

Revisión

Tema presentado en el congreso 1^{er} ALMER 2018, Buenos Aires

Estrategias de vitrificación de embriones y blastocistos para transferencias diferidas

Lic. Iván Anduaga Marchetti

Director del laboratorio de fertilización in vitro, Nascentis.
Córdoba, Argentina.

Reproducción 2019;34:38-43

En las últimas tres décadas el número de ciclos de transferencias de embriones criopreservados ha aumentado considerablemente respecto de ciclos de transferencias en fresco. Los reportes anuales de los Estados Unidos demuestran un incremento del 82,5% entre 2006 y 2012 para ciclos criopreservados, mientras que las transferencias de ciclos en fresco solo aumentaron un 3,1%.¹ Los datos aportados por los países europeos entre el 2010 y el 2014 muestran un incremento del 27,5% para ciclos de FIV/ICSI, siendo que los ciclos de criopreservación de embriones alcanzan un 67,5%.^{2, 3} En América Latina entre los años 2006 y 2014 el número de ciclos de transferencias de embriones criopreservados aumentó un 442,5% (de 3117 a 16.910), en comparación con el número de ciclos de transferencias en fresco, que aumentaron un 95,1% (de 23.534 a 45.915).^{4, 5}

Tradicionalmente, la criopreservación de embriones mediante la técnica de congelación lenta estuvo limitada a solucionar situaciones

de existencia de embriones supernumerarios de buena calidad luego de una transferencia, a reducir los riesgos de hiperestimulación ovárica y, en menor medida, a la acumulación de embriones destinados al diagnóstico genético preimplantatorio. A lo largo de estos últimos años, el desarrollo de nuevas metodologías tales como la vitrificación ha permitido el reemplazo de la congelación lenta como técnica de elección para criopreservación embrionaria, debido a que ofrece mejores resultados de sobrevida luego de la desvitrificación, al no formar cristales de hielo dañinos para la integridad de la membrana celular;⁶ de esta manera se han logrado mejores resultados de embarazo clínico (EC) y tasa de nacidos vivos (TNV).⁷

Como consecuencia de este cambio de técnicas y de las mejoras en los resultados clínicos obtenidos, aparece una expansión del espectro de posibles beneficios de la vitrificación de embriones, y ahora resulta interesante indagar sobre la posibilidad de mejorar el éxito reproductivo de más pacientes mediante la opción de la transferencia diferida. Así, la criopreservación de

Correspondencia: Iván Anduaga Marchetti
Correo electrónico: anduagami@gmail.com

embriones se transforma en una técnica complementaria al FIV/ICSI, que requiere análisis detallados acerca de los beneficios de realizar transferencias de embriones vitrificados-desvitrificados en comparación con las transferencias realizadas en fresco, para no perjudicar a los pacientes. Para lograr esta premisa, es necesario ser críticos con el funcionamiento del laboratorio de fertilización in vitro y el manejo clínico de los pacientes, y al mismo tiempo se debe controlar, evaluar y recalibrar en tres aspectos fundamentales del programa de cultivo y criopreservación:

1) Puesta a punto de las condiciones de cultivo del laboratorio

- a) Es necesario seleccionar el mejor medio de cultivo, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de embriones de buena calidad para criopreservar.
- b) Considerar que mejores resultados de éxito reproductivo se logran con transferencia de blastocisto, por ende, es preferible criopreservar blastocistos a embriones de día 2 o 3.

2) Puesta a punto del programa de vitrificación de embriones

- a) Es indispensable elegir un medio de vitrificación, un protocolo adecuado y que sea reproducible en el tiempo.
- b) Establecer rigurosos criterios de selección de los embriones a vitrificar, un aspecto clave para el éxito del programa.
- c) Evaluar en el tiempo los resultados del programa de vitrificación y realizar cambios pertinentes si fuese necesario.

3) Selección de pacientes adecuados para transferencia diferida

- a) Probablemente no todos los pacientes se puedan beneficiar de la misma forma de un programa de transferencias diferidas. Cada institución debería evaluar los beneficios y desventajas para cada caso particular.

A partir de las evidencias anteriores, resulta de especial interés indagar acerca del impacto de la vitrificación sobre los resultados reproductivos de los pacientes y, específicamente, sobre cómo en algunas situaciones particulares (elevados valores de progesterona previos a la transferencia, realización de PGT-A) podrían verse beneficiados por el uso de esta técnica.

