

Cultivo hasta blastocisto y “Screening” genético preimplantacional: herramientas para aumentar la tasa de implantación embrionaria

Culture until blastocyst and preimplantation genetic screening: tools to increase embryo implantation rate

María José Torelló Ybáñez. Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Quirón Barcelona, España

RESUMEN

Objetivo: Revisar cuáles son las mejores opciones, desde el punto de vista del embriólogo clínico, que se pueden ofrecer a las parejas que son tratadas en un ciclo de FIV (Fecundación *In Vitro*), con el objetivo de conseguir un embarazo.

Diseño: Revisión de la literatura, analizando las tasas de implantación que se obtienen en función del día en que se realiza la transferencia embrionaria y también la utilidad del PGS (Preimplantation Genetic Screening) para las pacientes que no tienen un riesgo genético claro. Valorar cuál es la mejor técnica de congelación en función del día de desarrollo.

Resultados: Cuando se comparan las tasas de implantación en los diferentes momentos del desarrollo embrionario se observa un aumento gradual a medida que se incrementa el periodo de cultivo *in vitro*. La transferencia en estadios tempranos es una buena opción para las pacientes con baja respuesta con pocos embriones disponibles en tercer día de desarrollo (D+3). Con la transferencia en el cuarto día de desarrollo (D+4) se obtiene una tasa de implantación que es comparable a la que se obtiene en estadios más tempranos. La transferencia de blastocistos aumenta la tasa de niño nacido en pacientes con muchos embriones de buena calidad el tercer día de desarrollo. La doble selección embrionaria, por estadio embrionario (blastocisto) y por normalidad cromosómica (embrión normal euploide para todos los cromosomas) con PGS, permite detectar el embrión que tiene mayor capacidad implantatoria de toda la cohorte. La vitrificación de blastocistos representa una ventaja clara para la preservación de los embriones si lo comparamos con el método de congelación lento.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 28: 35-43 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Palabras clave: *Tasa de implantación, Blastocisto, screening genético preimplantacional.*

SUMMARY

Objective: The idea of this article is to review the best options available, from the point of view of the embryologist, to achieve a clinical pregnancy in couples going through an IVF (*In vitro* Fertilization) cycle.

Design: It includes an extensive embryologist review, with analysis of the implantation rates achieved on the embryo transfer day and the uses of PGS (Preimplantation Genetic Screening) for patients with

Aceptado 21 Noviembre 2011

Autor para correspondencia: María José Torelló Ybáñez. Unidad de Reproducción Asistida. Hospital Quirón Barcelona. Plaza Alfonso Comín 5-7. 08023 Barcelona. E.mail: mjtorello.bcn@quiron.es

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

no genetic associated risks. We are also reviewing the best method to freeze depending on the embryo stage.

Results: When comparing implantation rates at different stages of embryonic development, there is a gradual raise as the culture period is increased. Transferring in early stages is a good option for poor responders with few embryos available in the third day of development (D +3). With transfer on the fourth day of development (D +4), implantation rate is comparable to that obtained in earlier stages. Blastocyst transfer increases the rate of children born in many patients with good quality embryos on the third day of development. The double embryo selection by embryo stage (blastocyst) and chromosomal normality (normal euploid embryo for all chromosomes) with PGS (Preimplantation Genetic Screening), can detect the embryo with the highest implantation capacity of the entire cohort. The vitrification of blastocysts represents a clear advantage for the preservation of the embryos when compared with the slow freezing technique.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2011; 28: 35-43 ©2011 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Key words: *Implantation rate, Blastocyst, Preimplantation Genetic Screening diagnosis.*

INTRODUCCIÓN

Desde el nacimiento del primer niño mediante Fecundación *In Vitro* (FIV) en 1978 han habido muchos cambios en la metodología utilizada. En el caso del cultivo embrionario, el desarrollo y optimización de los medios de cultivo comercializados permiten hoy en día el desarrollo hasta el estadio de blastocisto de forma cómoda y segura.

El momento ideal para la transferencia embrionaria todavía está en controversia. La transferencia en estadios tempranos (día dos o día tres de cultivo) continúa siendo la práctica habitual en muchos laboratorios de FIV.

Existen dos argumentos esenciales que explican por qué el cultivo hasta el estadio de blastocisto aporta ventajas, en comparación con la transferencia de embriones en estadios tempranos:

El primero es una mejor sincronización **embrio-endometrial:**

En condiciones *in vivo*, los embriones permanecen en la trompa de Falopio hasta el estadio de mórula (16 células compactadas). Esto corresponde como mínimo al cuarto día de cultivo *in vitro* (D+4) y por tanto llegan a la cavidad uterina en torno al quinto día de desarrollo, produciéndose la implantación el día cinco (D+5) o el día seis (D+6) de desarrollo embrionario.

