

## VALORACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA Y LA IMPLANTACIÓN DE BLASTOCISTOS CONGELADOS EN FUNCIÓN DE SU MORFOLOGÍA EMBRIONARIA EN DÍA 3

Laura Sarabia,\* M. José Torelló, Anna Veiga, Pere N. Barri

Servicio de Medicina de la Reproducción. Institut Universitari Dexeus.

Pg. Bonanova, 67. 08017 Barcelona. Tel. 932 274 700. Fax 932 057 966 Correo electrónico: lausar@telefonica.net.

---

### Resumen

**Objetivo:** Valorar la supervivencia y la implantación de embriones congelados en estadio de blastocisto en función de la morfología que tenían en estadio temprano (día 3). **Métodos:** Se han analizado setenta blastocistos descongelados que se agruparon en función de su morfología en día 3. Grupo I: embriones con *score*  $\leq 6$ ; grupo II: embriones que compactaban; grupo III: embriones con *score*  $> 6$ . **Resultados:** Las tasas de supervivencia al 100 % fueron: en el grupo I un 38 % (14/37), en el II un 68 % (17/25) y en el III un 75 % (6/8). La diferencia fue estadísticamente significativa ( $P = 0,03$ ) entre los tres grupos. Las tasas de implantación fueron: en el grupo I un 0 % (0/11), en el II un 15 % (3/13) y en el III un 33 % (1/3), la diferencia entre grupos no fue estadísticamente significativa. **Conclusión:** Embriones con mala morfología embrionaria en estadios tempranos de su desarrollo dan lugar a blastocistos que tienen una baja supervivencia al proceso de la congelación y descongelación.

**Palabras clave** Criopreservación, blastocistos, supervivencia, implantación.

### Abstract

**Objective:** Evaluate the survival and implantation of freeze embryos, in blastocyst stage, depending on its morphology in day 3. **Materials and Methods:** 70 blastocysts have been analyzed and grouped in order to its morphology in day 3. Group i: embryos with score  $\leq 6$ ; group ii: embryos compacting; group iii: embryos with score  $> 6$ . **Results:** The rates of 100% survival were: in group i 38% (14/37), in group ii 68% (17/25) and in group iii 75% (6/8). The rate of 100% survival was statistically different ( $P = 0,03$ ) among the three groups. The implantation rates were: in group i 0% (0/11), in group ii 15% (3/13) and in group iii 33% (1/3), but there were not statistically differences. **Conclusions:** Embryos with a poor morphology in early stages of their development, give rise to blastocysts with low survival of freezing and thawing process.

**Key words** Cryopreservation, blastocysts, survival, implantation.

---

## INTRODUCCIÓN

La criopreservación de embriones es un procedimiento indispensable en la rutina de un laboratorio de FIV, ya que nos permite conservar los embriones no transferidos en un ciclo en fresco para ser utilizados en posteriores transferencias. De esta manera se consigue un máximo aprovechamiento de la estimulación ovárica y se limita el número de embriones a transferir, disminuyendo el riesgo de embarazos múltiples.

Desde el primer embarazo a partir de la transferencia de un blastocisto descongelado (Cohen *et al.*, 1985), y debido al desarrollo de los medios de cultivo secuenciales, se ha producido un aumento en la

práctica de la criopreservación de embriones en este estadio.

El objetivo de este trabajo es valorar la supervivencia y la implantación de embriones congelados en estadio de blastocisto en función de su morfología en día 3.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron retrospectivamente setenta embriones que fueron congelados y descongelados en estadio de blastocisto, y que provenían de cuarenta y ocho pacientes de FIV. El período de tiempo en el que se

congelaron dichos embriones está comprendido entre enero de 2002 y diciembre de 2003.

Los blastocistos analizados en este estudio provienen de los embriones que no fueron congelados en estadio de células sino que se dejaron en cultivo largo por distintos motivos: *a)* pacientes que tenían un número elevado de embriones y en las que se decidió congelar en estadio de blastocisto para así llevar a cabo una mayor selección embrionaria y *b)* embriones que en día 3, en estadio de células, no eran aptos para congelar por dudosa calidad embrionaria o por encontrarse compactando en el momento de la congelación.

Los medios utilizados para el cultivo secuencial de estos embriones fueron G1 y G2 (Vitrolife Serie II/III, Suecia) suplementados con albúmina sérica humana (HSA-solution, Vitrolife, Suecia). Los embriones se cultivaron individualmente en microgotas cubiertas con aceite (Ovoil, Vitrolife, Suecia) y bajo unas condiciones de 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % de humedad y a una temperatura de 37° C.

