

Óptimo día de desarrollo embrionario para transferencia en ciclos de reproducción asistida

Optimal day for embryo transfer in assisted reproduction cycles

Israel Obed Carmona Ruiz, Eric Saucedo de la Llata, María Rosa Moraga Sánchez, Jesús Julián López Reyes, Alberto Romeu Sarrió

Imar Fertilidad

RESUMEN

Objetivos: Comparar los resultados de ciclos de reproducción asistida según la etapa del desarrollo embrionario el día de la transferencia.

Ámbito: Pacientes que se someten a ciclos de reproducción asistida del centro de Reproducción Asistida Imar Fertilidad.

Diseño: Estudio descriptivo observacional retrospectivo.

Material y método: Se incluyen 134 transferencias embrionarias y clasifican en 3 grupos: Grupo 1, embriones en día 2 y día 3 en el momento de la transferencia embrionaria; Grupo 2, embriones en día 4; Grupo 3, embriones en día 5 y día 6 al momento de la transferencia. Se considera que hay diferencia estadística con un valor menor a $<0,01$ utilizando la prueba de chi cuadrada.

Resultados: La tasa de embarazo por grupo es de 32,5%, 51% y 56% para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente; no hay diferencias significativas. La tasa de implantación es de 17,5%, 25,8%, 18,91% para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente; no se observa significancia estadística. Se pierden el 40,4% de embriones para el grupo 1, el 48,8% en el grupo 2 y el 50% de embriones para grupo 3; no hay diferencias significativas en los grupos comparados. Se vitrifica el 35,4% de embriones en el grupo 1; el 28,6% del grupo 2 y solamente el 13% de embriones para el grupo 3; hay diferencia estadística a favor de los grupos 1 y 2.

Conclusiones: Consideramos que los resultados de ciclos de transferencia en mórula pueden ser bene-

Aceptado: 5/6/14
Correspondencia: Israel Obed Carmona Ruiz
Imar Fertilidad
Calle Miguel Hernández, 3, 30011 Murcia
israel.carmona@clinicaimar.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

ficiosos debido a que logran tasas de embarazo similares a las de blastocisto sin la pérdida embrionaria que conlleva el dejar a cultivo de día 5 estos embriones y a su vez, beneficiándonos de una tasas de criopreservación similar a la de estadios tempranos del desarrollo.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2014; 31; 25-30 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras clave: *Transferencia embrionaria, transferencia en mórula, transferencia en blastocisto*

SUMMARY

Objectives: To compare results of assisted reproduction cycles according to embryo stage at the moment of the transfer.

Setting: Transfer cycles of an In Vitro Fertilization Program in a Reproduction Assisted center: Imar Fertilidad.

Design: Observational retrospective study.

Material and method: 134 transfer cycles were selected and classified in to three groups: Group 1, Day 2 and Day 3 embryos at the moment of the embryo transfer; Group 2, Day 4 embryos; Group 3, Day 5 and Day 6 embryos at the transfer. Statistical difference is defined as a value of <0.01 after applying the chi square test.

Results: The pregnancy rate is 32.5%, 51% y 56% for groups 1, 2 and 3, respectively; there is not statistical difference. Implantation rate is 17.5%, 25.8%, 18.91% for groups 1, 2 and 3, respectively; there is not statistical difference. 40.4% of embryos in group 1 do not qualify for cryopreservation or enter into arrest; 48.8% of group 2 and 50% of embryos of group 3; there is no statistical difference among groups. 35.4% of embryos in group 1 are cryopreserved; 28.6% in group 2 and only 13% of embryos in group 3; there is statistical significance favoring groups 1 and 2.