Transferencias con ciclos criopreservados vs. ciclos en fresco

Si bien no son muchos los trabajos robustos que sean prospectivos, aleatorios y que comparen transferencias en fresco y diferidas, existen algunos trabajos de gran magnitud que brindan información contundente. Zhu et al. analizaron retrospectivamente 20.267 ciclos de transferencias diferidas de embriones desvitrificados y hallaron una tasa de nacidos vivos del 50,74% (n = 10.497). Describieron dos factores principales que inciden en el éxito reproductivo: 1) edad: en mujeres menores de 31 años el 63,8% logra un nacido vivo, mientras que el grupo de mujeres mayores a 40 años solo el 4,7% logra un nacido vivo, y 2) número de ovocitos recuperados: 1-5 con un 20,6% de nacidos vivos, mientras que de 6-10 ya se obtienen resultados de nacidos vivos de 58,36%, logrando el mayor resultado de 90,09% de nacidos vivos con más de 25 ovocitos recuperados.⁸

Por otro lado, también se ha descrito el efecto del estadio del blastocisto transferido sobre los resultados clínicos de la criopreservación. En este sentido, Desai et al. compararon retrospectivamente el efecto de la transferencia de blastocistos de día 5 y día 6 en 354 transferencias de desvitrificados y hallaron una diferencia significativa en la tasa de implantación (50% vs. 29%), tasa de embarazo clínico (65% vs. 40%) y una TNV del 58% para blastocistos de día 5 y del 32% para blastocistos de día 6.⁹ En este mismo trabajo también se demostró que el grado de desarrollo del macizo celular interno (MCI), el desarrollo del trofoectodermo (TE) y el grado de reexpansión luego de la desvitrificación son

claves para el éxito reproductivo; sin embargo, la reexpansión del blastocisto luego de la desvitrificación es más importante que la calidad del MCI y el TE al momento de seleccionar un embrión a transferir. Además, el riesgo de lograr un embarazo ectópico según el día de vitrificación también fue reportado: Du et al. hallaron una menor tasa en transferencia de blastocistos respecto a la de embriones clivados (D6 0,6% < D5 2,0% < D3 3,1%).¹⁰

Las revisiones sistemáticas de Maheshwari et al. y Roque et al. demuestran que las transferencias de embriones congelados tienen mejores resultados obstétricos y perinatales, disminuyen el riesgo de hemorragia preparto, placenta previa, desprendimiento de placenta, reducción del riesgo de parto pretérmino, mayor tasa de nacidos vivos, mayor peso al nacer, menor mortalidad perinatal y mortalidad infantil respecto de transferencias de ciclos en fresco.^{11, 12} Los trabajos de Shapiro et al. y Pelkonen et al. han demostrado lo mismo.^{13, 14}

Probablemente, los resultados de las transferencias de embriones criopreservados podrían verse beneficiados por una mejor condición fisiológica del útero debido a la ausencia de los efectos de la estimulación ovárica sobre el endometrio, y/o por los niveles suprafisiológicos de estrógenos y progesterona que podrían afectar la expresión de genes involucrados en la receptividad endometrial,^{15, 16} afectando de esta manera la implantación y el subsiguiente desarrollo embrionario.¹⁷

Anomalías congénitas

Entre las décadas del 1980 y 1990 el riesgo de malformaciones congénitas en bebés nacidos mediante técnicas de reproducción asistida eran entre un 30% y un 40% superiores respecto de la población general;¹⁸ sin embargo, Kallen et al. reportaron un incremento menor del 15% de

malformaciones congénitas para las TRA (5,3%) vs. población general (4,4%).¹⁹ Por su parte Liberman et al. reportaron un incremento de las malformaciones congénitas no cromosómicas en la población que realizó un tratamiento de FIV/ICSI respecto de la población subfétil. A su vez, ambas poblaciones mostraron un aumento de malformaciones respecto de la población fértil (199,1; 171,8 y 138,9 cada 10.000 nacimientos respectivamente).²⁰

La criopreservación de embriones es un procedimiento complementario al FIV/ICSI, que en sí mismo puede generar un incremento de las anomalías congénitas según la técnica empleada. La técnica de congelación lenta no ha mostrado un aumento significativo de las anomalías congénitas comparado con la población que realiza tratamientos de FIV/ICSI (4,2% vs. 4,5% respectivamente); no obstante ambas están aumentadas respecto de la población que logró un embarazo espontáneo (3,2%).²¹ En cuanto a la técnica de vitrificación, Kato et al. reportaron, sobre 6623 nacimientos simples, un incremento de 1,9% a 2,4% de anomalías congénitas en niños nacidos de procedimientos de FIV con transferencia en fresco respecto de transferencia de ciclos vitrificados-desvitrificados; sin embargo, la mortalidad perinatal fue similar: de 0,5% a 0,6% entre transferencia en fresco y vitrificados-desvitrificados, respectivamente.²²

