

CRIOPRESERVACIÓN DE EMBRIONES AL TERCER DÍA DE DESARROLLO *IN VITRO*

RESUMEN

Introducción: Los procedimientos de congelación se hacen indispensables cuando se realiza una hiperestimulación y sobran embriones viables; los costos disminuyen y la tasa de embarazo por aspiración aumenta con la congelación-descongelación de embriones.

Objetivos: Presentar nuestra experiencia con congelación-descongelación de embriones.

Lugar: Servicio Médico y Laboratorio de Reproducción Asistida, Clínica Ricardo Palma.

Diseño: Estudio clínico retrospectivo. **Material biológico:** Embriones obtenidos por fertilización asistida. **Intervenciones:** Hiperestimulación ovárica controlada en la fase lútea corta, captura ovular a las 36 horas postadministración de hCG, fertilización *in vitro* clásica o ICSI transporte como método de fecundación, procesos clásicos de criopreservación y descongelación de embriones. **Principales medidas de resultados:** Promedio de supervivencia embrionaria en el proceso congelación-descongelación.

Resultados: Iniciamos el estudio en octubre de 2003. El número total de ciclos en que se congeló embriones en este periodo fue 154; de estos, solo se descongeló 58. La tasa de embarazo por transferencia fue 30,2%, obteniéndose 16 embarazos, de ellos 12 embarazos a término y 4 abortos. **Conclusiones:** Los resultados con criopreservación de embriones en nuestro servicio de reproducción asistida son comparables con los de otros centros de fertilidad.

PALABRAS CLAVE: Embriones criopreservados, blástomas.

Luis Guzmán*, Ricardo Pella*,
Begoña Arguello*,
Jaime Seminario**,
José Quispe**,
Cristina Zúñiga**,
Ricardo Pommer**

* Laboratorio de Reproducción Asistida,
Clínica Ricardo Palma.

** Miembros del Servicio Médico de Reproducción Asistida, Clínica Ricardo Palma.

Trabajo recibido para publicación el 6 de junio de 2008.

Aceptado para publicación el 10 de junio de 2008.

Rev Per Ginecol Obstet. 2008;54:117-120.

Third day *in vitro*-developed embryo cryopreservation.

ABSTRACT

Introduction: Freezing-unfreezing procedures are essential when hyperstimulation is followed by embryo overproduction; they lower costs and increase pregnancy rates per aspiration. **Objectives:** To present our experience with embryo freezing-unfreezing. **Setting:** Assisted Reproduction Medical Service and Laboratory, Clínica Ricardo Palma. **Design:** Clinical retrospective study. **Biologic material:** Embryos obtained by assisted fertilization. **Interventions:** Controlled ovarian hyperstimulation with short luteal phase, ova capture at 36 hours post hCG administration, classical *in vitro* fertilization or ICSI-transport, classical processes of embryo cryopreservation and unfreezing. **Main outcome measures:** Embryo survival in freezing-unfreezing process. **Results:** We started our study in October 2003. Number of cycles with frozen embryos during this period was 154; from these we unfroze only 58.

Pregnancy rate per transference was 30,2%, obtaining 16 pregnancies, including 12 term pregnancies and 4 abortions. **Conclusions:** Results with embryo cryopreservation at our assisted reproduction service are consistent with those of other fertility centers.

Key words: Embryos cryopreservation, blastomers.

INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones humanos es una tecnología bien establecida en las técnicas de reproducción asistida (TRA) humana y fue descrita por primera vez en 1972, pero no fue hasta 1983 que Trounson⁽¹⁾ consigue el primer embarazo a partir de un embrión congelado. Los adelantos conseguidos a partir de entonces han sido

impresionantes en las TRA y existe un interés en mejorar los procedimientos de congelación en embriones.

La tasa de embarazo al congelar embriones en estadio de blastocisto es superior al congelamiento en estadio de pronúcleo. En contrapartida, existe una mayor cantidad de embriones en estadio de pronúcleo a congelar, como una compensación a la falta de desarrollo durante los 5 a 6 días de crecimiento *in vitro*. Sin embargo, en la congelación de embriones en estado de clivaje algunas células podrán sobrevivir al descongelamiento, las que son capaces de desarrollarse hasta el nacimiento



de bebés nacidos vivos⁽²⁾. Por otro lado, el desarrollo técnico y mejores medios de cultivo han permitido que los procedimientos de reproducción asistida hayan mejorado y por tanto se tenga en la actualidad un mayor uso de la criopreservación embrionaria. Así, se tiene que entre 70 y 80% de los actuales ciclos de TRA están asociados con la congelación de embriones⁽³⁾.