Conclusions: We consider that day 4 embryo transfer has the advantage of high pregnancy and implantation rates, similar to those of day 5 embryos, plus, the availability of a high number of embryos for cryopreservation, as in day 3 embryo transfers.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2014; 31; 25-30 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Keywords: Embryo transfer, morula transfer, blastocyst transfer

A pesar de los numerosos avances en las técnicas de reproducción asistida, las tasas de implantación y embarazo no se incrementan. En 1995, el Dr. Robert Edwards estimó que el 85% de los embriones transferidos en la cavidad uterina no logra implantarse (1). Para justificar estas bajas tasas de éxito, se ha responsabilizado a una mala receptibilidad endometrial, mala capacidad embrionaria de implantación o a una técnica de transferencia subóptima.

Se ha demostrado que a pesar de la simplicidad del procedimiento, la transferencia embrionaria es de máxima importancia para mejorar las probabilidades de embarazo. Un factor que continúa siendo debatido es el estadio óptimo de desarrollo embrionario en el cual se debe realizar la transferencia.

Algunos investigadores afirman que retrasar la transferencia embrionaria de un día dos a un día tres, mejora las probabilidades de embarazo (2). Una revisión de la base de datos Cochrane muestra que, a pesar de que la tasa de embarazo es más alta en día tres comparada con día dos de desarrollo

embrionario, no hay evidencia suficiente para sugerir que la tasa de nacido vivo se incrementa (2).

Así mismo, se afirma que los estadios de blastocisto mejoran las tasas de éxito y disminuyen la tasa de embarazo múltiple (3-5). Una revisión Cochrane encuentra evidencia de una diferencia significativa en tasa de nacido vivo a favor de la transferencia en blastocisto comparada con transferencia en día 2 o 3. Sin embargo encuentran que las tasas de embarazo clínico son más altas en este último estadio a comparación del blastocisto, explicando esto por un alto porcentaje de transferencia de embriones congelados obtenida por protocolos de transferencia de embriones en estadio temprano (6). Un estudio elaborado por Imbar y colaboradores, sugiere que la sincronización entre el desarrollo embrionario y el endometrio, no es crucial para la implantación como originalmente se propone (7).

En el presente trabajo se comparan las tasas de implantación y embarazo clínico entre los diferentes estadios de desarrollo embrionario en el momento de la transferencia, con el

propósito de establecer si con menos días de cultivo se pueden igualar las tasas de implantación y embarazo que se obtienen con transferencia de blastocisto.

OBJETIVOS

- Comparar los resultados de ciclos de reproducción asistida según el día del desarrollo embrionario al momento de la transferencia, en función de la tasa de embarazo, tasa de implantación y de recién nacido vivo.
- Determinar si la transferencia en día 4 del desarrollo embrionario nos da resultados comparables a la transferencia en día 5.

MATERIAL Y MÉTODO

Es un estudio descriptivo, observacional, retrospectivo. Se hace una revisión de casos en la que se incluyen 134 transferencias embrionarias comprendidas entre 1 de Febrero del 2012 y el 31 de Julio del 2013, dividiendo los grupos según el estadio de desarrollo embrionario. Se forman 3 grupos: Grupo 1, embriones en día 2 y día 3 en el momento de la transferencia embrionaria; Grupo 2, embriones en día 4; Grupo 3, embriones en día 5 y día 6 al momento de la transferencia.

TRATAMIENTO DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA

La estimulación ovárica controlada se realiza con FSH recombinante a dosis de 225 UI del 3er día del ciclo hasta el 12 aproximadamente. Se agrega antagonista de la hormona liberadora de gonadotropinas cuando se alcanza un folículo mayor de 14mm de diámetro o bien, un estradiol sérico de 500 pg/mL. Se aplica hormona gonadotropina coriónica recombinante (hCG) a dosis de 250 mcg al obtener 2 ó más folículos con diámetro medio de 18mm y a las 34 horas se procede a la aspiración folicular.