La exposición prematura de los embriones al entorno uterino en día dos o tres (D+2 o D+3) de desarrollo, no es fisiológica. El embrión llega prematuramente y deberá esperar tres o cuatro días para la implantación.

Los nutrientes que encuentra el embrión en el útero son distintos de los que hay en la trompa y pueden no ser adecuados para su correcto desarrollo (1). También se ha descrito que la contractibilidad uterina es inferior si se retrasa la transferencia hasta el estadio de blastocisto mejorando así la implantación (2).

Por otra parte, el entorno que encuentra el embrión tiene altos niveles de estrógenos, todavía presentes como resultado del tratamiento estimulador. En consecuencia, si el embrión llega antes de la compactación, puede suponerle un estrés y disminuir su potencial implantatorio.

El segundo argumento es una mejor **selección embrionaria:**

Los criterios morfológicos utilizados para la selección de embriones en D+ 2 y D+3 de cultivo son limitados. Existen trabajos que correlacionan las características morfológicas del embrión con las tasas de embarazo, siendo estas mayores cuando la calidad embrionaria es óptima. En los cuadernos de embriología clínica editados por ASEBIR bajo el título "Criterios de Valoración Morfológicos de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos", se analizan los criterios morfológicos embrionarios y su correlación con la tasa de implantación, proponiendo finalmente un score embrionario que constituye la clasificación ASEBIR de calidad embrionaria (3).

En la clasificación propuesta se definen cuatro categorías embrionarias A,B,C y D, perteneciendo a la A los embriones con mejor morfología y con mayor capacidad de implantación.

FIGURA 1

Embriones tipo A según clasificación ASEBIR
44-47 horas de cultivo post inseminación (D+2).



A pesar de disponer de criterios para la selección de embriones con buena capacidad de implantación, a veces nos sorprenden los fallos de implantación que se suceden tras la transferencia de embriones de muy buena calidad.

Sabemos que hay una gran proporción de embriones con morfología óptima en D+2 y D+3 que son cromosómicamente anormales y esto podría ser una de las causas del fallo de implantación observado en este grupo de embriones (4).

Pero hay que tener en cuenta que el cultivo hasta el estadio de blastocisto implica una mayor tasa de cancelación de transferencias y también un descenso en el número de embriones criopreservados.

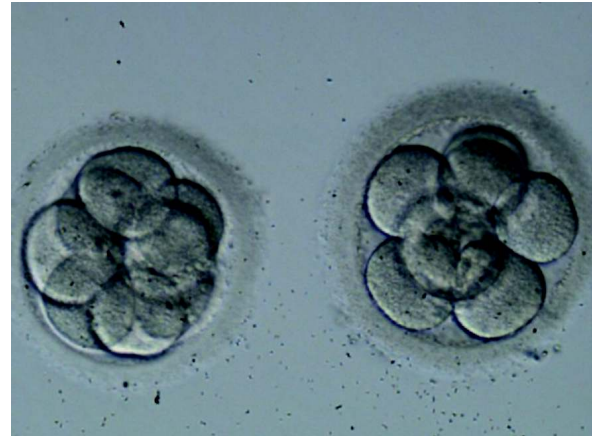
La transferencia embrionaria se puede realizar, desde el D+2 hasta el D+6 de desarrollo embrionario y el día elegido dependerá fundamentalmente de la metodología utilizada en la selección de los embriones para la transferencia. Se han descrito dos métodos para mejorar la selección embrionaria: **Cultivo hasta blastocisto y PGS.**

Cultivo hasta blastocisto como herramienta de selección embrionaria:

La capacidad implantatoria de un embrión es, desde el punto de vista del embriólogo clínico, el único marcador real de la calidad embrionaria. Este parámetro está directamente relacionado con la tasa de embarazo evolutivo y por este motivo se analizará la tasa de implantación en los distintos momentos del desarrollo embrionario hasta el estadio de blastocisto.

FIGURA 2

Embriones tipo A según clasificación ASEBIR D+3.
67-71 horas post inseminación.



D+2

La transferencia en D+2, cuando el embrión ha realizado dos divisiones celulares, ha sido la práctica más habitual desde los inicios de la fecundación *in vitro*.

Un embrión que sigue un correcto desarrollo y se observa en los rangos de tiempo establecidos para este estadio, 44-47 horas post inseminación (Clasificación ASEBIR), debería tener 4 blastómeras iguales, menos del 10% de fragmentación, y no presentar multinucleación en ninguna de sus células, para ser considerado de óptima calidad (Figura 1). Existen otras clasificaciones para catalogar los embriones (5,6) y hay coincidencia para la descripción de los embriones de óptima calidad.