El uso de las diferentes técnicas de congelación de gametos y embriones ha aportado diferentes ventajas a las diferentes TRA; así, disminuye el riesgo de embarazos múltiples, aumenta la tasa de embarazo por ciclo⁽⁴⁾, disminuye la severidad de los síndromes de hiperestimulación ovárica -al retrasar la transferencia embrionaria^(5,6)-, evita la destrucción de embriones potencialmente viables para ciclos posteriores, permite la transferencia en ciclos con mala respuesta endometrial (sangrado, pólipos) y disminuye los costos.

Se inició los procedimientos de fertilidad de alta complejidad en la Clínica Ricardo Palma, en 1996. El presente trabajo recopila la información de nuestra experiencia en el Laboratorio de Reproducción Asistida de la Clínica Ricardo Palma en ciclos de fertilización *in vitro* (FIV) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI)-transporte desarrollados entre los años 2003 y 2007, con embriones humanos criopreservados al tercer día de desarrollo *in vitro*.

MÉTODOS

El presente es un estudio clínico retrospectivo. Se trabajó con las historias clínicas y fichas del Laboratorio de Reproducción Asistida, de octubre de 2003 a setiembre de 2007, que incluyó 58 ciclos de congelación-descongelación de embriones. Todos los embriones fueron

gradados de acuerdo a la calificación morfológica clásica y de acuerdo al estadio de las blastómeras al momento de la descongelación⁽⁷⁾.

En el protocolo de estimulación ovárica y captura ovular, la hiperestimulación ovárica controlada (HOC) se realizó en fase lútea corta, iniciando el día 21 del ciclo la administración de 1,0 mg subcutáneo (SC) de acetato de leuprolida. Con el sangrado menstrual se verificaba la disminución (*down regulation*) del estradiol sérico a menos de 40 pg/dL y se reducía el acetato de leuprolida a 0,5 mg diario. Se inició la estimulación con gonadotropinas humanas menopáusicas y hormona foliculoestimulante recombinante. Se monitorizó la HOC por medio de determinación sérica seriada de estradiol y seguimiento con ultrasonido transvaginal del crecimiento folicular y endometrial. Se administró gonadotropina coriónica humana (hCG) 10 000 UI IM cuando por lo menos existían tres folículos con diámetro de 18 mm, con captura ovular a las 36 horas postadministración de hCG. La captura ovular se realizó con guía ultrasonográfica, bajo anestesia. Se realizó fertilización *in vitro* clásica o ICSI-transporte como método de fecundación, de acuerdo con el diagnóstico y los parámetros de laboratorio previamente establecidos.

Con relación al protocolo de criopreservación, se lavó los embriones a congelar, a temperatura ambiente, en una solución madre de solución salina de fosfato-buffer (PBS) y suero sintético sustituto (HSA), al 20%. Luego, se los lavó en una solución propanediol (PROH) 1,5 M 1,2, por 10 minutos. Se los transfirió entonces a una solución de 1,5 M PROH + 0,1 M sacarosa y se los colocó en las pajillas de 250 μ L, para el proceso de congelación (*Cryogenic* 8000). Se inició el proceso con 20 °C y

se realizó primera rampa a -2,0 °C/minutos hasta -7,0 °C. Se realizó entonces siembra (*seeding*) manual y se bajó a -0,3 °C/ minutos, hasta -35 °C, y se finalizó a -15 °C/ minutos, hasta -100 °C.

El proceso de descongelación se inició con colocación de la pajilla a temperatura ambiente por 30 segundos; luego, se sumergió la pajilla en agua a 30 °C, por 40 a 50 segundos, se sacó los embriones y se los colocó en soluciones secuenciales: 1,0 M PROH + 0,2 M sacarosa; 0,5 M PROH + 0,2 M sacarosa; 0,2 M sacarosa y PBS con HSA al 20%. Luego, eran colocados en medio de cultivo gasificado y de acuerdo a sus características morfológicas embrionarias se decidía la transferencia inmediata.

En el protocolo de preparación endometrial, en todas las pacientes se inició la administración de acetato de leuprolida en fase lútea corta (día 21 del ciclo), 1 875 mg. Con el periodo menstrual se iniciaba la terapia estrogénica, con estradiol oral micronizado 2,0 mg por día, inicialmente, con aumento sucesivo, de acuerdo a la respuesta endometrial.

