

Resultados del co-cultivo de embriones sobre células endometriales autólogas en pacientes con repetidas fallas de implantación

Victoria Eyheremendy, Fernanda Raffo, Mercedes Papayannis, Marina Marcelli, Fernando Neuspiller, Fabio Sobral, Mario Robin, Marcos Horton, Miguel Cogorno, Jorge Blaquier

Reproducción 2007;22:102-107

Resumen

Objetivos: Analizar el efecto del co-cultivo autólogo endometrial (CCEA) sobre la calidad embrionaria, la tasa de embarazo y la tasa de implantación en 22 pacientes con fallas previas de embarazo en reproducción asistida. **Métodos:** Se estudió el destino de todos los embriones co-cultivados sobre CCEA, y se compararon los resultados con los ciclos previos de cada una de las pacientes. La biopsia endometrial se obtuvo 7-10 días luego de la ovulación, uno o varios meses antes del ciclo de reproducción asistida (FIV/ICSI-ET). Las células endometriales (glandulares y estroma) se aislaron enzimáticamente y separaron según sus diferentes velocidades de sedimentación. Estas células fueron criopreservadas hasta ser utilizadas. Previo al procedimiento de reproducción asistida se cultivan los dos tipos celulares combinados, co-cultivando los cigotos hasta la transferencia (día 3 de desarrollo). **Resultados:** Al comparar ciclos previos y ciclos con CCEA; la edad de las pacientes (35.2 ± 4.6 vs 36.0 ± 3.9 el n° de ovocitos recuperados ($9,1 \pm 5,1$ vs $8,2 \pm 5,8$) y la cantidad de embriones transferidos ($2,7 \pm 0,88$ vs $2,8 \pm 0,99$), no mostraron diferencia estadísticamente significativa. El N° de ciclos sin y con co-cultivo fue 2,5 y 1 ($P > 0.05$) respectivamente. No se observó diferencia estadísticamente significativa al comparar el porcentaje de embriones de

buena calidad ($61,4\% \pm 29,6$, vs $70,5\% \pm 27$). La tasa de embarazo clínico fue: ciclos previos: 6% y con CCEA 48% ($P < 0.0001$) y la tasa de implantación aumentó de 2.9% a 26.3% ($P < 0.0001$). **Conclusiones:** A pesar de no observarse diferencia en la calidad embrionaria en ambos grupos, la tasa de embarazo y de implantación aumenta cuando se utiliza CCEA.

Autologous endometrial co-culture results in a population of patients with repeated implantation failure in ART.

Summary

Objective: Attempt to improve ART results in a selected population with reduced implantation (IR) and pregnancy/embryo transfer (PR) rates, compared to our general population. **Design:** Patients were subjected to an endometrial biopsy. A new ART cycle was performed and the embryos grown on monolayers of autologous endometrial cells. **Materials and Methods:** 22 patients had previously undergone 32 conventional ART cycles with 32 fresh embryo transfers and 22 frozen embryo transfers with only 3 pregnancies ensuing (IR: 2.9%, PR 14%). An endometrial biopsy was obtained on day 5-7 after ovulation, the stromal and glandular cells isolated, multiplied in culture and kept frozen until the following ART attempt. Ovarian stimulation drugs and protocols and ART techniques were kept identical to those used in previous attempts. Mono-

Correspondencia: Victoria Eyheremendy
Centro Médico FERTILAB
E-mail: victoriae@fertilab.com.ar

layers of endometrial cells (stromal:glandular 2:1) were prepared and embryos grown for 72hs on them and transferred. **Results:** The 22 patients underwent a new ART cycle with co-culture. A significant diferent was observed between the conventional and co-culture cycles in de pregnancy rate and in de implantation rate (PR: 6% and 46%, $P < 0.001$) and (IR 2.9% and 26.3%, $P < 0.001$.) The age of the patients (35.2 and 36.1 years), number of mature oocytes retrieved (9.1 and 8.2), quality of embryos produced (61.4% and 70,5% good quality) and number of embryos transferred (2.7 and 2.8) were not significantly different between the conventional and co-culture cycles. **Conclusions:** Our results strongly suggest a beneficial effect of autologous endometrial co-culture upon ART results in patients with previous failures at ART.

Introducción

Obtener las condiciones adecuadas para el cultivo de embriones *in vitro* es uno de los aspectos mas importantes para el éxito de los procesos de reproducción asistida. Los factores tróficos específicos requeridos para que el embrión *in vitro* adquiriera una capacidad de implantación y crecimiento similar a la que tiene in vivo, aún no son conocidos en su totalidad.¹⁻²⁻³

La experimentación para lograr condiciones de cultivo que remedan las condiciones halladas *in vivo* se inició en 1960 con cocultivos de embriones de ratón⁴. Se ha experimentado con células epiteliales tubáricas, células endometriales humanas y bovinas, células de la granulosa y células Vero, derivadas del epitelio renal en simios etc.⁵⁻⁶⁻⁷, hasta llegar a la aplicación de esta técnica en embriones humanos.

Algunos autores han reportado resultados alentadores del co-cultivo de embriones humanos con células somáticas endometriales al evaluar el desarrollo de embriones al estadio de blastocistos y las tasas de embarazo.⁸⁻⁹⁻¹⁰ Ciertas publicaciones incluso manifiestan la obtención de embriones con mayor

cantidad de blastómeros y menor porcentaje de fragmentación³⁻¹¹ utilizando cocultivo.