Los resultados del estudio multicéntrico realizado por el grupo de interés de embriología de ASEBIR y presentado en el V congreso de ASEBIR (7), muestran que la tasa de implantación embrionaria disminuye a medida que disminuye el score ASEBIR, independientemente de la edad de la mujer.

Guerif et al., 2009 (8) en un estudio prospectivo y realizando la transferencia de un solo embrión tiene una tasa de implantación de 29.6% cuando la transferencia se realiza en D+2.

Similares tasas de implantación se observaron en otros estudios (9) transfiriendo una media de 1.8 embriones en D+2.

D+3

Los medios de cultivo simples permiten prolongar un día más el cultivo embrionario *in vitro* mejorando la diferenciación endometrial (10) y mejorando la implantación (11).

FIGURA 3

Mórula compactada D+4.
94-98 horas post inseminación.



Parece lógico pensar que la selección embrionaria es mejor si podemos evaluar el desarrollo del embrión hasta que haya finalizado la tercera división celular, es decir, hasta el estadio de 8 células.

Según la clasificación de ASEBIR un embrión óptimo observado tras 67-71 horas post inseminación debe presentar 7-8 blastómeras y tener menos de un 10% de fragmentación. Teniendo en cuenta que esta clasificación es dinámica, la morfología del embrión en D+2 es necesaria para su catalogación en D+3. (Figura 2)

Las tasas de implantación transfiriendo embriones de buena calidad en D+3 varían entre 30-40% (12, 13).

D+4

La mayoría de las transferencias en Reproducción Asistida se realizan en estadios tempranos o bien en estadio de blastocisto. No hay que olvidar que también es posible la transferencia en mórula compactada que cronológicamente corresponde al día 4 de cultivo (Figura 3).

A diferencia de lo que ocurre en D+3, estos embriones ya han activado su genoma y su sincronía con el endometrio es mayor que la que tienen los embriones en D+ 2 y D+3. El momento de la activación del genoma es crucial para el embrión y solo aquellos que consiguen realizarlo correctamente serán capaces de formar una mórula compactada. La activación del genoma embrionario se ha completado en D+3, pero estudios recientes apuntan que ya se ha iniciado al final del D+2 de desarrollo (14). La transferencia en D+4 comporta mejor selección embrionaria ya que los embrio-

FIGURA 4

Blastocisto expandido tipo A según clasificación ASEBIR
112-120 horas post inseminación.



nes que no consiguen realizar la compactación pueden ser considerados subóptimos.

La variabilidad en la tasa de implantación observada en las publicaciones es grande, pero la mayoría de los estudios describen tasas de embarazo y de implantación similares a las que se obtienen en estadios más tempranos (15,16), y también se han descrito tasas de implantación inferiores en otro estudio prospectivo y randomizado (17).

Es necesaria la utilización de los medios secuenciales para obtener buenas condiciones de cultivo hasta este estadio.

D+5

En la década de los 90 empezaron a aparecer los primeros trabajos sobre la transferencia en estadio de blastocisto.

Los primeros protocolos descritos para el cultivo de embriones humanos hasta el estadio de blastocisto utilizaban el sistema del co-cultivo con distintos soportes celulares, tales como las células Vero (18) y células endometriales (19).

El sistema de co-cultivo está basado en la interacción recíproca entre el embrión y la monocapa de células soporte. Las células del co-cultivo producen sustancias beneficiosas que son liberadas al medio y a su vez eliminan sustancias embriotóxicas del mismo, producidas por el metabolismo del embrión a lo largo de su desarrollo (20). Este sistema permite unas buenas tasas de desarrollo hasta blastocisto pero técnicamente es de difícil adaptación a la rutina del laboratorio de Reproducción Asistida.

Actualmente la utilización de medios secuenciales para el cultivo de embriones hasta el estadio de blastocisto permite que el embrión tenga unas condiciones de cultivo adecuadas a sus requerimientos nutricionales en las diferentes etapas del desarrollo (21). Los medios secuenciales fueron formulados teniendo en cuenta los niveles de carbohidratos presentes en el oviducto humano y los fluidos uterinos en el momento en que el embrión está presente y, de este modo, el primer medio soporta el desarrollo del cigoto humano hasta el estadio de 6-8 células, mientras que el segundo medio atiende a los requerimientos del embrión hasta el estadio de blastocisto.

La utilización del sistema de co-cultivo o los medios específicos para cada estadio embrionario permiten obtener elevadas tasas de embriones con desarrollo correcto hasta blastocisto y a su vez altas tasas de implantación. La incorporación de esta técnica de medios secuenciales ha simplificado enormemente los protocolos iniciales con co-cultivos y permite la incorporación de la transferencia en estadio de blastocisto a la rutina del laboratorio de reproducción asistida.

