

Revisiones de Temas

Cultivo y Transferencia de Blastocistos: ¿La Respuesta?

Juan Luis Giraldo*; Paulo Serafini**; Antonia Habana*; David Olive***

* Fellow, División Medicina Reproductiva e Infertilidad, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Yale, USA.

** Profesor Asociado, División de Medicina Reproductiva e Infertilidad, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Yale, USA.

*** Director de la División de Medicina Reproductiva e Infertilidad, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Yale, USA

RESUMEN

En la década de los noventa el desarrollo de la técnica para cultivar y transferir blastocistos luego de una fertilización in vitro ha reportado beneficios en ciertos aspectos cruciales de esta práctica. El mayor control sobre la incidencia de embarazos múltiples es una de sus principales bondades. El proceso de autoselección al que se someten los embriones ha permitido que se transfieran embriones mas viables y con una mayor capacidad de implantarse en el endometrio. También ha contribuido al desarrollo de una nueva ola en la evaluación y el diagnóstico preimplantación del embrión. Detallados análisis de los fenómenos metabólicos cambiantes en el embrión temprano han permitido la aparición de nuevos medios de cultivo que soportan el crecimiento embrionario in vitro hasta su estado de blastocisto. Estos medios están reemplazando al cocultivo como herramienta preferida para cultivar blastocistos. Sin embargo aun existen interrogantes sobre el mecanismo de acción de los cocultivos y sobre la forma en que algunos de sus efectos benéficos como la producción de factores embriotróficos específicos, puedan ser incorporados a los nuevos medios.

PALABRAS CLAVES: Blastocisto/medios secuenciales/cocultivo/fertilización in vitro/diagnóstico preimplantación.

SUMMARY

The development of the technique to cultivate blastocysts has brought many benefits in the practice of in vitro fertilization. The possibility of diminishing the high multiple pregnancy rates associated with these techniques has been one of the most important contributions. The

process of in vitro embryo auto-selection has enabled us to transfer more viable embryos with a better possibility of implantation. The culture of blastocysts has contributed, to the new wave of research on preimplantation diagnosis. Detailed analysis of early embryo metabolism has involved into the development of complex culture media capable to efficiently support embryos to the blastocyst stage. These media are replacing the coculture as the preferred environment to grow blastocysts. However, there are still many questions about the mechanisms of promoting embryo growth and success. Further analysis of the production of embryotrophic factors involved in coculture embryo support should be identified and incorporated for the manufacturing of better media.

KEY WORDS: Blastocyst/sequential media/coculture/In Vitro Fertilization/preimplantation diagnosis.

¿Por qué transferir blastocistos?

El cultivo del embrión hasta el estado de blastocisto ha cobrado marcada importancia en la práctica de la fertilización in vitro en los últimos años. El interés en el blastocisto se basa en el afán por lograr una sincronización entre el embrión y el medio intrauterino al cual este se transfiere (1). De esta manera se ha intentado hacer de la fertilización in vitro un proceso más cercano a las condiciones fisiológicas en que se dan el desarrollo embrionario temprano y el proceso de implantación.

Al llegar a la pubertad, el ovario humano contiene aproximadamente 300 a 400 mil oocitos primarios.

Estos se encuentran detenidos en la primera división meiótica que se inicia desde antes del nacimiento. La ovulación marca la reactivación de la primera meiosis, que culmina con la formación del primer cuerpo polar y del oocito secundario y el comienzo de la segunda división meiótica que se detiene en la etapa de metafase hasta la fertilización. El óvulo comienza entonces su recorrido por la luz tubárica, donde es fertilizado en las primeras 24 horas, generalmente en la porción ampular. La segunda división meiótica se reactiva en el momento en que el espermatozoide penetra la zona pelúcida. Al completar esta segunda meiosis, momento marcado por la extrusión del segundo cuerpo polar, el cigoto o pre-embrión ingresa a la etapa pronuclear. Los pronúcleos, cada uno con el material genético paterno o materno, se fusionan dando por culminado el proceso de fertilización y origen al embrión como tal.

Aun en el oviducto comienza la división mitótica del embrión. Cuarenta y ocho horas post-fertilización este llega a su estado de 4 a 8 células. Hacia el tercer día el embrión forma la mórula, con 16 a 32 células y continúa su división hasta formar el blastocisto luego de 4 a 5 días de haber sido fertilizado. Este último se caracteriza por la formación del blastocele y de la masa celular interna que dará origen al feto. En estas condiciones el embrión llega a la

cavidad uterina, sale de la zona pelúcida y hacia el sexto o séptimo día se implanta en la superficie endometrial.

Los protocolos clásicos de fertilización in vitro incluyen la transferencia embrionaria luego de 2 ó 3 días de cultivo. Esto somete prematuramente al embrión a un medio intrauterino cuyo grado de hostilidad y receptividad en dicha etapa embrionaria aun es incierto. La transferencia de embriones en la etapa de blastocisto lleva a que el embrión cultivado artificialmente llegue a la cavidad uterina en el momento en que lo haría si hubiera sido concebido in vivo. Esto puede facilitar el intercambio embrión-endometrio y llevar a una optimización del proceso de implantación.