En día 3 los embriones fueron observados bajo el microscopio invertido y en función a sus características morfológicas fueron puntuados. Se valoró el número de células, el tamaño y la forma de los blastómeros y la fragmentación embrionaria, tal y como se detalla en la tabla 1. Los embriones que estaban compactando en día 3 no fueron valorados según este *score* y se incluyeron en una categoría denominada *compactando*.

Los embriones que durante los días 5, 6 y 7 de cultivo llegaron a blastocisto y presentaban una MCI y un trofooctodermo organizados fueron congelados.

Para la congelación y descongelación se utilizaron medios Vitrolife Serie II/III. Tras la descongelación, los blastocistos se colocaron en una placa de cultivo con G2 y se hizo una primera valoración de la supervivencia. Antes de la criotransferencia, tras veinticuatro horas de cultivo, se valoró su evolución.

Por otra parte, se analizaron retrospectivamente noventa y dos embriones procedentes de sesenta y cinco pacientes de FIV que fueron congelados y descongelados en día 3. Dichos embriones presentaban una compactación precoz el tercer día de cultivo y por este motivo se decide en este estudio analizar su supervivencia después del proceso de la congelación.

Los medios de cultivo utilizados y las condiciones del laboratorio son las referidas anteriormente, ya que la congelación de esta serie de embriones se realizó a lo largo del año 2003.

Los medios utilizados para la congelación y descongelación en estadio temprano fueron Frezze *kit-1* y Tthaw *kit-1* (Vitrolife Serie II/III), respectivamente. Los embriones congelados «compactando» también

**Tabla 1** Características morfológicas consideradas en la valoración de los embriones y su puntuación. El *score* final resulta de la suma de las distintas puntuaciones.

Células	Día 3	Puntuación
Número	≥6	6
	< 6	2
Tamaño y forma	Simétricas y regulares	1
	Levemente asimétricas o irregulares	0
	Asimétricas o irregulares	-1
% fragmentación	< 10 %	3
	≥10 %, < 20 %	2
	≥20 %, < 30 %	1
	≥30 %, < 50 %	0
	≥50 %	-1

**Score embrionario** = puntuación número de células + puntuación tamaño y forma + puntuación fragmentación.

fueron cultivados después de la descongelación durante veinticuatro horas para valorar su evolución.

La transferencia se realizó utilizando un catéter (*Wallace embryo replacement catheter*, Smiths) guiado por ecografía. Trece días después de la transferencia se realizó una prueba de embarazo mediante la medida de los niveles séricos de β-HCG. El embarazo clínico se confirmó mediante ecografía vaginal a las seis semanas de la transferencia y se definió por la presencia de saco gestacional y latido cardíaco.

Para comprobar las variables cualitativas se utilizó el test exacto de Fisher y el test  $\chi^2$ ; para las variables continuas se utilizó la prueba de *T* de Student. Se fijó el nivel de significación en  $\alpha = 0,05$ .

## RESULTADOS

### *Embriones congelados en estadio de blastocisto*

Los embriones descongelados en estadio de blastocisto ( $n = 70$ ) fueron clasificados en tres grupos en función de su morfología en día 3: grupo I ( $n = 37$ ), embriones con un *score* ≤ 6; grupo II ( $n = 25$ ), embriones que compactaban y grupo III ( $n = 8$ ), embriones con un *score* > 6.

### *Supervivencia posdescongelación*

Tras la descongelación se evaluó la supervivencia de los blastocistos. Se consideró: supervivencia del 100 % cuando todas las células estaban intactas, supervivencia parcial cuando presentaban células lisadas, y lisados cuando presentaban todas las células lisadas. Como se puede ver en la tabla 2, la tasa de superviven-

**Tabla 2** Tasa de supervivencia según la calidad embrionaria en día 3.

	T. sup. 100 %	T. sup. parcial	Lisados
Grupo I	38 % (14/37)	24 % (9/37)	38 % (14/37)
Grupo II	68 % (17/25)	28 % (7/25)	4 % (1/25)
Grupo III	75 % (6/8)	13 % (1/8)	13 % (1/8)
Total	53 % (37/70)	24 % (17/70)	23 % (16/70)

**Tabla 3** Tasa de supervivencia (tras veinticuatro horas de cultivo) y de implantación según el estadio en el que se congeló.

Estadio de congelación	T. sup. tras 24 h	T. de implantación
Blastocisto (grupo II)	69 % (15/25)	15 % (2/13)
Emb. día 3 compactando	79 % (73/92)	28 % (7/25)

cia fue significativamente diferente ( $P < 0,05$ ) entre los tres grupos, siendo superior en el grupo III.