Transcurridos 5 días de cultivo el embrión tiene una estructura que implica una diferenciación en dos tipos celulares: la masa celular interna y las células del trofoectodermo.

Según la clasificación de ASEBIR un blastocisto óptimo observado tras 112-120 horas post inseminación debe presentar una masa oval y compacta que mida entre $1900\mu\text{m}^2$ y $3800\mu\text{m}^2$ y tener un blastocele ocupando la mayor parte del volumen del embrión (Figura 4).

La clasificación de Gardner et al. 1998(b) (22) continúa siendo utilizada en muchos laboratorios. Para ambas catalogaciones embrionarias los parámetros que se tienen en cuenta son: el tamaño, forma y grado de compactación de la masa celular interna, grado de expansión del blastocele y estructura de las células del trofoectodermo. La clasificación de ASEBIR, a diferencia de lo que ocurre en otras, tiene en cuenta la evolución previa del embrión antes de adquirir el estadio de blastocisto, con lo que solo puede ser un embrión óptimo, aquel que ha llevado un correcto desarrollo desde el inicio del cultivo. En este estadio hay una gran variedad morfológica ya que un blastocisto es capaz de expandirse en pocas horas y, a lo largo de este proceso, experimentar grandes cambios morfológicos.

No todos los embriones son capaces de llegar al estadio de blastocisto. Está descrito que entre el 40% y el 60% de los ovocitos fecundados llegan al estadio de blastocisto en condiciones *in vitro* (22,23) y esta capacidad está directamente

relacionada con la morfología que presenta el embrión en estadios más tempranos.

La tasa de implantación de los embriones en el estadio de blastocisto está alrededor del 50% (24, 25, 9).

En el trabajo de Guerif et al., 2009 (8) se muestran tasas de implantación del 43,6% realizando la transferencia de un blastocisto en una población no seleccionada de pacientes. El riesgo de cancelación de la transferencia por falta de embriones evolutivos es una realidad cuando se transfiere en estadio de blastocisto, pero no todos los autores observan lo mismo en sus trabajos (26).

La primera publicación de vitrificación en embriones humanos fue presentada en 1998 (27). La vitrificación, evita la formación de cristales de hielo tanto en el medio intracelular como en el extracelular, que directamente se solidifican y pasan a un estado vítreo. Para que esto pueda ocurrir, se deben utilizar altas concentraciones de crioprotectores, aumentar la velocidad de enfriamiento y disminuir el volumen de la solución de vitrificación.

La congelación de embriones en estadio de blastocisto ha experimentado un cambio sustancial en los resultados desde la incorporación de la vitrificación. El blastocisto tiene un gran número de células y su organización espacial característica (masa celular interna, trofoectodermo y blastocele) hacen que sea muy difícil la incorporación del crioprotector en el interior de sus células mediante un protocolo lento de congelación. Cuando el blastocisto está muy expandido, la presión que ejerce el líquido del blastocele no permite la retracción correcta del embrión y no puede eliminar el agua contenida en su interior, generándose cristales que dañan las células en el proceso de la congelación.

Aunque existen algunos resultados contradictorios en la congelación de embriones en estadio temprano, parece evidente que la vitrificación consigue un aumento en la tasa de supervivencia embrionaria en todos los estadios y mejora las tasas de gestación e implantación en el estadio de mórula compactada y blastocisto.

D+6

La mayoría de los embriones que tienen un desarrollo correcto adquieren el estadio de blastocisto en D+5 cuando se utilizan los medios secuenciales para el cultivo embrionario. Pero algunos embriones sufren un retraso en su desarrollo y consiguen diferenciarse en blastocistos en D+6. Las tasas de implantación de estos embriones son inferiores (28).

FIGURA 5

Blastocisto temprano post biopsia de blastómero para PGS.



Cuando el cultivo se realiza mediante la técnica de cocultivo, se ha observado que los embriones adquieren el estadio de blastocisto entre D+5 y D+6, en este caso las tasas de implantación esperadas son semejantes en ambos días de cultivo.

PGS como herramienta de selección embrionaria:

El Screening Genético Preimplantacional (PGS) surgió para intentar mejorar las posibilidades de conseguir un embarazo de un niño sano en las parejas que realizan un ciclo de FIV, cuya esterilidad o infertilidad puede ser en parte atribuible a causas cromosómicas.

La utilización de la FISH (Hibridación in situ de fluorescencia) nos ha permitido conocer que un porcentaje elevado de los embriones de determinados pacientes de un programa de FIV son cromosómicamente anormales.