Los embriones eran evaluados en su periodo posdescongelación, de acuerdo con los parámetros clásicos de morfología embrionaria⁽⁷⁾ y de acuerdo a si todas las blastómeras estaban intactas. Después de la transferencia, la paciente continuaba con estradiol micronizado oral y progesterona micronizada vaginal de apoyo, a una dosis de 800 mg diariamente.

El día 12 posttransferencia se realizaba la primera determinación de β hCG y, a la semana, el primer ultrasonido vaginal, para confirmación de saco gestacional en el día 20 posttransferencia. Se definió embarazo clínico cuando había la presencia de saco gestacional.



Para el análisis estadístico, se utilizó las pruebas t-student y chi cuadrado, de manera de comparar los datos. Se definió significancia estadística cuando la $p < 0,05$. Se usó el programa SPSS versión 13,0 para el análisis de todos los datos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para los 4 años de trabajo en nuestro laboratorio nos indica que el promedio de supervivencia embrionaria en el proceso congelación-descongelación fue de $67,6\% \pm 29,7$. El número total de ciclos de congelación-descongelación fue 58. El promedio de embriones descongelados transferidos fue $2,8 \pm 1,6$ embriones. La tasa de embarazo por procedimiento de descongelación, incluyendo los 58 ciclos, fue $27,6\%$ (16/58), de los cuales nacieron 12 y se informó de 4 abortos. La tasa de embarazo por transferencia fue $30,2\%$ (16/53). Ver Tabla 1. No existieron embarazos múltiples en alguno de los ciclos de transferencia de embriones congelados. La tasa de nacidos vivos fue $22,6\%$ (12/53).

La tasa de embarazo, de acuerdo a la calidad morfológica embrionaria, fue mayor en el caso de embriones de buena calidad y en aquellos casos donde existió por lo menos un embrión con todas las blastómeras intactas al momento de la transferencia embrionaria; luego del proceso de congelación-descongelación, la tasa de embarazo en estos casos fue significativamente mayor que en los casos en los que no existía algún embrión con todas las blastómeras intactas.

Los protocolos de inducción para las pacientes no mostraron algún caso de hiperestimulación ovárica. Por tanto,

todos los embriones congelados corresponden a embriones que fueron congelados como parte del protocolo integral de trabajo de nuestro centro (embriones de menor calidad embrionaria que los transferidos en fresco a la paciente). Además, no se observó diferencias con relación al grosor endometrial ni al nivel sérico de estradiol, el día de administración de progesterona (P4), previo a la transferencia.

Tabla 1. Datos de nuestros casos.

	Número de casos
Total de procedimientos de congelación - descongelación	58
Total de embriones congelados	115
Número de transferencias	53
Promedio de embriones congelados	$4,3 \pm 2,6$
Promedio de embriones transferidos	$2,8 \pm 1,6$
Tasa de sobrevivencia	$67,6\% \pm 29,7$
Tasa de embarazo por descongelación	$27,6\%$ (16/58)
Tasa de embarazo por transferencia	$30,2\%$ (16/53)

DISCUSIÓN

El principio básico de criopreservación está sustentado en disminuir los efectos deletéreos que tiene este procedimiento *per se* sobre el embrión y la utilización de sustancias capaces de estabilizar al embrión al momento de la congelación. Es por ello que la criopreservación de embriones es parte integral de mejorar el éxito del tratamiento de infertilidad en las parejas. Las clínicas que emplean estas tecnologías, por tanto, mejoran sus tasas de embarazo utilizando procedimientos amigables para el embrión, las cuales minimizan el daño e incrementan su supervivencia. De esta manera, en nuestro centro utilizamos criopreservación en 70% de los ciclos frescos, comparable a lo informado en la literatura⁽²⁾.

La combinación de transferencia en fresco y transferencia en descongelados ha aumentado la tasa de embarazo por captura ovular. Se discute en la actualidad cuál es el mejor momento para que el embrión tolere el proceso de congelación-descongelación. Así se tiene que un investigador⁽⁸⁾ propone que en el estado pronuclear el embrión se encuentra en el estadio de fertilización más simple y por tanto es más favorable su conge-

Tabla 2. Tabla comparativa de tasas obtenidas con otros centros referenciales.

