grupos:

- Grupo Día 3: transferencia embrionaria en fresco en día 2 o 3, vitrificación en día 3.

- Grupo Mixto: transferencia embrionaria en fresco en día 2, 3 o 4; vitrificación en días 3, 5 y 6.

- Grupo Día 5: transferencia embrionaria en día 5, vitrificación en días 5 y 6.

Se comparó entre los grupos: edad de las pacientes, cantidad de ovocitos fertilizados clivados en día 2, proporción de embriones detenidos (embriones viables/2pn clivados en día 2), cantidad de embriones viables obtenidos, cantidad de embriones viables transferidos, tasa de embarazo clínico por transferencia, tasa de embarazo clínico acumulada por ciclo, y tasa de embarazo gemelar.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Med Calc (10.2.0.0). Se utilizó test de D'Agostino-Pearson para evaluar la normalidad de las variables. Se compararon los promedios mediante test de Kruskal Wallis, y los resultados porcentuales mediante test de Chi-cuadrado o Chi-cuadrado para tendencia lineal. Un $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

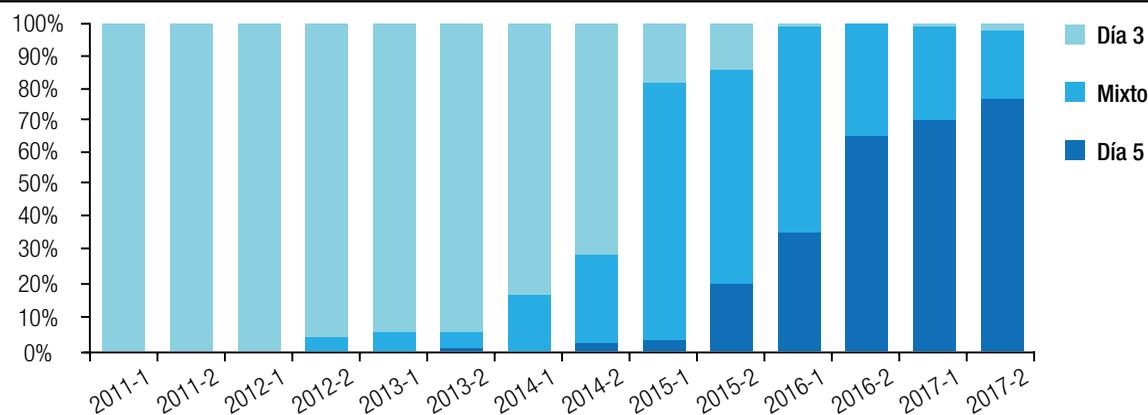
El estudio comprendió 1597 pacientes que realizaron 1849 ciclos de ICSI, 1348 transferencias en fresco y 1989 transferencias de embriones criopreservados. Se lograron en total 1085 embarazos clínicos de los cuales 146 fueron gemelares.

La aparición y superposición de los grupos en el tiempo se muestra en la Figura 1: el Grupo D3 (911 ciclos) comprende ciclos iniciados entre enero de 2011 y diciembre de 2015, el Grupo Mixto (530 ciclos), de octubre de 2012 a la actualidad, y el Grupo D5 (408 ciclos), de agosto de 2013 a la actualidad.

La tabla 1 muestra la distribución de las pacientes en los grupos D3, Mixto y D5. La edad de las pacientes fue comparable entre los grupos, al igual que la cantidad de ovocitos fertilizados (2pn) clivados en día 2.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos de los grupos estudiados.

Los grupos Día 3, Mixto y Día 5 tuvieron resultados significativamente diferentes, con porcentajes crecientes de embriones detenidos, promedio decreciente de embriones viables, menos transferencias realizadas por paciente y menos embriones transferidos en cada transferencia.

Figura 1. Grupos de cultivo y criopreservación hasta Día 3, Mixto o Día 5. Aparición y superposición de los grupos en el tiempo.**Tabla 1.** Distribución de las pacientes en los grupos comparados.

	Día 3	Mixto	Día 5
N	911	530	408
Edad*	34,0 ± 3,3 ^a	34,2 ± 3,5 ^b	34,2 ± 3,4 ^c
2pn clivados en día 2*	5,9 ± 1,9 ^d	6,1 ± 1,8 ^e	6,0 ± 1,7 ^f
Transferencias realizadas (fresco + crío)	1738	928	671
Embriones viables obtenidos	4190	2063	1390
Embriones transferidos	3232	1459	802
Embarazos clínicos (fresco + crío)	528	290	267
Embarazos gemelares (fresco + crío)	99	34	13

* Los valores son promedio más desvío estándar. ^{abc} NS ^{def} NS

Tabla 2. Resultados obtenidos en los grupos comparados.

	Día 3	Mixto	Día 5	p
2pn clivados detenidos	23%	36%	43%	<0,0001
Embriones viables obtenidos*	4,6 ± 1,6	3,9 ± 1,5	3,4 ± 1,5	<0,0001
Embriones por transferencia*	1,89 ± 0,3	1,63 ± 0,4	1,21 ± 0,4	<0,0001
Transferencias realizadas por ciclo*	1,91 ± 0,8	1,75 ± 0,9	1,67 ± 0,9	<0,0001
Embarazo clínico por transferencia	30% ^a	31% ^b	40% ^c	^a <0,0001 ^{bc} =0,0002
Embarazo clínico acumulado por ciclo	58% ^d	55% ^e	65% ^f	^{df} =0,0204 ^{ef} =0,0020
Embarazos gemelares	19%	12%	5%	=0,0002

* Los valores son promedio más desvío estándar.

