

TRANSFERÈNCIA D'UN SOL EMBRIÓ CONGELAT: FACTORS EMBRIOLÒGICS PREDICTIUS

Marta Valiente,¹ Miquel Solé,¹ Josep Santaló,³ Montse Boada,¹ Ventura Coroleu,¹ Anna Veiga^{1,2}

¹ Servei de Medicina de la Reproducció, Institut Universitari Dexeus

² Banc de Línies Cellulars, Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

³ Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Ciències, Unitat de Biologia Cel·lular

Resum

En aquest treball s'estudia quins són els factors embriològics que influeixen potencialment en el resultat de la transferència d'embrions criopreservats. Es realitza un estudi retrospectiu de 356 criotransferències (CT) d'un sol embrió relacionant paràmetres embriològics amb la taxa d'embaràs (TE). S'obté una TE general del 19,9 %. Es troba que els factors que es correlacionen amb una taxa d'embaràs elevada són: *timing* de divisió correcte i simetria dels blastòmers abans de congelar, la supervivència embrionària postdescongelació i la represa de la mitosi en el cultiu postdescongelació.

Paraules clau criopreservació, criotransferència, qualitat embrionària, supervivència, represa de la mitosi.

Abstract

In this study we analyze which are the embryologic factors which could potentially influence the outcome of cryopreserved embryo transfers. A retrospective study of 356 single embryo transfers (sET) was performed relating embryologic parameters and the pregnancy rate (PR). A PR of 19.9 % was obtained. We observed that the factors correlated with an increase of the PR were: timing of cell division and the blastomer's symmetry before freezing; the survival rate and the resumption of mitosis after culture post-thawing.

INTRODUCCIÓ

Fa poc més de 20 anys es va aconseguir el primer embaràs en humans procedent de la transferència d'embrions congelats (Trounson i Mohr, 1983). Actualment la criopreservació és un procediment rutinari i molt important en els programes de reproducció assistida (RA). La criopreservació d'embrions permet emmagatzemar-los per a transferències futures, d'aquesta manera es pot reduir el nombre d'embrions a transferir en el cicle en fresc, i així es disminueix el risc d'embaràs múltiple. Tot i que alguns estudis mostren taxes d'embaràs més baixes en transferències d'un embrió *vs.* dos, aquestes diferències desapareixen quan s'inclouen les taxes acumulades de les CT derivades del cicle en fresc (Thurin *et al.*, 2004).

La majoria d'estudis mostren pitjors resultats en la transferència d'embrions congelats respecte a la transferència d'embrions en fresc (Toner *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 2001; Oehning *et al.*, 2000). El procés de congelació i descongelació té un impacte

negatiu sobre la seva viabilitat i la capacitat d'implantació. En els últims anys s'han descrit un seguit de factors clínics i embriològics que ens permeten realitzar una selecció més acurada de l'embrió a transferir després de la descongelació. Entre els factors embriològics predictius del potencial implantatori dels embrions s'han descrit: morfologia de l'embrió abans de criopreservar (Schalkoff *et al.*, 1993; Salumets *et al.*, 2003), supervivència embrionària en descongelar (Guerif *et al.*, 2002; El-Toukhy *et al.*, 2003; Pal *et al.*, 2004) i la represa de la mitosi en les 24 hores següents a la descongelació (Ziebe *et al.*, 1998; Guerif *et al.* 2002; Gabrielsen *et al.*, 2006).

L'objectiu d'aquest treball és avaluar l'efecte dels factors embriològics, estudiant la CT d'un sol embrió, en el potencial d'implantació.

MATERIAL I MÈTODES

S'han avaluat retrospectivament totes les CT d'un sol embrió ($n = 356$) procedents del programa de

Taula 1 Taxa d'embaràs en relació a la morfologia embrionària abans de la congelació.

