

Efecto del microentorno sobre los embriones descongelados: comparación entre incubadores con diferentes niveles de oxígeno

Microenvironment effect on thawed embryos: comparison between incubators with different oxygen levels

Susana Cortés¹; Clara Luna¹, Aurea García¹, Consuelo Muñoz¹; Andrés Guijarro²; Rocio Núñez¹; Pedro Caballero-Peregrín³.

¹Laboratorio de fecundación In Vitro. Clínica Tambre, Madrid.

²Servicio Ginecología. Hospital de Cuenca.

³Clínica Tambre, Madrid.

RESUMEN

Objetivo: Comparar la tasa de gestación obtenida en criotransferencias utilizando tres incubadores con distintas concentraciones de oxígeno (O₂).

Material y Método: Para este estudio se usaron tres tipos de incubadores, 1. Heraeus 150 (O₂ atmosférico 20%); 2. Labotec C-60 (10% O₂); y 3. MINC (5% O₂). La congelación de los embriones sobrantes de ciclos de FIV y/o ICSI se realizó en día +2 o día +3 utilizando un protocolo de congelación lenta. Tras la descongelación, los embriones se mantuvieron aproximadamente 3-4 horas en los medios de cultivo hasta el momento de su transferencia.

Resultados: La tasa media de supervivencia para los embriones congelados en día +2 fue del 92,34%, y de 87,82% para los de día +3. Tras el análisis de los resultados obtenidos en función de la concentración de O₂ utilizada, no se observan diferencias significativas en la tasa de embarazo (26,8% MINC; 32,7% Labotec; 23,2% Heraeus), tasa de implantación (14,8% MINC; 17,6% Labotec; 11,6% Heraeus) o tasa de aborto (22,7% MINC; 20,0% Labotec; 15,0% Heraeus) entre los distintos tipos de incubadores. Los análisis estadísticos realizados para los embriones descongelados en día +2 (n=153) no revelan diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados. Sin embargo, tras estudiar los datos obtenidos en las descongelaciones de día +3 (n=76), se observan diferencias significativas (p<0,05) en la tasa de embarazo utilizando el incubador con condiciones de O₂ del 10% (Labotec) (26,7% MINC; 52,2% Labotec; 13% Heraeus).

Conclusiones: Para el cultivo de embriones criopreservados en día +3 se recomienda el empleo de bajas concentraciones de O₂ en su microambiente a fin de aumentar la tasa de embarazo, si bien se necesitarían nuevos trabajos con una mayor casuística que confirmen estos hallazgos.

(Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; N° 3 - 29: ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Aceptado 28 Mayo 2012

Correspondencia: Dra. Dña. Susana Cortés Gallego. Laboratorio de fecundación In Vitro. Clínica Tambre, Madrid, C/ Tambre, 8. 28002 Madrid, España. Email: scortes@clinicatambre.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Secretaría general: Luis A. Quintero. Apdo. Correos 87. 46110 Godella (Valencia) España. Email: contacto@editorialmedica.com

Palabras clave: *concentración oxígeno; embriones criopreservados; descongelación, incubadores.*

SUMMARY

Objective: This retrospective study was performed to compare pregnancy rates in thawed embryo transfers using three different incubators with different oxygen (O₂) concentrations.

Materials and methodology: For this study, three types of incubators were used: 1. Heraeus 150 (atmospheric O₂ 20%), 2. Labotec C-60 (10% O₂) and 3. MINC (5% O₂). Freezing of ICSI and/or IVF cycles remaining embryos was made on 2nd or 3rd culture day, using slow freezing method. After thawing, embryos were maintained 3-4 hours in culture media until the time of transfer.