Pros y contras

La transferencia de blastocistos luego de 5 días de cultivo ha demostrado tener algunas ventajas sobre la transferencia de embriones en el estado de 4 a 8 células, tradicionalmente transferidos luego de 2 ó 3 días de cultivos. Esta modalidad requiere de una logística más elaborada y de un tiempo más prolongado de cultivo que los métodos clásicos, por ende se somete a los embriones a un proceso de selección. Como resultado es posible que sólo los embriones más competentes de la cohorte en cultivo logren llegar al estado de blastocisto. De esta manera no se transfieren embriones destinados a frenar su desarrollo. En resumidas cuentas se transfiere un menor número de embriones pero con mayor posibilidad de sobrevivir e implantarse, logrando un resultado más predecible y una tasa más baja de embarazos múltiples (2-4). De allí se desprende el hecho de que ocurra un aumento de la baja tasa de implantación de los embriones de clivaje que fluctúa entre un 10 _ 20%, logrando tasas de 25 % e incluso de 45 % y 58% con el cultivo de blastocistos según lo reportan algunos autores (5, 6). Como es de esperarse, ya que el número de embriones transferidos disminuye, las tasas de embarazo siguen siendo similares a las logradas con transferencia de embriones en clivaje pero con disminución en el número de embarazos múltiples.

Como se mencionó antes el ambiente intrauterino es el medio natural del blastocisto más no del embrión en etapa de clivaje. El embrión in vivo llega a la cavidad uterina luego de iniciarse el período de compactación. La exposición prematura de los embriones en etapa de clivaje cultivados in vitro a el medio intrauterino, sumado a los efectos adversos del cultivo como tal son probablemente los responsables de la alta tasa de falla de implantación en dichos ciclos. Mejores resultados en ciclos de fertilización in vitro con transferencia de blastocistos reportados por algunos autores pueden ser debidos a una mejor sincronización entre el embrión y el endometrio (7). Las bajas tasas de formación de blastocisto y de embarazo reportadas con el cultivo de blastocistos en un principio (8-10) son probablemente el resultado del proceso normal de mejoramiento de una técnica pero más que todo del uso de medios de cultivo inapropiados disponibles en ese momento.

Una ventaja adicional del proceso de selección al que son sometidos los embriones cultivados

hasta blastocisto radica en el número reducido de embriones que requieren criopreservación (2, 4, 10-12). Es probable que los embriones no competentes frenen su desarrollo y se degeneren antes de formar un blastocisto. En otras condiciones estos serían susceptibles de ser criopreservados en su etapa pronuclear o de clivaje. Este concepto tiene claras implicaciones sobre la problemática ética y de almacenamiento de embriones. Además disminuye los costos de funcionamiento del laboratorio y los problemas médico legales relacionados con el manejo de embriones en criopreservación.

El diagnóstico preimplantación es otro de los beneficiados con el cultivo y posterior transferencia de embriones en etapa de blastocisto. El tiempo transcurrido entre la etapa de clivaje y la formación del blastocisto permite la biopsia de blastómera y su posterior análisis para toma de decisiones clínicas (2, 4). Además en esta etapa se posibilita la biopsia del trofoectodermo con sus posibles ventajas sobre la biopsia de blastómera, evitar la manipulación directa del tejido embrionario y obtener un mayor número de células. El análisis genético se facilita al aumentar el tamaño de la biopsia.

Aparte del análisis genético la posibilidad de desarrollar métodos de diagnóstico no invasivo aplicables al blastocisto se erige como una nueva herramienta en la selección de los mejores embriones para ser transferidos (13). Es de anotar que el genoma del embrión se activa luego de la etapa de 4 a 8 células (etapa de clivaje) (14), por lo cual el análisis de marcadores embrionarios previo a esta etapa refleja las condiciones heredadas del oocito y no las propias del embrión. Algunas técnicas pueden ser útiles en la evaluación de los embriones para predecir y determinar la viabilidad embrionaria. El análisis de la tasa de clivaje ha arrojado resultados contradictorios en cuanto a su utilidad. Algunos autores han reportado que esta tiene una relación directamente proporcional con la tasa de formación de blastocistos. A su vez encontraron que los blastocistos formados a partir de embriones con una baja tasa de clivaje tienen menor posibilidad de implantarse y generar un feto viable que los que se forman a partir de embriones con alta tasa de clivaje. (15). Sin embargo otros autores no han encontrado una relación significativa entre la tasa de clivaje y la obtención de blastocistos viables (Serafini).