La mayoría de las anomalías cromosómicas son incompatibles con la vida, con lo que el embrión no llegará nunca a implantar o, si lo hace, dará lugar a un embarazo no evolutivo.

Los estudios que correlacionan morfología y desarrollo embrionario con anomalía cromosómica concluyen que no es posible identificar los embriones cromosómicamente anormales mediante los criterios de selección rutinaria (4).

Las parejas con más riesgo de generar embriones anormales son las que incluyen pacientes con edad materna avanzada, historial previo de abortos o de fallos de implantación, así como factor masculino severo.

Parece lógico pensar que evitando la transferencia de embriones cromosómicamente anormales las tasas de embarazo y sobre todo las de niño en casa aumenten y a su vez disminuya la tasa de abortos en estas pacientes.

El PGS se aplica en diferentes estadios de desarrollo embrionario, desde el corpúsculo polar en ovocitos hasta en blastocistos con la biopsia de trofoectodermo, siendo el D+3 el estadio utilizado por la mayoría de los laboratorios de FIV. La transferencia de los embriones se puede realizar el D+4 o D+5, dependiendo del tiempo que se requiera para tener un diagnóstico. En la Figura 5 se puede observar un blastocisto temprano de buena calidad que todavía no ha iniciado su expansión, con la zona pelúcida abierta como consecuencia de la biopsia de uno de sus blastómeros.

En sus inicios sólo se podían detectar aneuploidías de 3 o 5 cromosomas. Actualmente los protocolos más completos de FISH analizan entre 9 y 12 cromosomas, pero inevitablemente quedan muchos cromosomas pendientes de analizar y en consecuencia un determinado porcentaje de aneuploidías sin detectar.

En la última década el PGS ha dado un giro radical y actualmente existe la posibilidad del uso de Arrays de CGH para la obtención de un diagnóstico de todo el complemento cromosómico en un espacio de tiempo compatible con la transferencia en fresco.

Desde su primera aplicación clínica en 1990, el PGD aparece en el programa de todos los congresos y reuniones científicas que tratan de reproducción asistida.

A lo largo de los años, su uso se ha extendido y la lista de indicaciones (aborto de repetición, fallos de implantación, edad materna avanzada, anomalías de meiosis masculina, etc.) han sido y son objeto de debate.

Algunos grupos defienden su aplicación y presentan datos que apoyan su uso con tasas de embarazos y abortos que lo justifican.

Por otra parte, si evaluamos las recopilaciones de resultados ESHRE PGD Consortium (29), elaboradas a partir de los datos aportados por diversos centros, se observa que los resultados no muestran porcentajes tan positivos.

Por otra parte, la heterogeneidad de las recopilaciones suele distorsionar los resultados al no considerar aspectos como el criterio de selección de las parejas de los diversos cen-

tros, los resultados generales de FIV de cada laboratorio, aspectos técnicos de la realización de las biopsias embrionarias o la experiencia del laboratorio que lleva a cabo el diagnóstico.

Puntos como los pocos estudios randomizados, la heterogeneidad de los grupos de pacientes, los resultados dispares en ciclos repetidos, el número de ciclos sin transferencia o el coste del diagnóstico suelen ser puntales para la discusión de los “no creyentes” (30). Mientras que, en la esquina opuesta, se nos presentan resultados y porcentajes de efectividad que deben ser bien analizados para llegar a conclusiones definitivas respecto de la utilidad real de esta técnica. Hay que tener en cuenta también la eficiencia en la metodología de biopsia y en el diagnóstico para valorar los resultados publicados.

La controversia y la división de opiniones respecto a la aplicación del PGS se mantienen desde sus inicios, pero el debate se ha intensificado en los últimos años.

La puesta a punto de la vitrificación en embriones humanos ha permitido aplicar la técnica de microarrays no solo en embriones de día 3, sino también en estadio de blastocisto. En este caso se realiza la biopsia en estadio de blastocisto, vitrificando el embrión biopsiado a la espera del diagnóstico. La transferencia se realiza en ciclo asincrónico.

Utilizando este protocolo en pacientes con fallos de implantación se han conseguido tasas de embarazo evolutivo del 68,9% (31).

Analizando los resultados preliminares de la biopsia de blastocisto y posterior vitrificación en función de la edad materna se observa que los porcentajes de embarazo se mantienen estables a pesar del incremento en la edad de la paciente (32).

Parece que la doble selección embrionaria; por estadio embrionario (blastocisto) y por normalidad cromosómica (embrión normal euploide para todos los cromosomas) nos permite detectar el embrión que tiene mayor capacidad implantatoria de toda la cohorte y en consecuencia aumentar la tasa de embarazo en pacientes con riesgo de generar embriones anormales.