Results: The average survival rate in embryos frozen on 2nd day was 92.34%, and 87.82% for those on 3rd day. After analyzing the results in relation to the oxygen concentrations used, no significant differences were found in pregnancy rate (26,8% MINC; 32,7% Labotec; 23,2% Heraeus); the implantation rate (14.8% MINC; 17.6% Labotec; 11.6% Heraeus) or the miscarriage rate (22.7% MINC; 20.00% Labotec; 15.0% Heraeus) between the three incubators used. The statistical analysis made for the embryos frozen on 2nd day (n=153) did not reveal significant differences in any of the parameters studied. However, after studying the results on 3rd day embryos thawing (n=76), a significant difference (p<0,05) was found using the incubator with 10% oxygen (Labotec) (26,7% MINC; 52,2% Labotec; 13% Heraeus).

Conclusion For the culture of 3rd day frozen embryos, it is advised to use low concentrations of O₂ in their microenvironment, thus significantly improving the pregnancy rate, though new studies with larger case numbers are needed in order to confirm these findings. (Rev Iberoam Fert Rep Hum, 2012; 29: ©2012 Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana).

Key words: *oxygen level; thawed embryos; thawing, incubators.*

INTRODUCCIÓN

Ya en el año 1993 se comprobó que el desarrollo in vitro de embriones de varias especies de mamíferos era mejor a proporciones de oxígeno (O₂) menores que la atmosférica (20%) debido principalmente a la reducción de las especies reactivas de oxígeno (1). En el cultivo de blastocistos, el beneficio de las bajas concentraciones de O₂ ha sido probado de forma evidente: mayor tasa de división embrionaria, aumento de la tasa de formación de blastocistos, aumento de la proporción de blastocistos óptimos, y un aumento del número de células de estos (2, 3).

Numerosos estudios realizados en animales han demostrado que el cultivo de embriones "in vitro" con bajas concentraciones de O₂ mejora el desarrollo embrionario y la tasa de embarazo. Sin embargo, trabajos desarrollados con embriones humanos muestran que no siempre este descenso de la concentración de O₂ resulta en una mejora de la calidad embrionaria y de la tasa de gestación (4) no observándose un aumento significativo en la tasa de embarazo en embriones incubados a bajas concentraciones de O₂ tras

la transferencia en día +2 o día +3 (4, 5, 6). Las discrepancias observadas entre el cultivo embrionario de animales y humanos puede deberse a diferencias en la fisiología del embrión, así como a los distintos protocolos, medios o condiciones de cultivo empleadas (7).

Sin embargo, otros estudios muestran mejorías en la tasa de fecundación, división embrionaria y gestación cuando los embriones son mantenidos en niveles bajos de O₂ (8). En lo que todos los trabajos coinciden, es en que el cultivo embrionario hasta día +5 en condiciones de O₂ reducido implica un aumento del porcentaje de formación de blastocistos (5) y/o de la tasa de embarazo (6). Algunos autores sugieren que el efecto nocivo del O₂ pudiera ser más notable en la etapa de blastocisto, por un efecto deletéreo de la especies reactivas del O₂ sobre la masa celular interna (MCI), o bien porque este efecto nocivo en etapas previas de desarrollo no se vea reflejada hasta la llegada del embrión a blastocisto (7, 9).

El objetivo del presente trabajo es comparar el efecto que tienen las diferentes concentraciones O₂ (5%, 10% y 20%) sobre la tasa de gestación obtenida tras la descongelación de embriones criopreservados en día 2 o día 3.

MATERIAL Y METODO

Se han analizado un total de 229 ciclos de criotransferencia (153 ciclos en día 2, y 76 ciclos en día 3) procedentes de embriones de buena calidad de ciclos de FIV/ICSI. La edad media de las pacientes fue de $31 \pm 5,8$ años.