Efecto de la progesterona

Si bien un metaanálisis de Venetis et al. sugiere que no existen diferencias entre bajos y elevados valores de progesterona en el día de la administración de gonadotropina coriónica humana (HCG) en tratamientos de FIV/ICSI y los resultados de embarazos clínicos,²³ es escasa la literatura de estudios prospectivos y aleatorios en ciclos de criopreservación de embriones. Sin embargo, un trabajo observacional muy peque-

ño de Roque et al. encontró que las pacientes a las cuales se les había diferido la transferencia embrionaria por elevado valor de progesterona (P) ($\geq 1,5$ ng/ml) en el día 3 del desarrollo embrionario obtuvieron una mayor TNV (26,5% vs. 19,9%), embarazo clínico (46,4% vs. 35,9%) y embarazo clínico en curso (39,7% vs. 31,1%) respecto de pacientes con transferencia en fresco.²⁴ Otro estudio de cohorte emparejado retrospectivo, con 1455 ciclos de transferencia diferida y 13.791 ciclos con transferencia en fresco, encontró una mayor tasa de implantación (46,8% vs. 42,0%) y una mayor tasa de embarazo clínico en curso (52,0% vs. 45,3%) en pacientes con transferencias diferidas respecto de transferencias en fresco.²⁵ En este trabajo, además, en mujeres mayores de 35 años con valores de $p > 1$ ng/ml, la tasa de embarazo clínico en curso fue del 48,4% para transferencias diferidas respecto del 35,2% para transferencia en fresco.²⁵ Por otro lado Du et al. hallaron un incremento de la tasa de embarazos ectópicos 3,7%, 3,5%, 2,0% según el espesor del endometrio < 8 mm, 8-11 mm y > 8 mm respectivamente, como así también si el ciclo fue preparado hormonalmente (3,5%) o natural (2,4%).¹⁰ No obstante, trabajos más robustos prospectivos, controlados y aleatorios son necesarios.

PGTA

Si bien se podría sugerir que la combinación del cultivo extendido a blastocisto y la realización de PGT-A es beneficiosa para la obtención de mejores tasas de éxito reproductivo, la revisión bibliográfica sugiere que aún no existen rigurosos trabajos científicos que lo demuestren. En este sentido, debería indagarse sobre qué factores y qué combinaciones son más importantes a la hora de mejorar las tasas: transferencia en fresco vs. diferida y realización o no de PGT-A, siempre considerando la edad de la paciente y la procedencia de los ovocitos utilizados (propios o de donante). Además, sería

importante analizar la posible reducción de las tasas de aborto espontáneo, debido a que se sugiere que este sería uno de los resultados beneficiosos del PGT-A. No obstante, algunos autores han comenzado a investigar estos aspectos, y, en particular, el trabajo de Coates A. et al. demuestra que los resultados de las transferencias de embriones euploides (blastocistos de día 5 analizados mediante técnicas de secuenciación masiva) se ven influenciados por el tipo de transferencia realizada. Específicamente, la tasa de embarazo clínico en curso fue del 80% con transferencias diferidas vs. 61% con transferencias en fresco (realizadas en día 6), mientras que la tasa de nacido vivo fue de 77% vs. 59%, diferidas y en fresco respectivamente.²⁶ Es evidente la escasa información que hay al respecto de la mejor estrategia en casos de PGT-A (vitrificación de blastocistos o transferencia en fresco).

Conclusiones y consideraciones finales

En la última década la técnica de vitrificación para criopreservar embriones se ha convertido en el *gold* estándar debido a los resultados obtenidos, principalmente por el bajo daño celular causado por la ausencia o baja formación de cristales de hielo posdesvitrificación, y como consecuencia una mayor tasa de supervivencia y reducción de la tasa de cancelación de transferencias. Debido a esto, la vitrificación ha incentivado el incremento de las cancelaciones de transferencias en fresco y un aumento de los ciclos de transferencias diferidas. Actualmente se conoce que el porcentaje de reexpansión luego de la desvitrificación es clave para el éxito reproductivo y que mayores tasas de implantación, embarazo clínico y nacido vivo se logran con blastocistos de día 5 respecto de embriones de día 3 o día 2. Sin embargo, aún son escasos los trabajos prospectivos, controlados y aleatorios que comparen las tasas de embarazo clínico, los resultados perinatales y de anomalías congénitas en población neonatal de transfe-

rencias diferidas respecto de transferencias en fresco.

Por otro lado, no existe un consenso adecuado sobre los protocolos de vitrificación empleados, sobre el estadio a congelar sobre la preparación endometrial adecuada, y se desconocen los efectos epigenéticos que los crioprotectores son capaces de producir sobre los embriones y los neonatos.

