



Resultados de un programa de FIV con transferencia de embriones en un día 3 vs día 5₁

Jorge Castillo Baso,* Pablo Díaz Spíndola,** Roberto Santos Haliscak,*** Pedro Galache Vega,*** Samuel Hernández Ayup,*** Genaro García Villafaña****

RESUMEN

Antecedentes: existen controversias en cuanto a los beneficios de la transferencia en día 5 cuando se dispone de embriones de buena calidad en día 3.

Objetivo: comparar los resultados reproductivos de los embriones transferidos en día 3 vs en día 5 en pacientes menores de 35 años de edad.

Pacientes y método: estudio prospectivo, sin asignación al azar, efectuado en 242 ciclos consecutivos de embriones transferidos en fresco a pacientes menores de 35 años. A 132 pacientes se les realizaron transferencias en día 3 y a 110 en día 5. En el caso de las transferencias en día 3, todas las pacientes cumplieron los criterios de por lo menos ocho células en la mañana del día 3, y menos de 10% de fragmentación (clase I embrionaria).

Resultados: las características demográficas entre los grupos (día 3 vs día 5) no fueron estadísticamente significativas al evaluar: edad (30.4 vs 29.1), tiempo de infertilidad (4.94 vs 4.61 años); FSH en día 3: (6.78 vs 7.12 UI/L), dosis total de FSHr (2422.5 vs 2220.0 UI). No se encontraron diferencias significativas en los resultados del tratamiento de reproducción en las pacientes a quienes se realizó la transferencia embrionaria en día 3 vs día 5 en cuanto a porcentaje de embarazo (47 vs 46%) y nacido vivo (32 vs 29%).

Conclusión: transferir en día 5 no muestra diferencias estadísticas en la tasa de embarazo y recién nacidos vivos que en las que se transfieren en día 3 en pacientes menores de 35 años de edad.

Palabras clave: transferencia embrionaria, estadio de clivaje; blastocisto, pronóstico reproductivo.

ABSTRACT

Background: Whether blastocyst-stage transfer offers any real benefit to infertile couples remains controversial.

Objective: To compare pregnancy rates of day 3 cleavage versus day 5 blastocyst fresh non donor embryo transfers in patients under 35 years old.

Material and methods: A prospective non-randomized study. A total of 242 consecutive treatment cycles with fresh non donor embryos in patients younger than 35 years old were reviewed. In 132 patients the transfer occurred on day 3 and in 110 patients on day 5. Day 3 transfers fulfilled embryo quality criteria at least 8 cells on the morning of day 3, less than 10% of anucleate fragments).

Results: Demographics and stimulation features between the two groups (day 3 vs day 5) were not significantly different when evaluated: Age (30.4 vs 29.1); time of infertility (4.94 vs 4.61 years) or type of infertility; total doses of FSHr (2422.5 vs 2220.0 IU). There were no significance difference between clinical pregnancy rate (47% vs 46%) and live birth rate (32% vs 29%) between day 3 group and in blastocyst day 5 embryo transfers.

Conclusion: In the group of patients under 35 years old, blastocyst stage do not offer better chance of achieving a live delivery than with cleavage-stage.

Key words: embryonary transference, estadio de clivaje; blastocite, reproductive prognostic.

1 14th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI) Paris, Francia 17-20 de Noviembre del 2011.

* Médico ginecoobstetra especialista en Biología de la Reproducción, Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, NL.

** Coordinador de docencia del Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Universidad de Baja California.

*** Médico especialista en Biología de la Reproducción y co-director del Instituto para el Estudio de la Concepción Humana.

**** Biólogo especialista en Embriología humana, Director del laboratorio de Embriología humana del Instituto para el Estudio de la Concepción Humana, Monterrey, NL.

Correspondencia: Dr. Jorge Castillo Baso. Correo electrónico: castillobaso@hotmail.com

Recibido: enero 2012. Aceptado: febrero 2012.

Este artículo debe citarse como: Castillo-Baso J, Díaz-Spíndola P, Santos-Haliscak R, Galache-Vega P, Hernández-Ayup S, García-Villafaña G. Resultados de un programa de FIV con transferencia de embriones en un día 3 vs día 5. Med Reprod Mex 2012;4(3):126-131.

El momento de la transferencia embrionaria es decisivo en el pronóstico de cualquier tratamiento de reproducción. Al respecto se han generado una serie de criterios técnicos. Uno de estos ha sido por mucho tiempo la definición del mejor día para la transferencia.