Discusión

Cuando comparamos las tasas de implantación en los diferentes momentos del desarrollo embrionario parece ser que existe un aumento gradual a medida que aumentamos el periodo de cultivo *in vitro*.

No se han observado diferencias en la tasa de niño nacido cuando se retrasa la transferencia del D+2 al D+3 de cultivo según la revisión de Cochrane de 2009 (33). En los datos de la revisión se observa un aumento en la tasa de embarazo clínico cuando la transferencia se realiza el D+3, pero solo para el subgrupo de pacientes con microinyección (ICSI). Cuando se analiza la tasa de aborto, también se encuentran diferencias significativas para el subgrupo de pacientes con ICSI, en las cuales la tasa de aborto es más elevada cuando se transfiere en D+3. Esta pérdida embrionaria en este subgrupo de pacientes hace que finalmente la tasa de niño nacido sea la misma observada en el D+2. Tampoco se encuentran diferencias significativas en la tasa de embarazo múltiple ni en la tasa de embarazo ectópico.

Los mismos resultados se observan en el estudio prospectivo de los Santos et al. 2003 (34), cuando comparan D+2 versus D+3 en pacientes de ovodonación.

Cuando se correlaciona la capacidad de implantación observada en transferencias homogéneas de embriones tipo A de la clasificación ASEBIR, vemos que la capacidad de implantación de estos embriones es muy elevada 49.6%, teniendo en cuenta que la selección del embrión en este estadio ha sido realizada en D+2 (35).

La transferencia en estadios tempranos D+2 y D+3 es una buena opción en aquellas pacientes en las que no se puede llevar a cabo una selección de embriones para la transferencia, debido a una baja respuesta folicular o bien a una baja tasa de fecundación.

Estas pacientes no se beneficiarán del cultivo hasta blastocisto en cuanto a tasa de embarazo evolutivo se refiere y, en algunos casos, no se va a poder llevar a cabo la transferencia al no disponerse de blastocistos para ello.

La selección embrionaria en D+4 en los trabajos revisados muestra tasas de implantación de 41% (36) en el mejor de los casos. La transferencia en D+4 es una opción más para aquellos laboratorios, que por motivos organizativos, necesitan realizar las transferencias en este día y los resultados obtenidos son similares a los estadios tempranos.

La capacidad de implantación de los embriones en estadio de blastocisto ha demostrado ser superior a la observada en embriones tempranos. Los datos publicados en la revisión de Cochrane 2011 (37) muestran tasas de implantación que oscilan entre 21.1% y el 55.8%

La revisión concluye que se observan diferencias en la tasa de embarazo y la tasa de niño nacido cuando la transferencia se realiza en el estadio de blastocisto, pero solo en el grupo de pacientes con buen pronóstico ya que tienen muchos embriones de 8 células en D+3 y el riesgo de cancelación de la transferencia es mínimo.

No especifica cuál es el punto de corte en cuanto al número de embriones con 7-8 células en D+3 para considerar el cultivo hasta blastocisto.

Según Papanikolau et al, 2005 (38), es posible una tasa de cancelación prácticamente nula cuando se tienen como mínimo cuatro embriones de buena calidad en D+3.

Thum et al, 2010 (39) que ajusta mejor el número de embriones de buena calidad en función de la edad de la paciente y en pacientes con 34 años o menos, recomienda tener como mínimo 4 embriones de buena calidad en D+3, mientras que cuando la edad de la paciente es igual o superior a 35 el número de embriones óptimos pasa a ser 6 en D+3.

En el trabajo de Guerif et al, 2009 (8), se muestra una tasa de cancelación del 7% y encuentra una tasa de nacimiento por ciclo superior cuando se realiza la transferencia de un blastocisto comparado con la transferencia de un embrión en D+3. Cuando compara la tasa de nacimiento acumulativa teniendo en cuenta las posteriores transferencias de embriones criopreservados, no encuentra diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

El protocolo de criopreservación utilizado no es homogéneo en el estudio. Dependiendo del periodo en que se realizó la congelación los embriones fueron congelados mediante el protocolo lento en dos pasos o mediante la vitrificación. Quizás los resultados se vean enmascarados por esto y teniendo en cuenta que la vitrificación supone una mejora sustancial en la congelación de blastocistos, la conclusión de este estudio podría variar si la metodología empleada en todos los ciclos fuera la vitrificación.

Wilson et al, 2002 (26) concluye en su estudio que la incorporación del cultivo hasta blastocisto en todo el programa de FIV supone un aumento en la tasa de embarazo evolutivo para las pacientes menores de 35 años y también para todo el programa disminuyendo el número de embriones transferidos y en consecuencia la tasa de embarazo múltiple. No tiene diferencias significativas en la tasa de cancelación de transferencias aunque es superior en el grupo de blastocistos.