### ***Evolución de los blastocistos tras veinticuatro horas de cultivo***

Tras veinticuatro horas de cultivo se valoraron los embriones para decidir cuales se transferían.

De los embriones con 100 % de supervivencia, degeneraron cinco del grupo I, cuatro del grupo II y tres del grupo III. La evolución de los blastocistos con una supervivencia parcial fue la siguiente: en el grupo I degeneraron siete, en el grupo II degeneraron cinco y en el III ninguno.

Los embriones que no degeneraron fueron transferidos, siendo treinta el total de embriones evolutivos al 43 % (30/70).

### ***Tasa de implantación***

Se transfirieron treinta blastocistos en veinticuatro criotransferencias.

Los cinco embriones parcialmente lisados tras la descongelación, que no degeneraron tras veinticuatro horas de cultivo, fueron transferidos. No implantó ninguno independientemente del grupo al que pertenecían.

La tasa de implantación no fue significativamente diferente ( $P = 0,12$ ) entre los tres grupos siendo mayor en el grupo III (1/3 = 33 %) seguido del II (3/13 = 15 %) y por último el I (0/11 = 0 %).

Para determinar las tasas de implantación se excluyeron dos criotransferencias (tres blastocistos), debido a que fueron transferencias mixtas, es decir, de dos blastocistos que no tenían la misma procedencia y en las que se produjo la implantación de un sólo embrión. En una de estas criotransferencias se transfirieron dos blastocistos, uno pertenecía al grupo II y el otro proce-

día de un embrión que se congeló en estadio de células y que tras su descongelación se desarrolló hasta blastocisto. En la otra se transfirieron un blastocisto del grupo II y otro del grupo III. Las medias de edad de las pacientes de los distintos grupos en las que se llevó a cabo criotransferencia fueron: en el grupo I de  $37,45 \pm 5,35$ , en el grupo II  $37 \pm 4,09$ , en el grupo III  $37,99 \pm 9,45$ , no encontrándose diferencias entre los tres grupos.

### ***Embriones congelados en estadio precoz «compactando» (día 3)***

Se descongelaron noventa y dos embriones «compactando» en día 3. Setenta y tres de ellos fueron transferidos, por lo que la tasa de supervivencia tras veinticuatro horas de cultivo fue del 79 % (73/92).

Para valorar el potencial de implantación se analizaron dieciséis transferencias homogéneas para este tipo de embriones, en las que se transfirieron veinticinco embriones. La tasa de implantación fue del 28 % (7/25). La media de edad de las pacientes en las que se llevaron a cabo estas transferencias fue de  $37,14 \pm 5,78$  años.

Como se puede ver en la tabla 3, tanto la supervivencia como la implantación fueron mayores en los embriones que se congelaron en día 3 «compactando», si lo comparamos con los blastocistos del grupo II, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

## **DISCUSIÓN**

La tasa de supervivencia de blastocistos congelados es variable. La mejores tasas publicadas son del 76 % (Veeck *et al.*, 2004), 80 % (Menezo y Veiga, 1997), mientras que otros grupos citan tasas inferiores del 52 % (Cohen *et al.*, 1985) y 56 % (Pantos *et al.*, 2001). Los protocolos utilizados para la congelación de blastocistos son distintos entre centros, no hay consenso sobre cual es el mejor, y este podría ser uno de los motivos por los que se dan resultados tan diferentes. Todos los trabajos citados anteriormente han utilizado protocolos lentos de congelación.

Con la introducción de la metodología de la vitrificación, se han publicado resultados más prometedores, con unas tasas de supervivencia del 100 % (Stehlik *et al.*, 2004), 90 % (Son *et al.*, 2003) y 70,6 % (Vanderzwalmen *et al.*, 2002).

Según nuestros resultados, la tasa de supervivencia 100 % de los blastocistos es del 53 % (37/70), resultados comparables con los de Cohen y Pantos mencionados anteriormente. Si analizamos los resultados en función de la calidad embrionaria vemos que en los

blastocistos que provienen de embriones de buena calidad (*score* > 6) la tasa es del 75 % (6/8), mientras que cuando vienen de embriones de mala calidad (*score* ≤ 6) es de 38 % (14/37), lo que indica que estos embriones con mala morfología embrionaria en estadios tempranos dan lugar a blastocistos de peor calidad, y aunque esto no se detecte morfológicamente sí se evidencia con la mala supervivencia a la descongelación.