Quienes argumentan que la transferencia debe realizarse en un día 5 argumentan que ésta permite seleccionar embriones en un estadio de desarrollo tardío en donde se favorece la activación del genoma embrionario.¹ Así, pueden transferirse los embriones de una cohorte con un criterio más objetivo de selección natural. Esta posición es reforzada por las amplias limitaciones encontradas al utilizar criterios morfológicos para seleccionar embriones en estadios de división celular y el porcentaje elevado de embriones en estadio de división celular en día 3, en los que a pesar de tener apariencia morfológica normal hay alteraciones cromosómicas.²

En contraposición está el argumento que sustenta que debe realizarse la transferencia en día 3, parte de la premisa de que existen carencias en los requerimientos y necesidades nutricionales y bioquímicas de los embriones. Estas necesidades se incrementan en los estadios iniciales de desarrollo embrionario y han conducido a la creación de medios secuenciales de cultivo. A pesar de esto siguen existiendo pacientes en las que sus embriones no llegan a estadio de blastocito y que tienen información cromosómica normal. Estos embriones son desprovistos de la oportunidad de llegar a una transferencia o a un embarazo; y quizá con las condiciones *in vitro* no se cumplieron sus requerimientos energético-bioquímicos.³ Se sugiere que en las condiciones *in vitro* no se genera el ambiente ideal para todos los embriones y que, ciertamente, no son mejores que las condiciones intrauterinas.⁴ Estos argumentos han motivado en los centros disyuntivos en cuanto al camino correcto que debe tomarse en los casos en los que se tienen más de cuatro embriones en estadio de división embrionaria Grado I en día 3.⁵

Otro de los aspectos a considerar es que al someter a los embriones a más días de desarrollo embrionario se incrementa significativamente el costo de manejo de laboratorio de FIV, por la cantidad de medios y recursos destinados para el consumo.⁶

El objetivo de este estudio es determinar, en los casos en que se obtienen más de cuatro embriones en estadio de 8 células Grado I al tercer día de desarrollo si existen diferencias en los resultados reproductivos al llevar los mismos al estadio de blastocisto día 5 vs realizar la transferencia en estadio de división celular en día 3.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio prospectivo, sin asignación al azar, efectuado en 242 ciclos consecutivos de embriones transferidos en fresco a pacientes menores de 35 años. El estudio se efectuó entre enero de 2008 y septiembre del 2010. Se evaluaron las pacientes admitidas para tratamiento de reproducción de alta complejidad FIV-ICSI en el Instituto para el Estudio la Concepción Humana (IECH- Monterrey) y que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión: edad menor de 35 años, menos de tres intentos de reproducción asistida, FSH en día 3 <10 UI/mL, espermias obtenidos de eyaculados, FIV-ICSI y más de cuatro embriones grado 1 en día 3 (<10% de fragmentación con un mínimo de 8 blastómeras en día en la mañana del día 3 de desarrollo embrionario). Se excluyeron las pacientes de ciclos de donación, eyaculado no espermático y tratamientos con gametos o embriones vitrificados.

Las pacientes se incluyeron al estudio sólo una vez y luego de establecer los criterios en día 3 se realizó una asignación prospectiva no aleatorizada de los dos grupos. En el primero se transfirieron en el día 3 y en el segundo se dejaron evolucionar para transferir en día 5. Posteriormente se analizaron las principales variables de estudio: número de ovocitos en metafase II (MII); número de embriones fertilizados; número células en división celular; porcentaje de embarazo, número de sacos gestacionales, porcentaje de implantación y nacidos vivos.

La asignación en cada uno de los grupos se realizó según criterio personal del médico tratante. (Figura 1)

Estimulación ovárica controlada

Las pacientes que recibieron tratamientos de reproducción fueron objeto de diferentes protocolos de estimulación según las características clínicas del caso.

