

Estudio comparativo entre coincubación corta y coincubación larga de gametos humanos en fertilización *in vitro*

Carlos Linder Effer,* Carlos Navarro Martínez,* Julio González Cofrades,*
Rolando Álvarez Valero,* Andrea Alicia Olguín Ortega,* Robin Jennifer Shaw Dulin*

RESUMEN

En la fertilización *in vitro* (FIV) convencional, la exposición de ovocitos a espermatozoides tiene un promedio de 16 a 20 horas. La exposición por largo tiempo puede limitar las tasas de implantación y embarazo. La coincubación corta de gametos ha demostrado tener mejores resultados en cuanto a tasas de implantación y embarazo. **Objetivos:** Evaluar la tasa de fertilización, implantación y embarazo. **Material y métodos:** Fueron analizadas 284 pacientes atendidas entre enero del 2000 y diciembre del 2006. Las pacientes fueron distribuidas en dos grupos de acuerdo al tiempo de incubación de los gametos. Grupo A (n = 225): 3,212 ovocitos coincubados por dos horas. Grupo B (n = 59): 654 ovocitos coincubados por 16 a 20 horas. **Resultados:** Se observó mayor calidad embrionaria en el grupo de coincubación corta en el día 3 (p = 0.023). El porcentaje de sacos gestacionales mostró diferencia significativa, lo mismo que la tasa de implantación (p < 0.0001). La fracción beta de la hormona coriónica gonadotrófica presenta valores significativamente mayores en el grupo A (p = 0.001 y p < 0.001), respectivamente). La tasa de embarazo entre el grupo A (110/225 = 48.9%) y el grupo B (12/59 = 20.3%) resultó ser altamente significativa (p < 0.0001). **Conclusiones:** La exposición corta de gametos incrementa las tasas de implantación y embarazo. La calidad embrionaria en la coincubación corta es significativamente mejor.

Palabras clave: Fertilización *in vitro*, coincubación, embarazo, gametos, ovocitos.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad es una condición común con implicaciones psicológicas, económicas, demográficas

ABSTRACT

In conventional in vitro fertilization, the oocyte exposure to sperm is 16 to 20 hours in average. Long time exposure could limit the implantation and pregnancy rate. The short gamete coincubation has demonstrated better results on implantation and pregnancy rates. Objectives: To evaluate fertilization, implantation and pregnancy rates. Material and methods: 284 patients between January 2000 and December 2006 were studied. Group A (n = 225), 3212 coincubated oocytes for 2 hours. Group B (n = 59), 654 coincubated oocytes for 16 to 20 hours. Results: The study showed better embryo quality in the short coincubation group on day 3 (p = 0.023). Implantation rate and gestational sac ratio demonstrate a significant difference between groups (p < 0.0001). β -hCG levels were significantly higher in group A (p = 0.001 and p < 0.001 respectively). Pregnancy rate between group A (110/225 = 48.9%) and group B (12/59 = 20.3%) result highly significant (p < 0.0001). Conclusions: The short exposure of gametes increases implantation and pregnancy rates. The embryo quality using short coincubation is significantly higher.

Key words: In vitro fertilization, coincubation, pregnancy, gametes, oocytes.

y médicas importantes. Es definida como la incapacidad de concebir después de un año de practicar relaciones sexuales con promedio de dos a tres veces por semana sin el uso de algún método anti-conceptivo. En general, la pareja normalmente fértil, posee sólo un 20% de probabilidad de lograr un embarazo por mes,¹ obteniendo un porcentaje anual de probabilidad de embarazo de 93%.

Se han investigado diversos factores etiológicos que incrementan el riesgo de infertilidad. Los más frecuentes son edad, la tasa reproductiva disminu-

* Departamento de Ginecología y Obstetricia, Centro Médico ABC.

Recibido para publicación: 18/08/09. Aceptado: 21/09/09.

Correspondencia: Dr. Carlos Linder Effer

Av. Carlos Graef Fernández # 154, Cons. 341, Col. Tlaxala Santa Fe, 05300 México, D.F. Tel. 52726164. E-mail. clindermd@gmail.com

ye mientras la edad aumenta,² y enfermedad pélvica inflamatoria, porque existe riesgo de daño u oclusión tubaria secundaria al proceso infeccioso. También existen factores relacionados con el estilo de vida como tabaquismo, que presenta un riesgo relativo de infertilidad de 1.36;³ alcoholismo, el cual afecta principalmente la fertilidad en hombres; así como dieta y ejercicio extremo, porque la obesidad y la pérdida excesiva de tejido graso limitan la función hormonal normal. Los factores ocupacionales y ambientales no han demostrado un peso significativo en el área de la infertilidad, pero aumentan de manera significativa la tasa de abortos espontáneos en caso de exposición a radiación expedida por equipos de video⁴ y a la teratospermia presentada por individuos expuestos a ciertos pesticidas, plomo y otros metales pesados.⁵

Desde el primer reporte de un embarazo humano exitoso posterior a una fertilización *in vitro* (FIV) en 1978,⁶ la FIV y las técnicas de reproducción asistida han alcanzado un puesto importante en el manejo clínico de la infertilidad.