Morfologia embrionària	Total criotransferències	Implantació %
Dia 2		
4 cèl·lules	53	18,9 %
> 4 cèl·lules	19	21,1 %
Dia 3		
< 6 cèl·lules	72	9,7 %
≥ 6 cèl·lules	212	23,6 % *
Simetria celular		
Iguals	58	34,5 %
Similars	93	26,9 %
Diferents	205	12,7 % **
Fragmentació (%)		
Sense fragments	118	22,9 %
5-25	194	20,1 %
≥ 25	44	11,4 % ^{ns}

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; ns: no significatiu.

Taula 2 Taxa d'embaràs en relació a l'*score* embrionari en fresc.

Total criotransferències	Implantació %
Score en congelar	
8/9/10	160 27,5% **
6/7	124 17,7% **
≤ 5	70 7,1% **

** $P < 0,01$

FIV realitzades des de l'any 2001 al 2005 a l'Institut Universitari Dexeus.

Es van excloure del estudi les CT d'embrions procedents dels programes de donació d'òocits. La mitjana d'edat de les pacients el dia de la punció fol·licular era de $35 \pm 4,4$ anys (\pm SD).

L'avaluació dels embrions en fresc es va realitzar examinant el nombre de blastòmers, el percentatge de fragmentació, la simetria dels blastòmers i l'absència de multinucleació. Els embrions congelats van ser classificats seguint un criteri de *score* embrionari en dia 2 i dia 3 basant-nos en els paràmetres anteriors.

El criteri utilitzat per a congelar els embrions es basa en el *timing* de divisió (≥ 4 blastòmers en dia +2 i ≥ 4 blastòmers en dia +3) i en un percentatge de fragmentació inferior al 35 %. No es van congelar els embrions que presentaven multinucleació. La majoria dels embrions van ser criopreservats en dia +3 (79,8 %).

Per a avaluar com afecta el grau de fragmentació es van analitzar tres grups: no fragmentats, 5-25 % i

≥ 25 %. Pel que fa a la simetria dels blastòmers, aquests poden ser *iguals*, *similars* i *diferents*.

Després de la descongelació es va avaluar el nombre de blastòmers supervivents (percentatge de supervivència) i es va deixar l'embrió en cultiu durant 18-24 hores. Respecte al percentatge de supervivència, es van definir quatre grups: 100 % de supervivència (embrió intacte), de 100-80 %, 80-50 % i ≤ 50 %.

Just abans de la transferència es va realitzar una segona observació per a valorar la represa de la mitosi. Es varen establir quatre grups: fusió de blastòmers, blastòmers no dividits, divisió d'un sol blastòmer i divisió de més d'un blastòmer, incloent-hi els que presentaven signes de compactació.

L'anàlisi comparativa entre les diferents variables categòriques es va realitzar utilitzant tests de χ^2 o taules de contingència.

RESULTATS

La TE obtinguda del total de les 356 CT va ser del 19,9 %.

Anàlisi univariant de la morfologia de l'embrió en fresc

Es va trobar una correlació entre el nombre de blastòmers de l'embrió en dia +3 i la TE (taula 1). Embrions amb < 6 blastòmers en dia +3 presentaven una TE significativament inferior d'aquells que tenien ≥ 6 (9,7 % vs. Un 23,6 %, respectivament; $p < 0,05$).

Taula 3 Taxa d'embaràs en relació a la supervivència embrionària i divisió postdescongelació.

Total criotransferències	Implantació %	
Supervivència (%)		
100	170	25,9 % **
100-80	51	23,5 % **
80-50	80	16,3 %
≤ 50	55	3,6 %
Divisió embrionària		
Fusió cel·lular	7	0 %
No dividits	112	13,4 %
Divisió 1 cèl·lula	65	15,4 %
Divisió ≥ 2	172	26,7 % **

** $P < 0,01$

Pel que fa al percentatge de fragments, no es va trobar cap diferència estadísticament significativa en la TE entre el grup d'embrions que presentaven < 25 % de fragments (TE = 21,1 %), dels que en tenien ≥ 25 % (TE = 11,4 %), tal com s'exposa en la taula 1.