El análisis del metabolismo energético es otro parámetro que se erige como uno de los posibles métodos de evaluación y selección. Se ha encontrado que los embriones de ratón con mayor utilización de glucosa y menor producción de lactato son los de mejor pronóstico y tienen la mayor tasa de desarrollo fetal (16). Sin embargo esta técnica aún no es viable para la aplicación clínica en humanos.

Hasta el momento, la morfología del blastocisto se erige como el mejor marcador de su viabilidad. Se ha reportado que el número de blastocistos con un blastocele completamente expandido, con células poligonales bien definidas en su trofoectodermo y con una masa celular interna única, es mayor en las mujeres que logran un embarazo que en las que no lo logran (5, 12).

Teniendo en cuenta las ventajas del cultivo y posterior transferencia de blastocistos se pueden definir ciertas situaciones en las que sería indicado recurrir a esta técnica (11, 17): pacientes con mayor riesgo de complicaciones relacionadas con embarazos múltiples como las pacientes con malformaciones uterinas, pacientes con varias fallas de implantación en ciclos previos, pacientes que requieren una biopsia de sus embriones para selección genética preimplantación y pacientes en quienes se sospechan defectos en la calidad de sus oocitos y/o embriones.

Por otro lado el cultivo y transferencia de blastocistos tiene ciertos reparos. Es posible que las condiciones de selección in vitro sean diferentes a las condiciones in vivo. Esto implica la posibilidad de que un embrión que in vitro no logró desarrollarse hasta el estado de blastocisto podría haberlo logrado in vivo, dando lugar a un feto viable. Esta teoría puede ser apoyada por estudios que demuestran que las tasas de éxito en ciclos con embriones congelados en la etapa de clivaje y en etapa de blastocisto son similares (18, 19). Así también, no todos los embriones que logran llegar a la etapa de blastocisto in vitro tienen la capacidad de implantarse y dar origen a un feto viable (9).

Aunque el desarrollo de métodos de evaluación y selección del blastocisto son una posibilidad clara y llamativa, aun no se han consolidado como procedimientos prácticos y con resultados clínicos claros. Actualmente los parámetros morfológicos y la expansión del blastocelo son los criterios de selección más prácticos. La producción de Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) parece tener un pico de secreción muy tardío para poder ser utilizada como herramienta de selección de los blastocistos más aptos para transferir (20).

La evaluación de la calidad embrionaria basados en características morfológicas tiene algunas deficiencias. Su carácter subjetivo genera dudas sobre su capacidad para predecir el potencial de desarrollo futuro de los embriones. En etapas tempranas el porcentaje de fragmentación y la apariencia de las blastómeras son características morfológicas importantes. Además la presencia de blastómeras multinucleadas en la etapa de 2 células es uno de los parámetros más indicativos del trastorno futuro en el desarrollo de dicho embrión (21). Sin embargo en etapas medianas a tardías esta evaluación morfológica se dificulta. En la mórula y en el blastocisto en expansión el conteo de células por microscopía de luz convencional es inexacto y además los métodos con sondas fluorescentes (22) para diferenciar entre citoplastos acelulares o vacúolas y blastómeras acelulares no son prácticos para la aplicación clínica. Aún se requiere también el desarrollo de métodos viables para la evaluación específica de la masa celular interna.

No es de ignorar el aumento en la complejidad y costo de los métodos de cultivo necesarios para lograr la transferencia de blastocistos. Se requieren como primera medida de 2 a 3 días más de cultivo. Además la necesidad de introducir medios de cultivo secuenciales más complejos y costosos o líneas celulares para el establecimiento de cocultivos. El cocultivo no sólo aumenta el costo y la complejidad sino que introduce la posibilidad de contaminación de los embriones a partir de infecciones no detectadas en las células de la monocapa, sean estas

de origen animal o humano. Sin embargo, cabe anotar que si se tiene en cuenta la disminución en la tasa de embarazos múltiples que se logra con la transferencia de blastocistos, el costo integral en la atención de un grupo de pacientes puede incluso disminuir con respecto al de un grupo con transferencia de embriones en etapa de clivaje.

Por último el proceso de selección al que se someten los embriones en el cultivo prolongado hasta la etapa de blastocisto que se erige como una de las bondades de esta práctica es un arma de doble filo. Llegarán las pacientes cuyos embriones en clivaje no den origen a ningún blastocisto. No es tarea fácil explicarles que es probable que ninguno de esos embriones transferidos más tempranamente hubiese dado origen a un feto viable ya que un proceso de selección similar al del cultivo se habría dado en el ambiente intrauterino. Esta situación genera un sentimiento de fracaso y duda de parte de la paciente, que se debe tener en cuenta antes de embarcarse en el cultivo de blastocistos. Sin embargo algunas de estas pacientes sienten que por lo contrario, es una ventaja no tener que soportar varios días más de espera angustiante y exámenes innecesarios para conocer el resultado de unos embriones en estado de clivaje que fueron transferidos y que estaban predestinados a frenar su desarrollo (Serafini).