Los grupos D3 y Mixto tuvieron tasas comparables de embarazo clínico por transferencia y de embarazo acumulado por ciclo, mientras que se observaron mayores tasas de embarazo clínico por transferencia y de embarazo acumulado por ciclo en las pacientes del grupo D5, con desarrollo de toda la cohorte a blastocisto, siendo estas significativamente mayores.

La tasa de embarazo múltiple disminuyó significativamente entre los grupos D3, Mixto y D5.

Discusión

En nuestro estudio, los grupos fueron comparables en cuanto a la edad y el número de ovocitos fertilizados clivados. El parámetro tomado, 4 o más ovocitos fertilizados clivados en día 2, fue elegido como criterio de inclusión ya que ese número mínimo permite seleccionar lo que se transfiere y criopreserva desde día 3.

En las tres poblaciones, la cantidad de embriones clivados en día 2 fue comparable, mientras que la cantidad de embriones viables disminuyó de manera lineal entre los grupos D3, mixto y D5. De manera inversa, la tasa de embriones diagnosticados como detenidos aumentó a medida que se sumaron días de cultivo.

Esta diferencia se debe, en principio, a la selección natural ocurrida en cultivo al comenzar a transcribir el genoma embrionario,⁵ que permite identificar en día 5 embriones evaluados como viables o posiblemente viables en día 3 que detienen su desarrollo en días posteriores.

Si hubiera un mal sistema de cultivo embrionario prolongado, tendríamos una pérdida de embriones viables hacia día 5. En ese caso, tendríamos que encontrar una tasa de detención más alta en día 5 acompañada de una tasa de embarazo acumulado menor que la obtenida en día 3 (ya que se estarían perdiendo embriones con potencial implantatorio).

En base a las tasas de embarazo acumuladas obtenidas por los tres grupos podemos concluir que la detención se debe a dificultades metabólicas intrínsecas de los embriones para seguir adelante con su desarrollo y no al sistema de cultivo, ya que la tasa de embarazo acumulada no disminuye.

Al analizar las transferencias, vemos que el promedio de embriones transferidos disminuyó significativamente entre los grupos D3, Mixto y D5, de manera que en D5 se transfirió en general un solo blastocisto.

El grupo D5 presentó la mayor tasa de embarazo clínico por transferencia. Esto se debe a que, el hecho de poder dejar evolucionar hasta D5 nos permite transferir un único embrión con una mejor evaluación de su viabilidad. La transferencia de embrión único produjo además la menor tasa de embarazo gemelar para este grupo y un menor número de transferencias.

Hasta aquí, los resultados obtenidos se asemejan a lo descrito en la bibliografía para cultivo a día 5 comparado con día 3: menor cantidad de embriones viables para transferir y criopreservar, menor cantidad de transferencias hasta lograr embarazo, mejor tasa de embarazo por transferencia.^{1, 10}

Sin embargo, en nuestra población, las pacientes del grupo D5 obtuvieron mejores tasas de embarazo clínico acumuladas por ciclo que las de los otros grupos.

Este es un resultado no esperado, ya que si bien la selección embrionaria nos permite reducir el número de transferencias necesarias para lograr un embarazo, la tasa acumulada por ciclo debería ser similar.¹⁰ Esto se podría explicar por al menos dos factores: 1) la sin-

cronía que se produce entre el embrión de día 5 y el útero no estimulado podría ser un factor beneficioso para la implantación; 2) la mejor sobrevida luego de la criopreservación de blastocistos comparada con embriones de día 3 debido al menor tamaño celular.

Si bien desconocemos el motivo de esta diferente tasa acumulada, otros autores han tenido este mismo resultado.¹¹

Conclusión

Como conclusión de este trabajo, nuestro programa a blastocisto alcanza los resultados esperados: nos permite una mejor selección embrionaria, lo cual acorta el tiempo necesario de tratamiento a la paciente, logrando transferir el mejor embrión en menor tiempo. Además disminuye las tasas de embarazo múltiple, mantiene o mejora las tasas de embarazo y disminuye la cantidad de embriones criopreservados.

Referencias

1. Glujovsky D, Farquhar C, Quinteiro Retamar AM et al. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *The Cochrane Library* 2016.
2. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 1997; 3 (4): 367-382.
3. Quinn P. The development and impact of culture media for assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2004; 81 (1): 27-29.
4. Swain JE. Optimal human embryo culture. *Seminars in reproductive medicine* 2015; Thieme Medical Publishers.
5. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four-and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 1988; 332 (6163): 459.
6. Dematteis A, D'Agostino A, Frautschi C et al. Experiencia en desarrollo a blastocisto en cultivo individual en incubadoras trigas y convencional. *Reproducción* 2017; 32: 20-25.
7. Sfountouris IA, Martins WP, Nastri CO et al. Blastocyst culture using single versus sequential media in clinical IVF: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33 (10): 1261-1272.
8. Gardner DK, Lane M, Stevens J et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000; 73 (6): 1155-1158.
9. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007; 67 (1): 73-80.
10. De Vos A, Van Landuyt L, Santos-Ribeiro S et al. Cumulative live birth rates after fresh and vitrified cleavage-stage versus blastocyst-stage embryo transfer in the first treatment cycle. *Hum Reprod.* 2016; 31 (11): 2442-2449.
11. Tong GQ, Cao SR, Wu X et al. Clinical outcome of fresh and vitrified-warmed blastocyst and cleavage-stage embryo transfers in ethnic Chinese ART patients. *Journal of ovarian research.* 2012; 5 (1): 27.