Se realizó FIV (Fertilización in vitro) convencional si la edad de la mujer era menor a 35 años; se practica ICSI (Inyección Intracitoplásmica de espermatozoide) en muestra seminal con oligospermia igual o menor a 5 mill/mL, astenospermia menor al 20% de motilidad A + B y, como principal factor determinante, en muestras que presentan una morfología igual o menor a 4% por criterio estricto, todo esto con valores OMS 2010. Cuando existe el antecedente de 3 o más inseminaciones intrauterinas sin éxito o bien, un fallo previo de fertilización se realizó ICSI. Los embriones transferidos se clasificaron en grupos acorde al día de transferencia dejando evolucionar a mórula o blastocisto si al día 3 de desarrollo se tienen 4 ó más embriones de calidad A y/o B según los criterios de ASEBIR. El soporte de fase

lútea se da con la administración vaginal de progesterona micronizada a dosis de 800 mg al día repartidos en dos aplicaciones desde el día de la punción folicular hasta la prueba de embarazo en sangre. En caso de ser positiva, se continúa hasta evidenciar frecuencia cardíaca fetal.

MANEJO DE LOS DATOS Y ANÁLISIS

Se utilizó estadística descriptiva, para variables cualitativas: distribución de frecuencias, proporciones y tasas. Para variables cuantitativas: medidas de tendencia central y medidas de dispersión.

En variables numéricas t de student y en variables categóricas la prueba de X².

RESULTADOS

En el grupo 1 se incluyen 83 casos; en el grupo 2, 37 y en el grupo 3, 25 procedimientos.

La tabla 1 enumera las características de los pacientes. No hay diferencia significativa en cuanto a edad, si es infertilidad primaria o secundaria, el tiempo de infertilidad de la pareja, el perfil hormonal de la mujer, ni los pacientes fumadores y no fumadores.

La tabla 2 muestra las características del semen. No se encuentran diferencia significativa en los distintos parámetros seminales.

Se obtienen un total de 347 embriones en el grupo 1, 133 en el grupo 2 y 100 embriones en el grupo 3. De éstos, se transfieren una tasa de 24,2% (n=84), 22,6% (n=30) y 37% (n=37) para grupo 1, 2 y 3 respectivamente. Se vitrifican el 35,4% (n=123) de embriones en el grupo 1, el 28,6% (n=38) del grupo 2 y el 13% (n=13) del grupo 3 (Tabla 3).

Se pierden o desechan un porcentaje del 40,4% (n=140) de embriones para el grupo 1; 48,8% (n=65) para el grupo 2 y un 50% (n=50) para el grupo 3 (Tabla 3). Estos embriones que se pierden o desechan, es debido a su detención en el desarrollo, o bien, no cumplen con los criterios de ASEBIR para su preservación y sobrevida por medio de vitrificación.

No hay diferencias significativas entre las tasas de embarazo y de implantación según cada grupo (Tabla 3). Se observa una diferencia estadística en nacido vivo al comparar contra el grupo de transferencia en día 5 a favor de los grupos con transferencia en días 2-3 y 4 (Tabla 3).

DISCUSIÓN

La transferencia embrionaria es la intervención que permite el contacto entre el endometrio y el pre-embrión, haciendo

TABLA 1

Características de los pacientes

		Grupo 1 (n=83)	Grupo 2 (n=37)	Grupo 3 (n=25)	P	
Características de la Mujer	Edad (años)	35,82±3,99	35,27±3,75	36,23±3,82	NS	
	Infertilidad	Primaria (%)	63,8	63,6	52,4	NS
		Secundaria (%)	36,2	36,4	47,6	
	FSH (UI/L)	8,51±1,18	8,20±1,01	9,11±1,22	NS	
	Estradiol (pg/mL)	46,04±4,22	46,36±5	49,82±3,22	NS	
	IMC (KG/Talla ²)	24,13±2,25	24,19±1,85	24,42±2,65	NS	
Características del Varón	Edad (años)	36,91±2,87	37,12±3,25	36,76±2,55	NS	
	Fumador	No (%)	70	72,7	61,9	NS
Sí (%)		30	27,3	38,1		
Características de la pareja	Años de Infertilidad	3,45±2,26	3,24±2,58	3,85±2,87	NS	