En nuestro centro solamente congelamos los embriones de buena calidad que no fueron transferidos en el ciclo en fresco. El cultivo de estos embriones, previo a la congelación, se realizó en incubadores con un 20% de O₂ atmosférico en todos los casos. La congelación se realizó en día +2 o día +3 utilizando los medios de Vitrolife (Free-kit1™, Vitrolife, Sweden) con una rampa lenta de congelación mediante un congelador Nicool Bag MS21 (Air Liquide, Francia). Las placas de descongelación y las de cultivo se preparan el día anterior y se introducen cada una en los diferentes incubadores de forma aleatoria. Para este estudio se usaron tres tipos de incubadores: 1. Heracell 150 (5% CO₂ y 20% O₂ atmosférico); 2. Labotec C-60 (5% CO₂, 10% O₂, 85% N₂); y 3. MINC (5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂). La descongelación se realizó siguiendo las especificaciones del kit de Vitrolife (Thaw-Kit1™, Vitrolife, Sweden). Consideramos que un embrión sobrevive a la descongelación cuando al menos el 50% de las blastómeras se encuentran intactas tras el proceso. Una vez descongelados, los embriones que sobreviven se pasan a placas con medio de cultivo Cleavage Medium (Cook, Ireland) en el caso de los embriones congelados en día+2, y Blastocyst Medium (Cook, Ireland) en el caso de los embriones en día +3, hasta el momento de su transferencia (aproximadamente 3-4 horas tras la descongelación). En todas las transferencias de embriones criopreservados se utilizó UTM (Origio Medicult, Denmark) como medio de transferencia.

Se realizó la prueba de embarazo 14 días después de la transferencia con embriones en día +2, ó 13 días después con embriones en día +3. Se consideró embarazo positivo cuando el valor de la β -hCG en sangre periférica fue ≥ 50 mIU/ml, determinaciones realizadas con un Elecsys 2010 (Roche, Germany)

RESULTADOS

Los resultados obtenidos para los distintos tipos de incubador independientemente del día de su descongelación se muestran en la Tabla 1, no observando diferencias significativas para ninguno de los parámetros analizados.

La tasa global de supervivencia para los embriones congelados en día +2 es del 92,34%, y del 87,82% para los de día +3, sin diferencias significativas entre ambos grupos.

Analizando los resultados obtenidos en día +2 (Tabla 2) en función de la concentración de O₂ utilizado, observamos que no existen diferencias significativas en la tasa de em-

barazo entre ellos (30,6% MINC; 32,4% Labotec; 31,7% Heraeus). Sin embargo, tras estudiar los datos obtenidos en día +3 se aprecia que los mejores resultados en cuanto a las tasas de embarazo se consiguen utilizando los incubadores con un menor porcentaje de oxígeno, sobre todo en aquellos con una proporción del 10% (Labotec), siendo esta diferencia significativa ($p < 0,05$) (26,7% MINC; 52,2% Labotec; 13% Heraeus).

La tasa de implantación no se vió afectada ni por el tipo de incubador utilizado ni por el día de descongelación. Sin embargo, la tasa de aborto en día 3 es superior a la encontrada en día 2, si bien no existen diferencias significativas entre los distintos tipos de incubadores debido posiblemente al bajo número de casos estudiados.

DISCUSIÓN

Hoy en día, en la mayoría de los laboratorios de Reproducción Asistida se emplean incubadores con una concentración de O₂ atmosférica (20%), aunque ya desde hace años se sabe que el desarrollo y la implantación embrionaria en el tracto reproductor femenino de numerosas especies animales tienen lugar bajo ciertas condiciones de hipoxia (entre el 2% y el 8% de O₂) (10; 11), lo que podría producir una mejora del desarrollo embrionario. Incluso se ha podido asociar a una reducción de la tasa de aneuploidias en embriones de ratón (12).

La mezcla de gases empleada en los incubadores es crítica para el mantenimiento del adecuado pH de los medios de cultivo que contienen bicarbonato como sistema tampón, siendo necesario para dicho propósito la presencia de dióxido de carbono (CO₂). Las mezclas de gases habitualmente más utilizadas para el cultivo embrionario son: 5% CO₂ en aire (20% O₂) y 5% CO₂, 5% O₂, y 90% nitrógeno (N₂). El efecto potencialmente negativo que ejercen los altos niveles de O₂ sobre los embriones podría deberse a la generación de radicales libres (O₂) (1), capaces de inducir daños tanto en la membrana plasmática como en las distintas estructuras celulares (13), así como a nivel del ADN (14), y/o alteración de la expresión genética (15). Este efecto deletéreo puede ser controlado mediante la adición de antioxidantes a los medios, o bien por la reducción de los niveles de oxígeno en los incubadores (16, 6). Sin embargo, la reducción de los niveles de oxígeno en el microentorno de los embriones puede resultar costoso debido a la necesidad de incubadores especiales que sean capaces de elaborar la mezcla gaseosa o bien que utilicen una específica.