La fertilización *in vitro* (FIV) es el proceso mediante el cual los gametos (óvulo y espermatozoide) se combinan en un plato de Petri, bajo un medio ambiente estéril, con temperatura y pH controlados, con el fin de obtener las características ideales y el medio propicio para la fecundación y, posteriormente, el desarrollo del embrión.

Por el contrario de la percepción popular, la incidencia general de la infertilidad se ha mantenido relativamente sin cambio en las últimas tres décadas, alcanzando 10.2% en mujeres de 15 a 44 años,⁷ aunque la evaluación y el tratamiento de la infertilidad haya cambiado dramáticamente en este mismo lapso de tiempo. Tres puntos han afectado en forma directa este incremento. El primero fue la introducción de la fertilización *in vitro* (FIV), lo cual ha incrementado la posibilidad de embarazo para un número importante de parejas infértiles; especialmente en los casos de mujeres con factor tubario, en quienes las salpinges se encuentran con daño importante o con previa esterilización, o de hombres en los cuales los niveles de espermatozoides sanos para lograr una fertilización normal no son óptimos. Segundo, las mujeres buscan un embarazo a edades más tardías cuando son biológicamente menos férti-

les. Tercero, las parejas infértiles se encuentran más interesadas en su fertilidad y su relación con su edad, por lo que buscan técnicas de reproducción asistida (TRA) más pronto.⁷

Las técnicas de reproducción asistida son todas aquellas que involucran la directa manipulación de los ovocitos fuera del organismo, siendo la más común la FIV. Estas nuevas técnicas han revolucionado tanto la evaluación como el tratamiento de la infertilidad. La FIV consiste en una secuencia de pasos altamente coordinados que se inician con hiperestimulación ovárica controlada (HOC) mediante gonadotropinas exógenas, seguida de captura ovular guiada por ultrasonido transvaginal, fertilización de los gametos en laboratorio y la consecuente transferencia de embriones dentro de la cavidad uterina a través del cérvix.

La tecnología de reproducción asistida es utilizada ampliamente, siendo responsable de aproximadamente tres millones de nacimientos al año.⁸ Con el empleo de estas técnicas, la tasa de embarazos en la actualidad oscila entre 20 a 25% por ciclo de tratamiento, cifra que lleva a una tasa acumulativa posterior a cuatro intentos de 50 a 60%.⁹

Los métodos comunes de FIV suelen emplear una incubación prolongada de óvulos y espermatozoides (16-20 horas). Durante los últimos 20 años, se ha intentado mejorar la tasa de fertilización, implantación y embarazo. En 1996, Gianaroli describió la incubación corta de gametos, los cuales se coincubaban por sólo dos a cuatro horas. Los resultados presentados tuvieron un aumento significativo en las tasas de fertilización e implantación.¹⁰

A partir de la década de los 80, se postuló la posibilidad de exponer a los ovocitos y los espermatozoides a un tiempo reducido debido a la teoría de que los radicales libres de oxígeno liberados por el exceso de espermatozoides en periodo de apoptosis en el mismo medio de cultivo en el que se encontraba el cigoto podría ser nocivo para la vida del mismo.

Aunque existen autores que demuestran que la coincubación prolongada de gametos incrementa las tasas de implantación y embarazo,¹¹ la gran mayoría de expertos en el área exponen resultados en donde la coincubación corta de gametos (dos ho-

ras), realmente incrementan significativamente las tasas de fertilización, implantación y embarazo.

A diferencia de la teoría de los radicales libres de oxígeno, la de Dirnfeld señala que la coincubación prolongada produce engrosamiento de la zona pelúcida, lo cual afecta principalmente el proceso de implantación, ya que debe de existir ruptura de la zona pelúcida para libera así al blastocisto al momento de la implantación. Una zona pelúcida engrosada no permite la liberación del blastocisto lo que resulta en falla en el mecanismo de implantación.¹²

Con base en lo expuesto, se realizó este estudio cuyos objetivos fueron evaluar la tasa de fertilización, implantación y embarazo en un centro de reproducción humana después de coincubación corta y coincubación larga de gametos humanos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio cuasiexperimental, de corte transversal, retrolectivo y analítico en el que fueron analizados 284 ciclos de fertilización *in vitro* (FIV).