La tasa de implantación global de nuestro estudio, teniendo en cuenta todos los blastocistos transferidos en los tres grupos, es del 14 % (4/29). Nuestros resultados son inferiores a los obtenidos por Langley *et al.* (2001) con un 21,9 %, pero se acercan a los de Behr *et al.* (2002), que tiene una implantación del 16 %. Tal y como ocurre con la supervivencia, la tasa de implantación en el grupo III es superior 33 % (1/3), lo que indica la relación con la mejor calidad embrionaria.

Por otro lado, la capacidad de implantación de los blastocistos que tras la descongelación quedan parcialmente lisados es mínima; en nuestro estudio no implantó ninguno, con lo que podríamos cuestionarnos la transferencia de los mismos. Aún así, el número de blastocistos transferidos con estas características es muy bajo, por lo que para llegar a conclusiones más definitivas deberíamos ampliar la serie.

Analizando la tasa de implantación entre los distintos grupos de nuestro estudio, se observa que es mayor en el grupo de blastocistos que provenían de embriones con un mejor pronóstico (*score* > 6) en día 3. Por otra parte, de los blastocistos que provenían de embriones de peor calidad embrionaria (*score* ≤ 6) no implantó ninguno. Estos resultados no son estadísticamente significativos, debido al pequeño tamaño de la serie, pero apoyan la idea de que los embriones con mala morfología en estadios tempranos dan lugar a blastocistos de peor calidad.

En el momento en que fueron congelados los embriones de este estudio, no se sabía si el estadio de compactación era adecuado para la congelación, y por este motivo en el mismo periodo de tiempo en nuestro centro se congelaron embriones «compactando» en estadio temprano y en otros casos se decidió llevarlos a blastocisto. Actualmente hay trabajos que demuestran que la supervivencia al proceso de congelación de los embriones compactados es buena, con una tasa del 89,2 % (Tao *et al.*, 2004), tal y como nosotros vemos en nuestros resultados, con un 79 % (73/92).

En nuestro trabajo, ni la supervivencia ni la tasa de

implantación de los embriones congelados en día 3 son superiores significativamente a las de los embriones que se congelan en estadio de blastocisto. Teniendo en cuenta que con el cultivo largo la pérdida embrionaria es inevitable sería más recomendable la congelación en estadio temprano.

Aunque el período de tiempo del estudio es largo, el número de blastocistos descongelados y transferidos es escaso, lo que no nos permite sacar conclusiones definitivas en cuanto a las tasas de implantación.

## BIBLIOGRAFÍA

- BEHR, B.; GEBHARDT, J.; LYON, J. (2002). «Factor relating to a successful cryopreserved blastocysts transfer program». *Fertil. Steril.*, 77:697-9.
- COHEN, J.; SIMONS, R. F.; EDWARDS, R. G.; FEHILLY, C. B.; FISHEL, S. B. (1985). «Pregnancies following the frozen storage of expanding human blastocysts». *J. In Vitro Fert. Embryo. Transf.*, 2:59-64.
- MENEZO, Y.; VEIGA, A. (1997). «Cryopreservation of blastocysts». Dins: *10<sup>th</sup> World Congress on In-vitro Fertilization and Assisted Reproduction*. Bolonya: Monduzzi, p. 49-53, p. 49-53.
- PANTOS, K.; STEFANIDIS, K.; PAPPAS, K.; KOKKINOPOULOS, P.; PETROUTSOU, K. [et al.] (2001). «Cryopreservation of embryos, blastocysts and pregnancy rates of blastocysts derived from frozen-thawed embryos and frozen-thawed blastocysts». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 18:579-82.
- SON, W. Y.; YOON, S. H.; YOON, H. J.; LEE, S. M.; LIM, J. H. (2003). «Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of blastocoel». *Hum. Reprod.*, 18:137-139.
- STEHLINK, E.; KATAYAMA, K.; KUWAYAMA, M.; JAMBOR, V.; BROHAMMER, R. (2004). «Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts». *Reprod. Biomed. Online*. [Pendiente de publicación]
- TAO, J.; CRAIG, R. H.; JOHNSON, M.; WILLIAMS, B.; LEWIS, W.; WHITE, J.; BUEHLER, N. (2004). «Cryopreservation of human embryos at the morula stage and outcomes after transfer». *Fertil. Steril.*, 82:108-18.
- VANDERZWALMEN, P.; BERTIN, G.; DEBAUCHE, C. H.; STANDAERT, V. [et al.] (2002). «Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification». *Hum. Reprod.*, 17:744-751.
- VEEK, L. [et al.] (2004). «High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts». *Fertil. Steril.*, 82:1418-1427.