

En el caso de que la muestra de tejido no fuese procesada inmediatamente, se puede guardar en medio HTF HEPES (*Sage Bio-pharma*) a 4°C por 24hs.

Análisis estadístico

Los datos presentados como media y su desviación estándar fueron analizados con un *test* no paramétrico, *Wilcoxon Test*, y su significancia con *Test de Student*.

Los datos categóricos fueron comparados utilizando el *Test de Fisher*.

Resultados

Análisis de la población

La tabla 1 muestra algunas características de la población del estudio.

Las causas de infertilidad de las parejas fueron: tuboperitoneal (n= 4), bajas respondedoras (n= 3), factor masculino (n=5), factor masculino / baja respondedora (n=9) y factor masculino/PCO (n=1).

Análisis de los ovocitos y embriones obtenidos

Los datos sobre la cantidad de ovocitos maduros y la calidad de los embriones obtenidos se observan en tabla 2. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los distintos valores.

Tabla 1. Características de la población en estudio (n= 22).

	Ciclos convencionales	Ciclos con cocultivo
Edad	35,2 ± 4,6	36,06 ± 3,9 *
Número de transferencias	51	29
Promedio de embriones/transferencia	2,7 ± 0,88	2,8±0,99*

*P>0.05

Tabla 2. Número de ovocitos maduros (MII) y calidad de los embriones obtenidos en ciclos convencionales y con cocultivo.

	Convencional	Con endometrio
Ovocitos MII/aspiración, media	9,1 ± 5,1	8,2 ± 5,8*
% Embriones Tipo 4-3/aspiración, media	61,4 ± 29,6	70,5 ± 27*

* P>0.05

Análisis de las tasas de implantación y embarazo

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos del análisis de las tasas de embarazo e implantación en los casos sin y con endometrio. Damos el resultado global (por paciente) y, por separado, los resultados obtenidos luego de la transferencia de embriones frescos y criopreservados.

Finalmente, comparamos el posible efecto del tiempo transcurrido desde la biopsia de endometrio hasta la transferencia embrionaria.

Tabla 3. Tasa de implantación y embarazo en la población total y comparación entre los resultados obtenidos luego de transferir embriones frescos y criopreservados.

	Convencional	Con cocultivo	
Global			
Embarazo/ET (%)	3/54 (6%)	13/28 (46%)	P< 0.001
Tasa de embarazo/ paciente (%)	3/22 (14%)	13/22 (59%)	P< 0.001
Tasa implantación (%)	4/136 (2,9%)	20/76 (26,3 %)	P< 0.001
Embriones Frescos			
Nº pacientes	22	22	
Transferencias	32	22	
Tasa embarazo/ET (%)	2/32 (6%)	11/22 (50%)	P< 0.001
Tasa de implantación (%)	3/82 (4%)	16/59 (27%)	P< 0.001
Embriones congelados			
Nº pacientes	12	5	
Transferencias	22	6	
Tasa de embarazo/ET (%)	1/22 (5%)	2/6 (33%)	P< 0.001
Tasa de implantación (%)	1/54 (2%)	4/17 (24%)	P< 0.001

Los resultados (tabla 4) indican que aquellas pacientes que realizaron la biopsia en el ciclo inmediatamente anterior a aquel en que se transfieren embriones consiguieron una tasa de embarazo mayor (64% vs 35%, $P < 0.001$) a la de aquellas pacientes en las que transcurrió más de un ciclo entre biopsia y transferencia embrionaria, incluyendo las transferencias de embriones congelados.

Tabla 4. Comparación de los resultados obtenidos según el tiempo transcurrido entre la biopsia para obtención de tejido endometrial y la transferencia de embriones.

	Biopsia en el ciclo inmediatamente anterior	Biopsia en otro ciclo previo
Nº de pacientes	11	10
Nº de transferencias	11	17
Tasa de embarazo/ET	7/11 (64%)*	6/17 (35%)
Tasa de implantación	11/34 (32%)	9/42 (21%)

* $P < 0.001$

Conclusión

Nuestros resultados, si bien preliminares, sugieren que la técnica de cocultivo de los embriones sobre una capa de células de endometrio autólogo permite, a parejas con fallas reiteradas de implantación, una mayor posibilidad de conseguir un embarazo comparando con la que tendrían si continuaran con las técnicas convencionales.

Aparentemente el cultivo de endometrio proporciona un ambiente mejorado para los embriones, si bien, a diferencia de otros trabajos publicados¹³, los embriones cultivados en las células endometriales no muestran diferencias en su calidad y número de blastómeros con respecto a los intentos anteriores, pero sí un aumento significativo en las tasas de embarazo e implantación.