Pel que fa a la simetria dels blastòmers, es va veure que era un factor important a tenir en compte per a predir l'èxit de la CT. A mides de blastòmers iguals o similars no s'observaren diferències significatives, ja que les TE eren del 34,5 % i del 26,9 %, respectivament. No obstant això, hi ha una disminució clara, estadísticament significativa, de la TE (12,7 %; $p < 0,01$) en el grup d'embrions que presentaven blastòmers asimètrics (taula 1).

Es va analitzar la TE per a tres grups de *scores* embrionaris en fresc descrits a la taula 2: els que presentaven un *score* de 8-9-10 (embrions òptims), els que tenien una puntuació de 6-7, i els de ≤ 5. Es va veure que la TE postdescongelació augmentava de manera significativa si els embrions presentaven un *score* en fresc més elevat.

Anàlisi univariant de la supervivència embrionària

Avaluant els resultats de la supervivència embrionària postdescongelació (taula 3), els embrions intactes i els que mostraven > 80 % dels blastòmers intactes tenien una TE similar (25,9 % i 23,5 %, respectivament). Aquestes TE, però, eren significativament més elevades ($p < 0,01$) que la del grup d'embrions que presentaven una taxa de supervivència entre el 80-50 % o ≤ 50 % (16,3 % i 3,6 %, respectivament).

Relació de l'*score* en fresc i la taxa de supervivència

Tal com es mostra a la taula 4, no s'ha trobat correlació entre e l'*score* embrionari i la taxa de supervivència.

Anàlisi univariant de la represa de la mitosi

El grup d'embrions que no s'havien dividit mostren TE similars (taula 3) a la dels embrions que només presentaven un blastòmer dividit (13,4 % i 15,4 %, respectivament). No obstant això, els embrions amb ≥ 2 blastòmers dividits o amb indicis de compactació presentaven un augment estadísticament significatiu de la TE (26,7 %; $p < 0,01$).

DISCUSSIÓ

La TE obtinguda ha estat del 19,9 %, similar a la que mostren altres publicacions (Ziebe *et al.*, 1998; Salumets *et al.*, 2006).

En aquest treball vàrem trobar una correlació estadísticament significativa entre el nombre de blastòmers de l'embrió en dia +3 i la TE. D'acord amb altres estudis (Guerif *et al.*, 2002; Gabrielsen *et al.*, 2006) els embrions que presenten millors TE són els que presenten un ritme de divisió adequat, és a dir, en dia +3, ≥ 6 blastòmers.

El percentatge de fragments també és un paràmetre important a tenir en compte a l'hora d'avaluar la morfologia. Publicacions com la Salumets *et al.* (2006) mostren que, a menys nombre de fragments, millors TE. No obstant això, en la nostra anàlisi no hem trobat diferències estadísticament significatives, probablement a causa del baix nombre d'embrions amb ≥ 25 % de fragments que analitzem i al fet que el màxim percentatge es troba en el límit de 35 % de fragments.

Pel que fa a la simetria dels blastòmers, els nostres resultats mostren que embrions amb blastòmers asimètrics, amb patrons de divisió probablement alterats, són de pitjor pronòstic.

Analitzant la TE per als diferents *scores* embrionaris, podem concloure, com altres estudis previs (Salumets *et al.*, 2006), que a millor qualitat embrionària abans de congelar, millors TE. Al contrari del que s'ha descrit a la literatura (Karlström *et al.*, 1997), no trobem correlació entre els diferents grups d'*scores* embrionaris i la supervivència. El nostre *score* dona molt pes al nombre de blastòmers enfront dels altres paràmetres. És probable que la supervivència embrionària estigui més relacionada amb fac-

Taula 4 Relació de l'*score* en fresc i la taxa de supervivència.