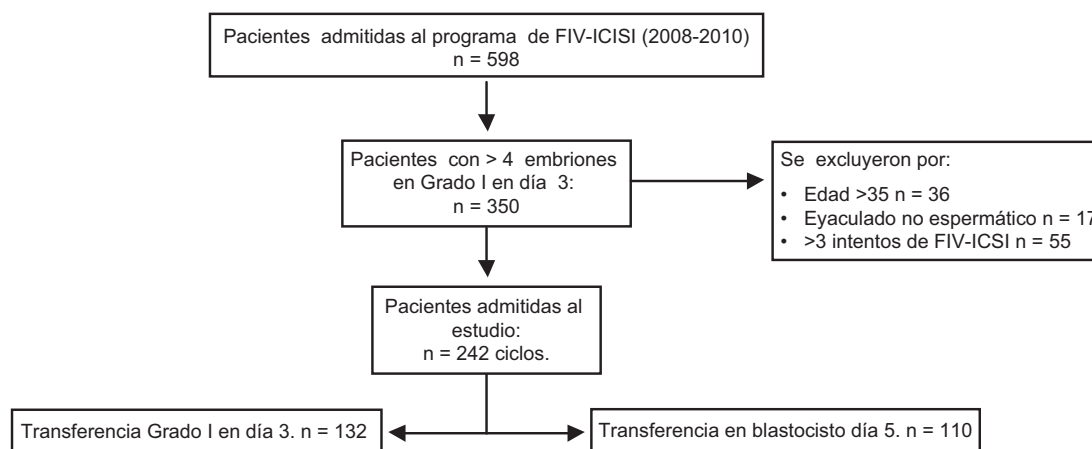


Figura 1. Asignación de los grupos.

Los esquemas utilizados fueron:

Agonista de la GnRH en fase lútea tardía: se administró acetato de leuprolide (Lucrin®kit, Abbott de México) a la dosis de 10 UI al día por vía subcutánea a partir del día 21 del ciclo previo hasta el inicio de la menstruación, posteriormente a partir del primer día de menstruación se administraron diariamente sólo 5 UI por vía subcutánea hasta la fecha en que se administró la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Choriomon®, Corne de México).

Se aplicaron las dosis de FSH-rec (Gonal-F®, Serono de México) a partir del segundo día del ciclo. Posteriormente se determinó el estradiol sérico y se hizo un ultrasonido en el día 7 del ciclo y, a partir de esa fecha, se individualizó la dosis administrada de gonadotropina recombinante y se agregaron, o no, menotropinas urinarias (Merional®, Corne de México) a la dosis de 75-150 UI por vía intramuscular al día, hasta alcanzar el criterio de aplicación de la hCG a dosis de 10,000 UI dosis única por vía intramuscular que se consideró al alcanzar dos o más folículos de 18 mm diámetro. La aspiración folicular transvaginal se efectuó con una guía ultrasonográfica y se realizó a las 34-36 h posteriores a la aplicación de la hCG.

Protocolo antagonista

Se aplicaron dosis de FSH recombinante (Gonal-F®, Serono de México) a partir del día 2 del ciclo y, poste-

riormente, de acuerdo con la evaluación ecográfica y el desarrollo folicular (más de dos folículos mayores de 14 mm) se aplicaron 0.25 mg de Cetrotide®, Serono de México. Se utilizaron los criterios de desarrollo folicular antes expuestos y se programó la aspiración folicular consecuente.

Cultivo embrionario y selección para la transferencia

Los embriones se cultivaron en medios Vitrolife Sweden AB, Kungsbacka, Sweden, (GII or GIII series). En la mañana del día 3 se transfirieron de medio de clivaje y, posteriormente, a medio de blastocisto. La fertilización se confirmó a las 19 horas posteriores a la inyección o inseminación y se confirmó con la existencia de dos pronúcleos (2 pn) y dos cuerpos polares distintos o fragmentados.

La calidad embrionaria se evaluó según el número de blastómeras, porcentaje de fragmentación, multinucleación de las blastómeras y compactación. Se consideraron embriones Grado I cuando tenían, por lo menos, ocho células en día 3 con menos de 10% de fragmentos, tamaño regular y ausencia de multinucleación.

Soporte de fase lútea

Todas las pacientes recibieron suplementación de fase lútea de acuerdo con el protocolo a base de óvulos de progesterona de 400 mg diarios por 14 días.

Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos de estudio se establecieron mediante análisis de varianza (ANOVA) y la significación estadística con la $p < 0.05$, y para la ejecución del mismo se utilizaron los programas Windows SPSS, software versión 14.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL) y Windows Excel.

RESULTADOS

Se analizaron 242 ciclos homólogos frescos de pacientes en protocolos de reproducción asistida de alta complejidad, a quienes se realizó estimulación ovárica controlada con protocolos de agonista y antagonista. En 132 pacientes la transferencia se realizó en día 3 y en 110 en estadio de blastocisto el día 5.