Los criterios de inclusión fueron: mujeres con diagnóstico de infertilidad primaria o secundaria sometidas a fertilización *in vitro* convencional.

Fueron seleccionadas un total de 284 mujeres que seguían tratamiento para FIV entre enero del 2000 y diciembre del 2006. Las pacientes fueron distribuidas en dos grupos de acuerdo al tiempo de incubación de los gametos. En el grupo A (n = 225), los gametos fueron coincubados por un lapso de dos horas; posteriormente, el cúmulus fue removido y los óvulos fueron colocados en un plato de cultivo con medio de cultivo fresco. En el grupo B (n = 59), los gametos fueron incubados de manera tradicional durante la noche por un tiempo de 16 a 20 horas.

Los ovocitos fueron calificados conforme a su madurez en la captura, y se incubaron durante las cuatro horas previas a la fertilización en medio P1 con 10% de sustituto de suero sintético (SSS; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). Los espermatozoides fueron preparados por centrifugación en gradiente de densidad Isolate (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). La fertilización se realizó utilizando 150×10^3 espermatozoides móviles por plato en un volumen de 200 uL, recubiertos por aceite mineral. En el grupo I (exposición corta), 3,212 ovocitos fueron retirados del medio de inseminación tras una exposición de dos horas. Estos ovocitos fueron en-

Cuadro I. Características generales y causas principales de infertilidad de las pacientes incluidas en los grupos de estudio.

Características	Grupo A (incubación corta) (n = 225)	Grupo B (incubación larga) (n = 59)
Edad (años)	31.5 ± 6.7	34.6 ± 4.6
Causas principales de infertilidad (%)		
Masculino	28.4	27.1
Endometriosis	13.3	18.6
Miomatosis uterina	3.1	8.5
Factor tuboperitoneal	26.2	33.9
Inmunológico	4.4	—
Falla ovárica prematura	16	—
Síndrome de ovario poliquístico	3.6	—
Esterilidad tubaria previa	2.7	10.2
Idiopática	2.2	1.7
Número total de ovocitos capturados	3,298	692
Promedio de ovocitos capturados por ciclo de estimulación	14.7 ± 7.8	11.7 ± 7.5

Cuadro II. Tasas de fertilización, calidad embrionaria (día 3), implantación y embarazo y significancia entre grupos de estudio.

	Grupo A	Grupo B	p
Ovocitos capturados (total)	3298	692	No valorable
Ovocitos inseminados (total)	3212	654	No valorable
Ovocitos fertilizados (total)	2338	429	No valorable
Tasa de fertilización	73.5	72.0	0.220
Calificación de embriones (día 3)	4.0	3.6	0.023
Sacos observados mediante ultrasonido (% ciclo)	0.68 ± 0.87	0.29 ± 0.72	< 0.0001
Tasa de implantación (%)	24.4	6.6	< 0.0001
β-hCG día 10 postransferencia de embriones (mU/mL)	112.8	24.7	0.001
β-hCG día 12 postransferencia de embriones (mU/mL)	650.2	59.3	< 0.001
Tasa de embarazo	110 (48.9%)	12 (20.3%)	< 0.0001

β-hCG = Fracción beta de hormona coriónica gonadotrófica.

juagados cuidadosamente y posteriormente cultivados en medio P1-SSS fresco. En el grupo II (exposición estándar) se coincubaron 654 gametos durante el tiempo convencional de 18 horas. La observación de dos pronúcleos se realizó en ambos grupos 18 horas posteriores a la exposición de los ovocitos con los espermatozoides.

Después de realizar la calificación de los cigotos, se procedió al cultivo embrionario en microgotas de 40 uL con medio P1-SSS, colocando no más de tres embriones por microgota.

La transferencia de los embriones fue realizada a las 72 horas de la captura con un catéter de transferencia de Marrs (Cook Ob/Gyn, USA).

Análisis estadístico. Se utilizó el programa SPSS versión 10 para Windows. Se utilizaron variables numéricas de tipo nominales y escalares.

Se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de la muestra. Las variables numéricas escalares se resumen con mediana e intervalo intercuartilar [Md (25°-75°)]. Se define la mediana como el valor que deja a cada lado la mitad de los valores de la muestra, el intervalo intercuartilar son los valores que se incluyen entre las percentilas especificadas. Las variables nominales se resumen en frecuencias y porcentajes.

Se usó la prueba de U de Mann-Whitney para comparar las variables numéricas escalares. Se utilizó la prueba de X² de Pearson o exacta de Fisher para las variables nominales.