Se han postulado diversos mecanismos de acción del cocultivo. Uno es la detoxificación del medio de cultivo por las células de la monocapa¹². También es posible que las células somáticas del cocultivo, dada su capacidad de metabolizar la glucosa del me-

dio, sean reguladoras de su concentración, logrando niveles tolerables para el embrión en sus diferentes etapas. Por último se postula que las células de la monocapa pueden secretar sustancias embriotróficas, por ejemplo, el TGF- α (*Transforming Growth Factor*), TGF- β 1 (*Epidermal Growth Factor*), PDGF- α (*Platelet Derived Growth Factor*) e IGF-I y II (*Insulin Like Growth Factor*) y GMC-CSF (*Granulocyte macrophage colony stimulating factor*) que tienen un efecto directo sobre el desarrollo embrionario.^{16,17,18}

Al comparar el momento en que se realizó la biopsia endometrial con el resultado obtenido, se observó una mayor tasa de embarazo e implantación para las pacientes que realizaron la biopsia en el ciclo inmediatamente previo al tratamiento versus quienes lo realizaron algunos ciclos antes. Si bien este resultado sugiere que el aumento logrado en la tasa de implantación es debido fundamentalmente a una mejor calidad de los embriones obtenidos sobre el cultivo (3% en ciclos convencionales vs 26% en ciclos con cultivo), apoya también el posible efecto de la injuria al endometrio, previo a la implantación, que supuestamente produce una reacción inflamatoria que la favorece¹⁹ (32% vs 21%).

Es importante destacar la importancia del momento del ciclo de la paciente en que se toma la biopsia endometrial¹⁵. Algunas publicaciones reportan que los cocultivos originados de células endometriales obtenidas entre el día 5 y 12 después de la ovulación producen embriones con mejor tasa de implantación que los obtenidos en otros momentos del ciclo.

El cocultivo requiere la presencia de células estromales y glandulares. Algunos autores sugieren un efecto parácrino de las células estromales sobre la regulación de la proliferación y la expresión genética del tejido glandular¹⁴ que resultaría en la producción de los factores beneficiosos para los embriones.

En resumen, nuestros resultados sugieren que la técnica del cocultivo de embriones sobre células endometriales provee una nueva alternativa con mejores posibilidades de embarazo para aquellas pacientes cuyos procedimientos de FIV o ICSI resultan en fallas repetidas de implantación sin el riesgo de utilizar células heterólogas.

Bibliografía

- Bongso A, Ng SC, Fong C-Y, Ratman S. Cocultures: A lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991; 67:120-122.
- Bongso A. Blastocyst Culture. Handbook (1999).
- Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Veek L, Damario M, Rosenwaks Z. Human preembryo development on autologous endometrial coculture versus conventional medium. *Fertil Steril* 1998; 70: 1109 – 1113.
- Freeman MR, Bastias MN, Hill GA, Osteen KG. Coculture of mouse embryos with cells isolated from the human ovarian follicle, oviduct, and uterine endometrium. *Fertil Steril* 1993; 59: 138-142.
- Dirnfeld M, Goldman S, Gonene Y, Koifman M, Calderon I, Abramovici H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: A controlled study. *Fertil Steril* 1997; 67: 120 – 122.
- Feng HL, Wen XH, Amet T, Pesser SC. Effect of different coculture systems in early human embryo development. *Hum Reprod* 1996; 11:1525-8.
- Menezo Y, Hazout A, Dumont M, Herbaut A, Nicolle B. Coculture of embryos on Vero cells and transfer of blastocysts in human. *Hum Reprod* 1992; 7(suppl 1):101-106.
- Jayot S, Parneix I, Verdagner S. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patient with repeated failures of implantation. *Fertil Steril* 1995, 63: 109-114.
- Rubio C, Simon C, Mercader A. Clinical experience employing co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells. *Human Reprod* 2000; 15 (Suppl 6):31-8.
- Mercader A, Garcia-Velazco J, Escudero E, Remohi J, Pellicer A, Simon C. Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: *Fertil Steril* 2003, 80: 1162-1168.
- Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD. Autologous endometrial co-culture in patients with repeated failures of implantation after in vitro fertilization-embryo transfer. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16:121-7.
- Spandorfer SD, Pascal P, Parks J, Clark R, Veek L, Davis OK, Rosenwaks Z. Autologous endometrial co-culture in patients with IVF fail res Outcome of the first 1030 cases. *J Reprod Med* 2004;49:463-7
- Simon C, Pellicer A. Interleukin-1 system crosstalk between embryo and endometrium in im plantacion. *Human Reprod* 1995;10 (Sppl1):11.
- Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Human Reprod* 2001;16: 836-45.
- Barmat LI, Liu HC, Spandorfer SD, Veek L, Damario M, Rosenwaks Z. Importance of the biopsy date in autologous endometrial cocultures for patients with multiple implantation failures. *Fertil Steril* 2002; 77: 1209-1213.
- Spandorfer SD, Barnat LI, Liu HC, Mele C, Veek L, Rosenwaks Z. Granulocyte macrophage stimulating factor production by autologous endometrial co-culture is associated with outcome for IVF patient with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40:377-381.
- Spandorfer SD, Neuer A, Liu HC, Bivis L, Clarke R, Veek L, Rosenwaks Z. Interleukin-1 levels in the supernatant of conditioned media of embryos grown in autologous endometrial co-culture: Correlation with embryonic development and outcome for patient with a history of multiple implantation failures. *Am J Reprod Immunol* 2000;42:6-11.
- Spandorfer SD, Navarro J, Levy D, Black AQR, Liu HC, Veek L, Witkin SS, Rosenwaks Z. Autologous endometrial co-culture in patient with IVF failures: Correlation of outcome with leukemia inhibiting factor (LIF) production. *Am J Reprod Immunol* 2001;46:375-380.
- Barash A, Dekel N, Fieldust S, Segal LI, Schechtman E, Garanot I. Local injury to the endometrium doubles the incidence of successful pregnancies in patient undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 79: 1317-1322.
- Bolton VN, Hawes SM. 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 Transfer* 1989, 6: 30-35.