Al evaluar las características demográficas de la población no se encontraron diferencias significativas en el grupo de día 3 *versus* día 5 en relación con la edad de las pacientes (30.4 *vs* 29.1 años), tipo de infertilidad primaria o secundaria, tiempo de infertilidad 4.94 *vs* 4.61 años, perfil hormonal en día 3: FSH día 3 : 6.78 *vs* 7.12UI, protocolo de estimulación y dosis promedio de FSH recombinante y HMG. (Cuadro 1)

No se encontraron diferencias en los grupos evaluados en cuanto a grosor endometrial (9.95 *vs* 10.01 mm) y día de la aspiración folicular (12.69 y 12.9) en la que se realizó el procedimiento; sin embargo, al comparar ambos grupos en cuanto a las características de la estimulación se encontró que el grupo de transferencia en el día 3 tuvo menor cantidad de folículos con más de 15 mm en día 10 (9.55 *vs* 12.11), número de ovocitos aspirados (13.83 *vs* 17.63) y, consecuentemente, ovocitos en MII (11.08 *vs* 14.73).

Al evaluar los resultados reproductivos de la transferencia en día 3 *vs* blastocisto día 5, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a tasa de embarazo, tasa de implantación y de nacido vivo (Cuadro 2 y Figura 2)

DISCUSIÓN

Los resultados son discrepantes con los estudios reportados previamente en los que después de realizar ensayos clínicos prospectivos y evaluar si existen diferencias en

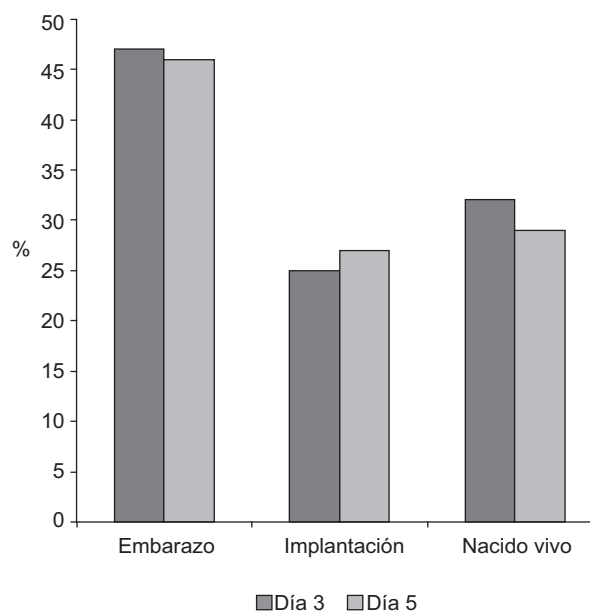


Figura 2. Resultados reproductivos de transferencia día 3 *vs* día 5.

el resultados reproductivo al transferir embriones grado I en día 3 *vs* día 5 se encontraron diferencias en las tasas de embarazo (27 *vs* 51%) y tasa de nacido vivo (25 *vs* 47%), respectivamente.⁷ Una de las explicaciones más probables a este hecho es la que está alrededor de los hallazgos reportados por Santiago Munne, quien al realizar la técnica de PGD (diagnóstico genético preimplantatorio) de evaluación embrionaria pudo determinar que 59% de los embriones en estadio embrionario de día 3 tienen alguna alteración cromosómica *vs* 35% en estadio de blastocisto.^{2,8}

Sin embargo, no somos los únicos que hemos reportado esos hallazgos porque aunque con el estadio de blastocisto se han generado altas tasas de implantación y de embarazo, al compararlo con estadio de división embrionaria grado I en día 3, diversos autores han encontrado resultados discrepantes al estratificarlos por edad. Si se asume que existe mayor predisposición a aneuploidías en la medida que se incrementan los grupos etarios, consecuentemente se ha visto que la transferencia en estadio de blastocisto incrementa la tasa de embarazo en pacientes mayores de 37 años de edad,

Cuadro 1. Características demográficas y de estimulación

	<i>D3 grupo n = 132</i>	<i>D5 grupo n = 110</i>	<i>Significación estadística</i>
Edad (años)	30.4	29.1	0.271
Tipo de infertilidad			0.538
% primaria	89/132 67%	69/110 63%	
% secundaria	43/132 32%	41/110 37%	
Tiempo de infertilidad (años)	4.94	4.61	0.508
FSH día 3 (IU/l)	6.78	7.12	0.486
LH día 3 (IU/l)	4.84	5.72	0.172
E2 día 3 (pg/ml)	50.23	58.65	0.435
Protocolo de estimulación			0.135
% Agonista	67%(90)	60% (66)	
% Antagonista	33%(42)	40%(44)	
Total rFSH IU administrada	2422.5	2220.0	0.185
Total hMG IU administrada	603.75	555.0	0.643