Se consideró nivel de significancia estadística con un valor de $p < 0.05$

RESULTADOS

Se revisaron 284 ciclos de fertilización *in vitro* realizados entre enero de 2000 y diciembre de 2006.

El *cuadro I* muestra las características generales y causas principales de infertilidad de las pacientes incluidas en los grupos de estudio. Se observa que no hubo diferencia entre las edades, ni en el número total de ovocitos capturados en ambos grupos.

En el *cuadro II* se observa que la tasa de fertilización resultó comparable ($p = 0.22$). La calidad embrionaria entre ambos grupos resulta ser significativa, encontrando mayor calidad en el día 3 en el grupo de coincubación corta ($p = 0.023$). El porcentaje de sacos gestacionales por ciclo observados por ultrasonido resultaron tener diferencia altamente significativa entre ambos grupos, así como la tasa de implantación, obteniendo un valor de $p < 0.0001$ en ambos casos. Se midieron los niveles de fracción beta de hormona coriónica gonadotrófica (b-hCG) en suero materno en los días 10 y 12 posterior a la transferencia embrionaria, encontrando valores significativamente mayores en el grupo A, con $p = 0.001$ y $p < 0.001$, respectivamente. La tasa de embarazo entre el grupo A (110/

225 = 48.9%) y grupo B (12/59 = 20.3%) resultó ser altamente significativa ($p < 0.0001$).

DISCUSIÓN

Dentro de la fertilización *in vitro* convencional, los gametos humanos son coincubados por 16-18 horas para dar el tiempo suficiente para obtener una tasa de fertilización óptima. Aunque existe un estudio que describe mejores resultados en cuanto a tasa de embarazo a favor de la coincubación larga,¹¹ el proceso de fertilización generalmente es completado dentro de las primeras dos horas y la exposición prolongada de ovocitos a espermatozoides no es necesaria.¹³ De hecho, esta corta exposición es suficiente para lograr tasas de implantación y embarazo aún mejores que la exposición larga (*Cuadro II*). Estos resultados concuerdan con observaciones realizadas por otros autores.^{10,13} Los efectos benéficos de la coincubación corta pueden ser debidos a la ausencia del exceso de espermatozoides muertos, lo que disminuye la exposición del cigoto a grandes concentraciones de radicales libres de oxígeno en el medio de cultivo. Estos radicales libres producen endurecimiento de la zona pelúcida, lo cual reduce la expulsión del embrión a través de ésta y, a su vez, ocasiona disminución en su viabilidad y en su implantación.

CONCLUSIONES

El presente estudio demuestra que la exposición corta de gametos humanos incrementa significativamente las tasas de implantación y embarazo en

comparación con la exposición larga. Aunque no existe diferencia en la tasa de fertilización, la calidad embrionaria en la coincubación corta es significativamente mejor.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mariani P, Schuartz D. Sterility and fecundability estimation. *J Theor Biol* 1983; 105: 211-223.
2. Menken J, Trussell J, Larsen U. Age and infertility. *Science* 1986; 223: 1389-1394.
3. Laurent SL, Thompson SJ, Addy C, Garrison CZ, More EE. An epidemiologic study of smoking and primary infertility in women. *Fertil Steril* 1992; 57: 565-572.
4. Bryant HE, Love EJ. Video display terminal use and spontaneous abortion risk. *Int J Epidemiol* 1989; 18: 132-138.
5. Thomas JA, Ballantyne B. Occupational reproductive risk: Sources, surveillance and testing. *J Occup Med* 1990; 32: 547-554.
6. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
7. Stephen EH, Chandra A. Use of infertility services in the United States. 1995. *Fam Plann Perspect* 2000; 32: 132.
8. Mukhopadhyaya N, Arulkumaran S. Reproductive outcomes after *in-vitro* fertilization. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007; 19 (2): 113-119.
9. Carranza-Lira S. Fundamentos de Endocrinología Ginecológica y Reproductiva. MDM 2003
10. Gianaroli L, Fiorentino A, Magli MC. Prolonged sperm-ooocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. *Hum Reprod* 1996; 11: 2507-2511.
11. Boone WR, Johnson JE. Extending the coincubation time of gametes improves in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18 (1): 18-20.
12. Dirnfeld M, Shiloh H, Bider D, Harari E, Koifman M, Lahav-Baratz S, Abramovici H. A prospective randomized controlled study of the effect of short coincubation of gametes during insemination on zona pellucida thickness. *Gynecol Endocrinol* 2003; 17 (5): 397-403.
13. Kattera S, Chen C. Short coincubation of gametes in in vitro fertilization improves implantation and pregnancy rates: A prospective, randomized, controlled study. *Fertil Steril* 2003; 80 (4): 1017-1021.