Si bien en décadas anteriores la criopreservación de embriones estuvo confinada a pacientes con riesgo de hiperestimulación ovárica, embriones supernumerarios luego de una transferencia o PGTM/PGTA, en la actualidad, pacientes con elevado valor de P en fase folicular tardía o estradiol elevado podrían beneficiarse al diferir la transferencia. Mientras tanto, aparece en la actualidad una búsqueda destinada a descifrar qué otros pacientes podrían beneficiarse con este procedimiento extra al ciclo de FIV/ICSI. Trabajos prospectivos, controlados y aleatorios son necesarios para confirmar esta práctica en determinados pacientes que realizan tratamientos de reproducción asistida.

Referencias

- Center for Disease Control and Prevention. Assisted reproductive technology (ART). Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/art/reports/2013/national-summaryfigures.html>.
- Kupka MS, Ferratterri AP, de Mouzon J et al. and the European IVF-Monitoring (EIM) Consortium, for the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2010; results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2014; 29: 2099-2113.
- De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS et al. ART in Europe, 2014: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2018; 33: 1586-1601.
- Zegers-Hochschild F, Galdames V, Schwarze JE. *Reporte Redlara* 2005. Disponible en línea: http://redlara.com/aa_espanhol/registro_anual.asp
- Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Crosby JA et al. Assisted reproductive techniques in Latin America: The Latin American Registry, 2014. *JBRA Assisted Reproduction* 2017; 21 (3): 164-175.
- Chian R, Kuwayama M, Tan L et al. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *J Reprod Dev* 2004; 50: 685-696.
- Balaban B, Urman B, Ata B et al. Randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod* 2008; 23: 1976-1982.
- Zhu Q, Chen Q, Wang L et al. Live birth rates in the first complete IVF cycle among 20684 women using a freeze-all strategy. *Hum Reprod* 2018; 33: 924-929.
- Desai N, Ploskonka S, Goodman L et al. Delayed blastulation, multinucleation and expansion grade are independently associated with live-birth rates in frozen blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 2016; 106: 1370-1378.
- Du T, Chen H, Fu R et al. Comparison of ectopic pregnancy risk among transfer of embryos vitrified on day 3, day 5, day 6. *Fertil Steril* 2017; 108: 108-115.
- Maheshwari A, Pandey S, Shetty A et al. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2012; 98: 368-377.
- Roque M, Lettes K, Serra S et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2013; 99: 156-162.
- Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC et al. Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril* 2014; 102: 3-9.
- Pelkonen S, Koivunen R, Gissler M et al. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: the Finish cohort study 1995-2006. *Hum Reprod* 2010; 25: 914-923.
- Van Vaerenbergh I, Fatemi HM, Blockeel C et al. Progesterone rise on hCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *RBM Online* 2011; 22: 263-271.
- Horcajadas JA, Riesewijk A, Polman J et al. Effect of controlled ovarian hyperstimulation in IVF on endometrial gene expression profiles. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 195-205.

17. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC et al. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfers in high responders. *Fertil Steril* 2011; 96: 516-518.
18. Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet* 2004; 21: 437-443.
19. Kallen B, Finnstrom O, Lindam A et al. Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Res (Part A)* 2010; 88: 137-143.
20. Liberman R, Getz KD, Heinke D et al. Assisted reproductive technology and birth defects: effects of subfertility and multiple births. *Birth Defects Res* 2017; 109 (14): 1144-1153.
21. Pelknen S, Hartikainen AL, Ritvanen A et al. Major congenital anomalies in children born after frozen embryo transfer: a cohort study 1995-2006. *Hum Reprod* 2014; 29: 1552-1557.
22. Kato O, Kawasaki N, Bodri D et al. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 161: 46-50.
23. Venetis CA, Kolibianakis EM, Papanikolaou E et al. Is progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotrophin administration associated with the probability of pregnancy in in vitro fertilization? A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 343-355.
24. Roque M, Valle M, Guimaraes F et al. Freeze all policy: fresh vs. frozen-thawed embryo transfer. *Fertil Steril* 2015; 103: 1190-1193.
25. Wang A, Santistevan A, Hunter Cohn K et al. Freeze-only versus fresh embryo transfer in a multi-center matched cohort study: contribution of progesterone and maternal age to success rates. *Fertil Steril* 2017; 108: 254-261.
26. Coates A, Bankowski BJ, Kung A et al. Differences in pregnancy outcomes in donor egg frozen embryo transfer (FET) cycles following preimplantation genetic screening (PGS): a single center retrospective study. *J Assist Reprod Genet* 2017; 34: 71-78.