Cuadro 2. Resultados de tratamientos de reproducción

	<i>D3 grupo n = 132</i>	<i>D5 grupo n = 110</i>	<i>Significación estadística</i>
Folículos>15 D10	9.55	12.11	0.001
Estradiol D10 (pg/ml)	2553.41	3360.38	0.003
Grosor endometrial D10 (mm)	9.95	10.1	0.823
Día de aspiración	12.69	12.19	0.456
Ovocitos aspirados	13.83	17.63	0.001
Ovocitos en MII aspirados	11.08	14.73	0.001
Embriones fertilizados (medias)	6.78	9.32	0.001
División celular a las 48 h	6.50	9.05	0.0001
División celular a las 72 h	5.79	8.52	0.0001
Número de embriones transferidos	2.44	2.13	0.234
Embarazos	63/132 47%	50.6/110 46%	0.753
Sacos gestacionales	62/132 46%	44/110 40%	0.251
Embarazos múltiples	16/132 12%	11/110 10%	0.067
Tasa de implantación	24.87	26.68	0.674
Nacimiento %	43/132 32%	18/62 29%	0.109

pero no en grupos etarios menores.⁹ Se han reportado tasas de embarazo de día 3 vs día 5 (45 vs 32%) y de implantación (31 vs 29%). De hecho, un metanálisis al respecto que incluye 11 estudios y 555 pacientes, no reporta resultados contundentes en relación con este tema.⁶

Otro aspecto importante es el porcentaje de implantación y tasa de embarazo múltiple. En este sentido, a pesar de no encontrar diferencias estadísticas, se ve una tendencia a mayor porcentaje en día 3 vs día 5 en

nuestra población. Por esto consideramos que es muy probable que el número de embriones transferidos influya en esta tendencia porque se transfirió mayor número de embriones en día 3.

Es importante enunciar el hecho de las múltiples limitaciones existentes alrededor de la única utilización de criterios morfológicos para escoger los embriones apropiados. Por fortuna, se están desarrollando nuevas alternativas de evaluación no invasora de los embriones,

como el Comparative Chromosome Screening (CCS)^{10,11} y la evaluación de desarrollo embrionario mediante el EmbryoScope,^{®12,13} que en el futuro permitirán escoger los embriones adecuados para el día de la transferencia y hacer cambios en el número de embriones transferidos sin que haya repercusión en las respectivas tasas de embarazo y de nacidos vivos.

CONCLUSIÓN

Todo parece indicar que invertir en llevar los embriones en estadio de división embrionaria a estadio de blastocisto no debe ser siempre una regla. Debe considerarse la edad de las pacientes como un factor preponderante en la toma de la decisión.

REFERENCIAS

1. Magli MC, Jones GM, Gras L, et al. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod* 2000;15:1781-1786.
2. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, et al. 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.
3. Tsirigotis M. Blastocyst stage transfer: pitfalls and benefits. Too soon to abandon current practice? *Hum Reprod* 1998;13:3285-3289.
4. Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, Wood C, et al. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998;70:1022-1029.
5. Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, et al. The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer. *Fertil Steril* 2000;73:558-564.
6. Blake DA, Proctor M, Johnson NP. The merits of blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a Cochrane review. *Hum Reprod* 2004;19:795-807.
7. Papanikolaou E, D'haeseleer E, Verheyen G, et al. Live birth rate is significantly higher after blastocyst transfer than after cleavage-stage embryo transfer when at least four embryos are available on day 3 of embryo culture. A randomized prospective study. *Human Reproduction* 2005;20:3198-3203.
8. Munne S, Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* 1988;4:842-855.
9. Mellon J, Fluker MR, Yuzpe AA, Kelk DA, et al. Blastocyst transfers improve pregnancy rates for select older patients, but not for those under 37 years old. *Fertil Steril* 2004;82, Suppl 2;192.
10. Munne S, Fragouli E, Colls P, et al. Comprehensive chromosome screening indicates that an appropriately designed 12-chromosome FISH test would detect 91% of aneuploid blastocysts. *RBMOonline* 2009;20:92-97.
11. Jansen RP, Bowman MC, De Boer KA, et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? Experience with blastocyst biopsy and testing for aneuploidy. *Hum Reprod* 2008;23:1476-1478.
12. Tejera A, Herrero J, De Los Santos MJ, Garrido N, et al. Oxygen consumption is a quality marker for human oocyte competence conditioned by ovarian stimulation regimens. *Fert Steril* 2011;96(3):618-623.
13. Cruz M, Gadea B, Garrido N, Kamilla S, et al. Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:569-573.