TABLA 2

Características seminales

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	P
Volumen (mL)	2,93±0,82	3,05±0,87	2,78±0,90	NS
Concentración espermática (millones/mL)	42,84±11,14	40,15±10,80	53,59±11,32	NS
Motilidad (%)	34,28±8,33	36,96±8,97	33,85±8,55	NS
Formas normales (%)	15,70±6,34	16,72±5,38	16,09±5,98	NS
Kruger (%)	3,55±1,67	3,96±1,24	3,19±1,37	NS
CTM (millones/mL)	52,13±21,47	50,95±22,21	66,59±20,54	NS

posible la implantación de éste y el establecimiento de una gestación. Para ello, es necesario que el potencial biológico del pre-embrión sea adecuado (8), que el endometrio sea receptivo (9) y que la intervención sea técnicamente correcta, evitando el deterioro tanto del uno como del otro (10).

En la especie humana, la fecundación tiene lugar en el tercio externo de la trompa; en consecuencia, el producto de la fecundación debe ser transportado, a lo largo de aquella, hasta la cavidad uterina. La formación del pre-embrión y, por ende, el desarrollo del blastocisto tiene lugar en la trompa. El transporte es el resultado de la interacción entre el pre-

embrión y el endosálpinx y en este proceso parecen jugar un papel los esteroides sexuales, las prostaglandinas y el factor activador de las plaquetas (PAF) (11). Inmediatamente después de la fecundación, de la que resulta un ovocito fecundado con dos pronúcleos (zigoto), se producen una serie de divisiones mitóticas que dan lugar al blastocisto.

Edwards y colaboradores analizaron la cronología del desarrollo in vitro de preembriones humanos, evidenciando que el estadio de dos células se alcanza a las 28 horas, el de 4 a las 43 horas y el de 8 células a las 54 horas de la fecundación. Así mismo, comprobaron que la compactación se ini-

TABLA 3

Resultados del ciclo

	Grupo 1 (n=83)	Grupo 2 (n=37)	Grupo 3 (n=25)	P
Total de embriones	347	133	100	
Promedio de embriones por transferencia	1,80	1,87	1,7	NS
Tasa de embriones transferidos (%)	24,2	22,6	37	NS
Tasa de embriones vitrificados (%)	35,4	28,6	13	S ²⁻³
Tasa de pérdida de embriones (%)	40,4	48,8	50	NS
Embarazo (%)	32,5	51	56	NS
Tasa de implantación (%)	17,5	25,8	18,91	NS
Tasa de nacido vivo	81,48	73,68	35,7	S ²⁻³

Grupos comparados:

1. I/II.
2. I/III.
3. II/III.

cia en el estadio de 16 células y que la formación del blastocisto se inicia entre los días 4 y 5 post-fecundación (12).

A lo largo de los años han sido realizados estudios retrospectivos y prospectivos destinados a analizar la conveniencia de realizar la transferencia en uno u otro plazo post-punción, lo que supone un mayor o menor grado de desarrollo del embrión.

Es importante señalar que, en la especie humana, el embrión de 4 a 8 células se encuentra, sistemáticamente, en la trompa y que sólo va a penetrar en el útero después de la compactación (13). Según esto, cuando la transferencia, como es habitual en la práctica, se hace en el día 2 o 3, con respecto a la reproducción natural, el embrión llega a la cavidad endometrial con 3 o 4 días de adelanto y ello podría tener como consecuencia una merma de las posibilidades de implantación, ya que: a) el genoma embrionario todavía no se ha activado y ello puede impedir la llegada de señales embrionarias al endometrio, b) no se han producido la diferenciación y la polarización celulares y c) la receptividad endometrial puede no ser la óptima. En el presente trabajo observamos una tasa de embarazo menor al compararla con transferencia en estadios más avanzados, sin embargo, los resultados no fueron significantes.