Tiene sentido prolongar el cultivo hasta blastocisto cuando se dispone de muchos embriones de buena calidad en D+3 ya que se ha demostrado que el cultivo largo es una buena herramienta de selección embrionaria.

Con la vitrificación como técnica de criopreservación embrionaria, la supervivencia de los embriones congelados en mórula compactada y en estadio de blastocisto no se ve comprometida y las tasa de embarazo e implantación de estos embriones son comparables a los ciclos en fresco. Esto conlleva que la congelación en estos estadios es igual o superior a la obtenida en embriones en estadios tempranos y no supone una limitación para prolongar el cultivo embrionario hasta el estadio de blastocisto con el fin de seleccionar el mejor embrión para la transferencia.

Los resultados publicados muestran que en ningún caso se suele obtener una tasa de implantación superior al 60% tras la transferencia de blastocistos y este podría ser el límite al que podemos aspirar en pacientes de buen pronóstico. La transferencia en estadio de blastocisto no asegura la ausencia de anomalías cromosómicas pero en mujeres con menos de 37 años la incidencia de estas anomalías se reduce del 59% en embriones de D+3 al 35% en blastocistos (40). Se deduce de ello una cierta selección mediante cultivo hasta blastocisto en cuanto a anomalías cromosómicas se refiere.

La identificación del embrión con máxima capacidad implantatoria mediante una selección por desarrollo embrionario y por normalidad cromosómica mediante PGS nos permitirá, no solo ayudar a las pacientes con riesgo de generar embriones anormales, sino también disminuir las tasas de embarazos múltiples mediante la transferencia de un solo embrión (31).

Quizás éste sea el camino para superar el límite actual de implantación de los embriones procedentes de técnicas de reproducción asistida.

Hay que recordar que no todos los fallos de implantación son atribuibles a causas cromosómicas en el embrión. Problemas en la receptividad uterina o en el desarrollo embrionario en embriones cromosómicamente normales deben ser también tenidos en cuenta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gardner Dk, Schoolcraft WB, WagleyL, Schlenker T, Stevens J, Hesla J. A Prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. Hum Reprod 1998; 13:3434-3440.