Para conseguir bajos niveles de O₂ el incubador debe tener sensores de CO₂ y N₂, aunque lo habitual es que lo tenga solo de CO₂. El N₂ es usado inicialmente para que “evacue, expulse” el O₂ del incubador, lo cual hace que sean

TABLA 1

Resultados generales en los ciclos de transferencia de embriones descongelados según los niveles de oxígeno.

| | MINC 5% O2 | Labotec 10% O2 | Heraeus 20% O2 |
|---|-----------------------|---------------------------|---------------------------|
| Nº ciclos | 82 | 61 | 86 |
| Nº medio embriones descongelados | 182 | 136 | 201 |
| Nº medio embriones sobreviven | 162 | 118 | 179 |
| Tasa supervivencia | 89,00% | 86,00% | 89,00% |
| Total embriones transferidos | 162 | 117 | 179 |
| Embriones transferidos / ciclo | 1,9 | 1,9 | 2 |
| Tasa de embarazo | 26,80% | 32,70% | 23,20% |
| Tasa de implantación | 14,80% | 17,60% | 11,60% |
| Tasa de aborto | 22,70% | 20,00% | 15,00% |
| Tasa de embarazo múltiple | 9,10% | 5,00% | 5,00% |

TABLA 2

Resultados generales en los ciclos según los niveles de oxígeno y el día de cultivo en que se realiza la transferencia.

| Día +2 | MINC | Labotec | Heraeus | p |
|-----------------|-------------|----------------|----------------|----------|
| N | 52 | 38 | 63 | |
| Edad media | 33 | 31 | 31 | |
| T supervivencia | 92,52 | 92,57 | 91,93 | NS |
| T embarazo | 30,6 | 32,4 | 31,7 | NS |
| T aborto | 14,30% | 0,00% | 17,60% | NS |
| T implantación | 14,50% | 15,00% | 13,40% | NS |
| Día +3 | | | | |
| Día +3 | MINC | Labotec | Heraeus | p |
| N | 30 | 23 | 23 | |
| Edad media | 32 | 33 | 32 | |
| T supervivencia | 90,61 | 91,3 | 91,3 | NS |
| T embarazo | 26,7 | 52,2 | 13 | <0,05 |
| T aborto | 37,50% | 30,00% | 0,00% | NS |
| T implantación | 15,20% | 19,00% | 6,30% | NS |

necesarios 3 gases en la mezcla, que encarecerá el costo, a lo que contribuirá que cada vez que la mezcla tenga que ser re-equilibrada (p. ej. al abrir la puerta) sea necesaria una nueva inyección de N2 o de mezcla de gases para mantener

el nivel de O2 bajo. Una solución sería el uso de incubadores de “bajo volumen”, ej. tipo Cook, Planner...

Todos los estudios realizados hasta el momento se han hecho sobre embriones en fresco. Tan solo hemos encontrado

un estudio sobre el posible efecto de la concentración de O₂ en embriones descongelados (17), en el que se evaluó la tasa de formación de blastocistos tras la descongelación de embriones y su cultivo hasta mórula o blastocisto, viendo que esta fue más del doble en embriones cultivados al 5% de O₂. Pero no hemos encontrado ningún trabajo respecto a la tasa de embarazo en embriones descongelados. Algunos autores han encontrado diferencias en la tasa de embarazo de embriones transferidos en fresco incrementándose esta en el caso de embriones cultivados a bajas concentraciones de O₂ (8). En otros estudios, no se han encontrado diferencias significativas. Todos los trabajos publicados anteriormente han comparado condiciones de presión de O₂ de 20 %y de 5%. En nuestro caso hemos estudiado además la incubación al 10% de O₂.