Ya ha sido señalado que, en el proceso fisiológico, el pre-embrión alcanza la cavidad uterina cuando se han iniciado la compactación y la expresión del genoma embrionario. En consecuencia, al menos desde un punto de vista teórico, puede aceptarse que la capacidad embrionaria para implan-

tar es mayor cuando el pre-embrión alcanza mayor grado de desarrollo. Ello siempre que las condiciones de su desarrollo in vitro sean las adecuadas y no supongan un deterioro de esta capacidad.

De hecho, al ser transferidos blastocistos humanos obtenidos por lavado de la cavidad uterina, se observó una tasa de implantación de 60% (14). Nuestros resultados muestran tasas similares al alcanzar un 56% de índice de embarazo en transferencia en día 5 ó 6 de desarrollo embrionario.

El desarrollo de los pre-embriónes en el laboratorio ha presentado dificultades debido a que las necesidades metabólicas de los mismos van cambiando con el tiempo, de forma que los medios de cultivo tienen que adaptarse a estos cambios para mantener la adecuada viabilidad embrionaria, como demostraron las investigaciones de Gardner y colaboradores (13), que permitieron obtener blastocistos con elevada capacidad de implantación.

El análisis retrospectivo de 2297 transferencias realizado por Huisman y colaboradores (15) mostró que las tasas de gestación evolutiva transfiriendo en día 2, 3 o 4 eran respectivamente, 23,3%, 21,9%, y 26,4%, con tasas de gestación múltiple de 36,2%, 38,8%, y 32,6%. Estos autores señalaron que la tasa de implantación de una serie de mórulas cavitando fue sorprendentemente alta (41%). En la misma publicación fueron señaladas las ventajas de transferir blastocistos: a) mejorar las tasas de gestación e implantación, b) transfiriendo menor número de embriones, disminuir la tasa de múltiples, c) debido al elevado número

de preembriones que no alcanzan el estadio de blastocisto, disminuir las necesidades de criopreservación de preembriones “sobrantes” y d) poder disponer de más tiempo para la práctica de estudios genéticos de blastómeras biopsiadas. Nuestros resultados son comparables obteniendo tasas de embarazo con transferencia en día 2-3, 4 y 5-6 del 32,5%, 51% y 56% respectivamente. Es de destacar que los resultados con transferencia en mórula prácticamente se equiparan a la transferencia en blastocisto.

Gardner y colaboradores (13) realizaron un estudio prospectivo en el que compararon los resultados obtenidos tras la transferencia de blastocistos (n=8) con los obtenidos tras la transferencia en día 3 (n=15). Observaron que, aunque las tasas de gestación no mostraron diferencias entre los grupos, la tasa de implantación de los blastocistos fue el doble de la de los pre-embriónes en células. Esto es algo muy similar a lo observado en nuestro estudio a pesar de la falta de significancia que puede deberse al número de casos incluidos por grupo.

No obstante, puede afirmarse que un elevado porcentaje de pre-embriónes detiene su desarrollo *in vitro* y no alcanza el estadio de blastocisto, habiendo sido postulado que la probabilidad de que se pueda realizar la transferencia con al menos un blastocisto depende del número de ovocitos obtenidos en la punción, número que está vinculado a la edad de las pacientes (16). Esto nos hace pensar que la transferencia en mórula puede ser beneficiosa debido a que se dispone de un mayor número de embriónes, a las ventajas propias de un estadio avanzado en selección embrionaria y a los buenos resultados tanto en tasa de embarazo como de implantación.

Si analizamos las tasas de embriónes vitrificados por grupo, podemos encontrar una diferencia significativa al comparar el grupo 1 y 2 contra el grupo 3. Esto significa que tenemos mayores posibilidades de realizar un segundo ciclo en cada caso al tener un mayor número de embriónes criopreservados. En nuestro laboratorio solamente se vitrifica en días 3 y 5 de desarrollo embrionario, esto, por normativa general.