	Clínica Ricardo Palma	IFER (Argentina)	RED (Total de la Región) Años 2003-2004
Total de procedimientos de congelación — descongelación	58	62	4185
Tasa de embarazo clínico por descongelación	$27,6\%$	$32,2\%$	$18,68\%$ *
Tasa de embarazo por transferencia	$30,2\%$	$29,03\%$	$16,27\%$ *

* Muestra diferencia significativa $p < 0,05$.



ción. Sin embargo, el embrión al tercer día de desarrollo ya se encuentra en un momento de mayor complejidad. Pero, estos estadios de mayor desarrollo no muestran una disminución significativa en la tasa de supervivencia embrionaria y tasa de embarazo, respecto a los publicados para otros estadios de desarrollo embrionario⁽⁸⁾. Para nuestros resultados, la tasa de embarazo por transferencia embrionaria fue 30,2%, lo cual demuestra que al tercer día de desarrollo embrionario *in vitro* humano se obtiene tasas que no muestran diferencias significativas respecto a otros centros. Así, tenemos que el Centro de Ginecología y Fertilidad (IFER-Argentina) tiene una tasa de embarazo clínico de 32,2% (Tabla 2). Al comparar nuestros resultados con el promedio de la región, la tasa de embarazo promedio por transferencia embrionaria publicada por el registro de la Red Latinoamericana de Reproducción Asistida (RED), para el periodo 2003-2004, es 18,68% y una tasa de nacidos vivos de 16,27%, lo cual muestra una diferencia respecto a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio (ver Tabla 1). La tasa de aborto con embriones descongelados fue 25%, comparada con 25,8% de la RED. Estos resultados nos demuestran que la congelación de embriones congelados en estadios de clivaje es un procedimiento de laboratorio bastante bien establecido

y con resultados comparables entre laboratorios.

Con la congelación de embriones multicelulares, las blastómeras pueden sobrevivir totalmente, parcialmente, o no hacerlo. En inicios de la década de los ochenta, la literatura establecía que el punto crítico de pérdida de blastómeras en embriones sometidos a descongelación era 50%⁽⁹⁾. Estos estudios no encontraron disminución en la tasa de supervivencia ni de embarazo en embriones con blastómeras degeneradas. Existen publicaciones que atribuyen diferencias significativas entre la tasa de embarazo en embriones con blastómeras intactas en comparación con aquellos con blastómeras degeneradas⁽¹⁰⁾. Para nuestra experiencia, la tasa de embarazo en el grupo con al menos un embrión con todas las blastómeras intactas fue tres veces mayor que en el otro grupo (31,5% vs. 11,2%), apoyando la hipótesis que el mantener todas las blastómeras intactas representaba mejor pronóstico. Es por ello que el futuro de la criopreservación estará basado entonces en la aplicación de microcirugía para remoción de fragmentos y blastómeras dañadas y la utilización de eclosión asistida, ya sea mecánica o química.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*. 1983;305:707-9.
2. Tucker M, Wright G, Morton P, Sweitzer C, Brockman W, Toledo A, Shapiro D, Mitchell-Leef D, Kort H. Cryopreservation of cleavage stage embryos on day-2 or day-3 of development: Impact on outcome. *Fertil Steril*. 1997;68(1S):236S.
3. Assisted reproductive technology in the United States and Canada. 1992 results generated from The American Fertility Society/Society for Assisted Reproductive Technology. *Fertil Steril*. 1995;64:13-21.
4. Damario M, Hammit D, Session D, Dumesic D. Embryo cryopreservation at the pronuclear stage and efficient embryo use optimizes the chance for a liveborn infant from a single oocyte retrieval. *Fertil Steril*. 2000;73(4):767-73.
5. Frederick J, Ord T, Kettel M, Stone S, Balmaceda J, Asch R. Successful pregnancy outcome after cryopreservation of all fresh embryos with subsequent transfer into an unstimulated cycle. *Fertil Steril*. 1995;64(5):987-90.
6. Song I, Song J, Han M, Kim J. Subsequent thawed embryo transfer following cryopreservation of all fresh embryos in women at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome may reduce the severity of the syndrome and improve the chance of pregnancy. *Fertil Steril*. 1998;70(1S):230.
7. Veeck L, MLT, hDSc. The morphological assessment of human oocytes and early concepts. *Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton (FL): CRC Press, 1990; 353-69.
8. Effio E, Bermudez A, Gutierrez Najar A, Orbea M. Pregnancy rate in cryopreserved embryos based on the classical morphologic scoring and the integrity of blastomeres at thawing. *Ginecol Obstet Mex*, 2001;69:431-8.
9. Testart J, Lassalle B, Forman R, Gazengel A, Belaisch-Allart J, Hazout A, et al. Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an *in vitro* fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril*. 1987;48:107-12.
10. Van den Abbeel E, Camus M, Van Waesberghe L, Devroey P, Van Steirteghem AC. Viability of partially damaged human embryos after cryopreservation. *Hum Reprod*. 1997;12:2006-10.