Score en congelar	Nombre d'embrions	Taxa de supervivència	Nombre de CT	Implantació
8/9/10	160	80-100 %	97 (62 %)	35,1
		50-80 %	35 (22 %)	22,9
		≤ 50 %	24 (8,3 %)	8,3
6/7	124	80-100%	70 (58 %)	24,3
		50-80 %	26 (21,5 %)	19,2
		≤ 50 %	25 (20,6 %)	0
≤ 5	70	80-100 %	50 (71 %)	10
		50-80 %	14 (20 %)	0
		≤ 50 %	6 (8 %)	0

tors com la fragmentació o factors propis de l'embrió, dades que no s'han analitzat.

La taxa de supervivència postdescongelació és un bon factor predictiu de l'èxit de la CT. Es considera que un embrió sobreviu a la descongelació si com a mínim es manté el 50 % dels seus blastòmers inicials intactes, citoplasma clar i refringent i sense trencament de la zona pellúcida (Freeman *et al.*, 1986; Van den Abbel *et al.*, 1997). D'acord amb els estudis més recents (Tang *et al.*, 2006; Salumets *et al.*, 2006), embrions amb millor supervivència aporten TE més elevades. Tot i això, alguns autors han publicat que no hi ha un efecte negatiu pel que fa a la TE si es transfereixen embrions amb baixes taxes de supervivència (Hartshorne *et al.*, 1990); fins i tot es coneixen resultats d'embaràs amb embrions que presentaven menys del 50 % de supervivència (Veiga *et al.*, 1987). A diferència dels treballs publicats l'any 2006, esmentats anteriorment, no observem una disminució significativa de la TE entre embrions que presenten una supervivència del 100 % i els que presenten una proporció baixa de blastòmers lisats (100-80 %). La disminució de la taxa de supervivència per sota del 80 % es correlaciona amb TE significativament més baixes.

Actualment el cultiu *in vitro* durant 24 hores abans de la transferència no està establert en tots els equips de treball. Molts grups transfereixen els embrions el mateix dia de la descongelació, però el fet d'avaluar la represa de la mitosi d'aquests embrions descongelats pot constituir una eina eficaç a l'hora de predir la seva capacitat d'implantació. Alguns estudis previs han demostrat que la transferència d'embrions que es continuen dividint *in vitro* en les 18-24 hores següents millora significativament la TE (Van der Elst *et al.*, 1997; Ziebe *et al.*, 1998; Guerif *et al.*, 2002; Salumets *et al.*, 2006). A diferència d'aquests estudis, nosaltres vàrem separar els embrions que reiniciaven la mitosi en dos grups, i s'observava que

només es produïa un augment de la TE si es dividien un mínim de dos blastòmers o l'embrió compactava.

Podem concloure que els paràmetres que tenen un poder predictiu sobre l'èxit d'una CT són: el *timing* de divisió i la simetria dels blastòmers abans de congelar, la supervivència embrionària i la represa de la mitosi postdescongelació. Obtindrem un màxim potencial d'implantació quan l'embrió presenti el *timing* correcte de divisió abans de la criopreservació, una supervivència ≥ 80 % i una divisió d'un mínim de dos blastòmers o amb indicis de compactació posterior al cultiu postdescongelació.