Para nuestro trabajo seleccionamos una población de pacientes que había fracasado un promedio de 2.5 veces en ciclos de FIV o ICSI y repetimos estos procedimientos utilizando el cocultivo de los embriones sobre células de su propio endometrio. En estos pacientes medimos la calidad de los embriones producidos, la tasa de implantación y la tasa de embarazo comparándolos con las obtenidas en los ciclos previos sin cocultivo.¹²

Objetivo

Analizar el efecto del co-cultivo autólogo endometrial sobre la calidad embrionaria, la tasa de embarazo y la tasa de implantación en pacientes con fallas previas de embarazo en reproducción asistida.

Materiales y métodos

Población del estudio

Un total de 22 pacientes intervinieron en este estudio desde 2004 al 2006, con un promedio de 2.5 fallos (ausencia de implantación) previos luego de la transferencia de embriones obtenidos por FIV o ICSI.

En cada caso se comparan los procedimientos hechos con el cocultivo de embriones sobre el endometrio vs los procedimientos anteriores sin este cultivo.

Métodos de reproducción asistida

Las 22 pacientes fueron tratadas con un protocolo de estimulación con FSH recombinante (a partir del Día 2), en distintas dosis según cada caso, y antagonistas de GnRh (a partir de un folículo de 14 mm). La maduración final se indujo con HCG 10.000 UI cuando hubo al menos 3 folículos de 17 mm. La punción folicular se realizó a las 36 hs de la inyección de HCG.

El soporte de la fase lutea se realizó con progesterona 600 mg por día por vía vaginal.

Los embriones fueron transferidos a la paciente a las 72 hs de la punción y aquellos no transferidos fueron criopreservados para uso futuro.

El criterio utilizado para evaluar la calidad embrionaria es el de Bolton²¹, que toma en cuenta la presencia de fragmentos citoplasmáticos y el tamaño y cantidad de blastómeros, el embrión tipo 4 es el de mejor morfología.

Los embriones criopreservados fueron transferidos en ciclos suplementados con estradiol y progesterona.

Embarazo significa la presencia de saco y embrión comprobada ecográficamente cuatro semanas luego de la transferencia embrionaria.

Cultivo de endometrio

Las células se obtuvieron a partir de una biopsia de endometrio hecha entre 7 y 10 días luego de producida la ovulación, en un ciclo anterior al procedimiento de reproducción asistida. El tejido se obtuvo por aspiración con una cánula Endomed (*MEDICAL 09042430*), con la cánula externa de un Set de Frydman para transferencia de embriones (*Short Frydman Set*) o con cureta, según el criterio del médico¹⁶.

Luego de separar una pequeña porción para su estudio histológico, el tejido se procesó según el método de Spandorfer y col¹⁷ modificado. Brevemente, el tejido se colocó en una cápsula con medio Hank's (Gibco) suplementado con Penicilina y Estreptomina, se cortó en pequeños trozos de 1 a 2 mm y estos fueron tratados con

colagenasa al 0.2% a 37°C durante 5 minutos con agitación. El tejido disgregado se deja sedimentar por gravitación durante 5 minutos, el sobrenadante se separa y el precipitado se resuspende en medio DMEM (Gibco) con colagenasa y se repite el ciclo cuatro veces, quedando el precipitado enriquecido en células glandulares en tanto el sobrenadante contiene células estromales separadas y pequeñas glándulas intactas.

El *pool* de sobrenadantes se centrifuga 5 minutos a 5000 rpm y el *pellet* se resuspende en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco) y se vuelve a separar por gravitación durante 45 minutos para obtener células estromales purificadas. Se determina vitalidad (Azul Tripán) y recuento celular en cámara de Neubauer, y las células se cultivan con medio DMEM+10% SFB durante 7 días a 37°C y 5% CO₂ cambiando el medio cada dos días. Al final de este período las células se criopreservan con 5% de DMSO +10% SFBEL día anterior a la administración de HCG a las pacientes, se descongelan las células estromales y glandulares, se determina la sobrevivencia post-descongelamiento y se cultivan mezcladas en proporciones 2: 1 en medio DMEM+10%SFB hasta llegar a confluencia, cambiando el medio cada 2 días. (figura 1) Los embriones se colocan sobre el cultivo en el estadio de pronúcleos, previo cambio del medio DMEM por ECM (*Irvine Scientific*), y se incuban 72 hs hasta la transferencia o criopreservación embrionaria. (figura 2)

Figura 1. Cultivo de células endometriales, formado por células estromales y células glandulares que han llegado a confluencia.

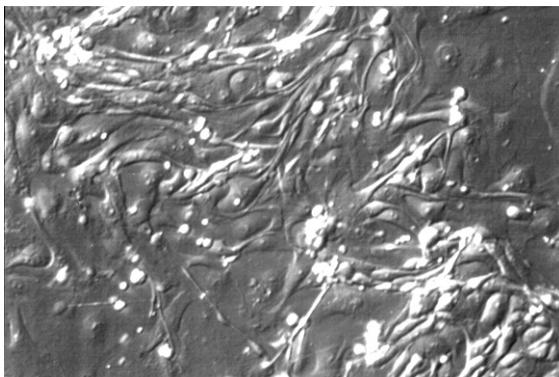


Figura 2. Embriones cultivados sobre células endometriales.