2. **Fanchin R, Ayoubi JM, Righini C, et al.** Uterine contractility decreases at the time of blastocyst transfers. *Hum Reprod* 2001; 16:1115-1119
3. **ASEBIR, Cuadernos de embriología clínica II.** Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. 2ª ed. Madrid: Gobalo; 2008
4. **Munne S.** Chromosome Abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Rprod Biomed Online*. 2006; 12(2):234-54.
5. **Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi FJ, Mack C and Scott RT.** Human embryo fragmentation *in vitro* and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril* 1999; 71: 836-842.
6. **Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, Eestermans W, Gerris J.** Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod* 1999; 14:2345-2349.
7. **Cuadros J. Estado Actual del grupo de interés de calidad embrionaria.** Actualidad de la clasificación de ASEBIR. *Rev Asebiri*. Dic 2009; 14:10-12.
8. **Guerif F, Lemseffer M, Bidault R, Gasnier O. Sausseureau M.H., Cadoret V, Jamet C, and Royere D.** Single Day 2 embryo versus blastocyst-stage transfer: a prospective study integrating fresh and frozen embryo transfers. *Hum Reprod* 2009; 24(5):1051-1058.
9. **Van del Auwera I, Debrock S, Spiessens C, Afschrift H, Bakelants E, Meuleman C, Meeuwis L and Hooghe T. M.D.** A prospective randomized study: day 2 versus day 5 embryo transfer. *Hum Reprod* 2002; 7(6):1507-1512.
10. **Nicas G.** Endometrial receptivity: changes in cell-surface morphology. *Seminars in Reprod Med* 2000; 18:229-35.
11. **Dawson KJ, Conaghan J, Oстера GR, Winston RM, Ardi K.** Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. *Human Reprod* 1995; 10:177-82
12. **Coskun S., Hollanders J., Al-hassan S., Al-Sufyan H., Al Mayman H., and Jaroudi K.** Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000; 15(9):1947-1952.
13. **Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Ferrero S, Minasi MG, Martinez F, Tesarik J, Greco E.** Day 3 embryo transfer with combined evaluation at the pronuclear and cleavage stages compares favourably with day 5 blastocyst transfer. *Hum Reprod* 2002; 17(7):1852-1855.
14. **Vassena R, Boue S, Gonzalez-Roca E, Aran B, Auer H, Veiga A, Izpisua Belmonte JC.** Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development* 2011; 138:1-11.
15. **Pantos K, Makrakis E, Chronopoulou M, Biba M, Perdikaris A, Dafereras A.** Day 4 versus day 3 embryo transfer: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril*. 2008 Mar; 89(3):573-577.
16. **Kiltz R, Woodhouse D, Miller D, Sciera A, Corona J.** Efficacy of day 4 embryo transfer (ET) in minimizing weekend staffing requirements. *Fertil Steril* 2003; 80(3):126
17. **Montag M, Van der Ven K, Dorn C, Van der Ven H.** Extended embryo culture reduces the implantation rate on day 4 and day 5 when only a maximum of three embryos are cultured beyond the pronuclear stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006; 124:65-69.
18. **Menezo YJ, Guerin JF, Czyba JC.** Improvement of human early embryo development *in vitro* by coculture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod*. 1990; 42(2):301-306.
19. **Simon C, Mercader A, Garcia-Velasco J, Nikas G, Moreno C, Remohi J.** Co-culture of human embryos with autologous human endometrial epithelial cells in patients with implantation failure. *Fertil and Steril* 1999; 84(8):2638-2646.
20. **Bavister BD.** Culture of preimplantation embryos: facts and artefacts. *Hum Reprod* 1995; 1: 91-148.
21. **Gardner Dk, Lane M, Calderon I, Leeton J.** Environment of the preimplantation human embryo *in vivo*: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cell. *Fertil and Steril* 1996; 65(2):349-353.
22. **Gardner D.K, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Scholcraft WR.** Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rate and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 1998b; 69(1):84-88.
23. **Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhart J, Dasig D.** Preliminary clinical experience with human blastocyst development *in vitro* without co-culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 454-457.
24. **Schoolcraft, W.B. and Gardner, D.K.** Blastocyst culture and transfer increases the efficiency of oocyte donation. *Fertil. Steril*. 2000; 65:1245-1248.
25. **Gardner Dk, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13(12):3434-3440.
26. **Wilson M, Hartke K, Kiehl M, Rodgers J, Brabec C, Lyles R.** Integration of blastocyst transfer for all patients. *Fertil Steril*. 2002; 77(4):693-696.
27. **Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, Kasai M.** Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod*. 1998; 13(10):2874-2879.
28. **Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Ross R.** Contrasting patterns in *in vitro* fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony. *Fertil Steril*. 2008; 89(1):20-26.
29. **Harper J.C, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, Traeger-Synodinos J, Van Rij M.C, and Goossens V.** ESHRE PGD consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod* 2010; 25(11):2685-2707.
30. **Mastenbroek S, Twisk M, van der Veen F, Repping S.** Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2011; 17(4):454-66.
31. **Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munne S, Katz-Jaffe MG, Wells D.** Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril*. 2010; 94(5):1700-1706.

-
32. **Sandalinas M.** Aplicación de Array-CGH en el Screening de Aneuploidías. *Rev Asoc Est Biol Rep* 2011; 16 (2):39-44.
33. **Gunby JL, Daya S, Olive D, Brown J.** Day three versus day two embryo transfer following *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection (Review) The Cochrane collaboration. 2009. Published by John Wiley and Sons, Ltd.
34. **De los Santos MJ, Mercader A, Galan A, Albert C, Romero JL, Pellicer A.** Implantation rates alter two, three, or five days of embryo culture. *Placenta*, 2003 Oct; 24(B):S13-19.
35. **Torelló M.J, Colomar A, Tur R, Burell R, Veiga A y Barri P.N.** Criterios de valoración de calidad embrionaria y tasa de implantación en transferencias selectivas de un embrión. *Revista XXVI Congreso Nacional SEF* Mayo 2006:193.
36. **Huisman GJ, Alberda AT, Leerentveld RA, Verhoeff A, Zeilmaker GH.** A Comparison of *in vitro* fertilization results after embryo transfer after 2,3 and 4 deays of embryo culture. *Fertil Steril* 1994; 61:970-971.
37. **Blake D, Farquhar C, Johnson N, Proctor M.** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review). Copyright 2011. The Cochrane collaboration. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
38. **Papanicolau EG, D'haesleet E, Verheyen G, Van de Velde H, Cammus M, Van Steireghem A.** Live birth rate is significantly higher alter blastocyst transfer tana alter cleavage.stage embryo transfere qhen at least tour embryos are avialable on Day 3 of embryo culture. A randomised prospective study. *Hum Reprod* 2005; 20(11):3198-3203
39. **Thum MY, Wells V, Abdalla H.** Patiens selection criteria for blastocyst culture in IVF/ICSI treatment.*J Assist Reprod Genet* 2010;27:555-560.
40. **Staessen C, Plateau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Cammul M, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A.** Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum Reprod* 2004;19: 2849-2858.