La tasa de pérdida de embriónes (detención en la división celular o degeneración de los mismos), como es esperado, resulta mayor para el estadio de blastocisto: 40,4%, 48,8% y 50% para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. No encontramos diferencias significativas, sin embargo, esto puede deberse al tamaño muestral.

Es interesante como nuestros resultados demuestran una mejor tasa de nacido vivo al transferir en días 2-3 y 4 contra lo obtenido en día 5 de transferencia. Esto contrasta estudios recientes como el meta-análisis de la base de datos Cochrane del 2012 (6) y el meta-análisis Wang y colaboradores donde observan una mejora a favor de la transferencia en

día 5 o blastocisto (17). Esto pudiera verse influenciado por el número de casos por grupo.

Nuestros resultados sugieren que la transferencia en mórula puede ser beneficiosa por los puntos mencionados con anterioridad, siendo los resultados no concluyentes probablemente a causa del número de casos por grupo. Nuevos estudios con mayor casuística son necesarios para obtener conclusiones definitivas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Edwards RG. Clinical approaches to increasing uterine receptivity during human implantation. *Hum Reprod* 1995; 10:60-66.
2. Oatway C, Gunby J, Daya S. Day three versus day two embryo transfer following *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev* 2004; 2:004378.
3. Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, et al. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril* 2004; 81:551-555.
4. Levitas E, Lunenfeld E, Har-Vardi I, et al. Blastocyst-stage embryo transfer in patients who failed to conceive in three or more day 2-3 embryo transfer cycles: a prospective, randomized study. *Fertil Steril* 2004; 81:567 - 571.
5. Pantos K, Makrakis E, Karantzis P, et al. Blastocyst versus early cleavage embryo transfer: a retrospective analysis of 4,165 transfers. *Clin Exp Obstet Gynecol* 2004; 31:42 - 44.
6. Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2012, Issue 7.
7. Imbar T, Hurwitz A. Synchronization between endometrial and embryonic age is not absolutely crucial for implantation. *Fertil Steril* 2004; 82:472 - 474.
8. Hattshome G, Edwards R. Role of embryonic factors in implantation: recent developments. *Bailliere's Clin Obstet Gynecol*. 1991;5:133 - 58.
9. Paulson R, Sauer M, Lobo R. Embryo implantation after human *in vitro* fertilization: importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 1990;53:870-4.
10. Schoolcraft W, Surrey E, Gardner D. Embryo transfer: techniques and variables affecting success. *Fertil Steril*. 2001;76:863 - 70.
11. Velasquez L, Maisey K, Fernandez R, Valdes D, Cárdenas H, Ima-rai M, et al. PAF receptor and PAF acetylhydrolase expression in the endosalpinx of the human fallopian tube: possible role of the embryo-derived PAF in the control of embryo transport to the uterus. *Hum Reprod*. 2001;16:1583 - 7.
12. Edwards R, Purdy J, Steptoe P, Walters D. The growth of human preimplantation embryos *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;141:408 - 16.
13. Gardner D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft W. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril*. 1998;69:84 - 8.
14. Buster J, Bustillo M, Rodi I, Cohen S, Hamilton M, Simon J. Biologic and morphologic development of donated human ova by non-surgical uterine lavage. *Am J Obstet Gynecol*. 1985;153:211 - 7.
15. Huisman G, Alberda A, Leerentveld R, Verhoeff A, Zeilmaker G. A comparison of *in vitro* fertilization results after embryo transfer after 2, 3 and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril*. 1994;61:970 - 1.
16. Scholtes M, Zeilmaker G. Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer depends primarily on the number of oocytes retrieved and not on age. *Fertil Steril*. 1998;69:78 - 83.
17. Lee S-H, Lee H-S, Lim CK, et al. Comparison of the clinical outcomes of day 4 and 5 embryo transfer cycles. *Clin Exp Reprod Med* 2013;40(3):122-125.