BIBLIOGRAFIA

- EL-TOUKHY, T.; KHALAF, Y.; AL-DARAZI, K. [*et al.*] (2003). «Effect of blastomere loss on the outcome of frozen embryo replacement cycles». *Fertil. Steril.*, 79: 1106-1111.
- FREEMAN, L.; TROUNSON, A.; KIRBY, C. (1986). «Criopreservation of human embryos: progress on the clinical use of the technique in human in vitro fertilization». *J. Assist. Reprod. Genet.*, 3: 53-61.
- GABRIELSEN, A.; FEDDER, J.; AGERHOLM, I. (2006). «Parameters predicting the implantation rate of thawed IVF/ICSI embryos: a retrospective study». *Reprod. Biomed. Online*, 12(1): 70-76.
- GUERIF, F.; BIDAULT, R. [*et al.*] (2002). «Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal». *Hum. Reprod.* 17: 1321-1326.
- HARTSHORNE, G. M.; WICK, K.; ELDER, K.; DYSON, H. (1990). «Effect of cell number at freezing upon survival and viability of cleaving embryos generated from stimulated IVF cycles». *Hum. Reprod.*, 5: 857-861.
- KARLSTRÖM, P.-O.; BERGH, T. [*et al.*] (1997). «Prognostic factors for the success rate of embryo freezing». *Hum. Reprod.*, 12: 1263-1266.
- PAL, L.; KOVACS, P.; WITT, B. [*et al.*] (2004) «Posthaw blastomere survival is predictive the success of frozen-

- thawed embryo transfer cycles». *Fertil. Steril.*, 82: 821-826.
- OEHNING, S.; MAYER, J.; MUASHER, S. (2000). «Impact of different clinical variables on pregnancy outcome following embryo criopreservation». *Mol. Cell. Endocr.*, 169: 73-77.
- SALUMETS, A.; TUURI, T. [et al.] (2003). «Effect of developmental stage of embryos at freezing on the pregnancy outcome of frozen-thawed embryo transfers». *Hum. Reprod.*, 18: 1890-1895.
- SALUMETS, A.; SUIKKARI, A. M.; MÄKINEN, S. [et al.] (2006). «Frozen embryo transfers: implications of clinical and embryological factors on the pregnancy outcome». *Hum. Reprod.*, 21: 2368-2374.
- SCHALKOFF, M. E.; OSKOWITZ, S. P.; POWERS, R. D. (1993). «A multifactorial analysis of the pregnancy outcome in a successful embryo criopreservation program». *Fertil. Steril.*, 59: 1070-1074.
- TANG, R.; CATT, J.; HOWLETT, D. (2006). «Towards defining parameters for a successful single embryo transfer in frozen cycles». *Hum. Reprod.*, 21: 1179-1183.
- THURIN, A.; HAUSKEN, J. [et al.] (2004). «Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in vitro fertilization. *NEJM*, 351: 2392-2402.
- TONER, J. P.; PHILPUT, C. B.; JONES, G. S.; MUASHER, S. J. (1991). «Basal follicle-stimulating hormone level is a better predictor of in vitro fertilization performance than age». *Fertil. Steril.*, 55: 784-791.
- TROUNSON, A.; MOHR, L. (1983). «Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo». *Nature*, 305: 707-709.
- VAN DEN ABBEEL, E.; CAMUS, M.; VAN WAESBERGHE, L. [et al.] (1997). «Viability of partially damaged human embryos after criopreservation». *Hum. Reprod.*, 12: 2006-2010.
- VAN DER ELST, J.; VAN DEN ABBEEL, E. [et al.] (1997). «Selective transfer of criopreserved human embryos with further cleavage after thawing increase delivery and implantation rates». *Hum. Reprod.*, 12: 1513-1521.
- VEIGA, A.; CALDERON, G.; BARRI, P. N.; COROLEU, B. (1987). «Pregnancy after the replacement of a frozen-thawed embryo with <50 % intact blastomeres». *Hum. Reprod.*, 2: 321-323.
- WANG, J. X.; YAP, Y. Y.; MATTHEWS, C. D. (2001). «Frozen-thawed embryo transfer: influence of clinical factors on implantation rate and risk of multiple conception». *Hum. Reprod.*, 16: 2316-2319.
- ZIEBE, S.; BECH, B.; PETERSEN, K. [et al.] (1998). «Resumption of mitosis during post-thaw culture: a key parameter in selecting the right embryos for transfer». *Hum. Reprod.*, 13: 178-181.