En un trabajo de Kovacic 2010 (18), se vio que a pesar de que la calidad de los embriones y blastocistos obtenidos y transferidos fue significativamente mejor en bajas proporciones de O₂, las tasas de embarazo solo fueron levemente mas altas, sin embargo, cuando se tuvo en cuenta la tasa acumulada de embarazo (ciclo fresco+ciclos descongelaciones) se observo un incremento significativo con respecto a los ciclos de embriones cultivados a presión atmosférica de O₂.

En un trabajo recientemente publicado de Gomes et al (19) se hace una revisión de los trabajos publicados hasta el momento: se revisan 7 trabajos, y se comparan resultados entre dos grupos: cultivando al 5% y al 20% de O₂ atmosférico. En embriones transferidos en D+2 y D+3 de cultivo no se observan diferencias en cuanto a tasa de fecundación, implantación y embarazo viable. En embriones transferidos en D+5 de cultivo no se observan diferencias en las tasas de embarazo viable, pero si una mejor tasa de implantación en el grupo de embriones cultivados al 5 % de O₂.

En nuestro estudio no encontramos diferencias en la tasa de embarazo en el caso de embriones descongelados en día +2. Sin embargo, hemos encontrado diferencias significativas en la tasa de embarazo en embriones descongelados y transferidos en día +3 que han sido cultivados con bajas concentraciones de O₂, aunque el número de casos no es muy elevado. Esto podría deberse al mayor efecto ejercido por las especies reactivas del O₂ sobre los embriones en estadios de desarrollo previos a la formación del blastocisto, en las cuales parece que se incrementa la susceptibilidad a estas sustancias.

Es posible que la activación del genoma embrionario y, por lo tanto, la entrada en funcionamiento del embrión como tal, hasta ese momento soportado por el citoplasma ovocitario, sea crítico para el desarrollo posterior y que cualquier cambio en las condiciones de cultivo al cual se someta tenga una repercusión importante tanto en el desarrollo como

en la tasa de embarazo.

Los resultados obtenidos concuerdan con los descritos por otros autores con respecto a la mejoría de la tasa de embarazo en transferencias en fresco más allá de día +3, no observándose diferencias en embriones transferidos en día +2 ni en fresco ni en descongelados.

CONCLUSIONES

Si bien no observamos ningún efecto del porcentaje de oxígeno utilizado en el cultivo de embriones descongelados en día 2, si parece existir una mejora en la tasa de embarazo a bajas concentraciones de oxígeno cuando descongelamos embriones de día 3. Sin embargo serían necesarios nuevos estudios con una mayor casuística para poder verificar nuestros datos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M.: Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. *Free Radic Biol Med.* 1993;15(1):69-75.
2. Kovacic B, Vlaisavljević V.: Influence of atmospheric versus reduced oxygen concentration on development of human blastocysts in vitro: a prospective study on sibling oocytes. *Reprod Biomed Online* 2008; 17(2): 229-36.
3. Ciray HN, Aksoy T, Yaramanci K, Karayaka I, Bahceci M.: In vitro culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. *Fertil Steril* 2009; 91(4 Suppl):1459-61.
4. Kea B, Gebhardt J, Watt J, Westphal LM, Lathi RB, Milki AA, Behr B.: Effect of reduced oxygen concentrations on the outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2007; 87: 213-216.
5. Dumoulin JCM, Meijers CJJ, Bras M, Coonen E, Geraedts JPM, Evers JLH.: Effect of oxygen concentration on human in vitro fertilization and embryo culture. *Hum Reprod* 1999; 14: 465-469.
6. Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami AR, Bookout DM, Brian D. Barnett BD, Madden JD.: A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Human Reproduction* 2009; 24(2): 300-307.
7. Bavister B.: Oxygen concentration and preimplantation development. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 484-486.
8. Kemeter P and Lietz K.: IVF/ICSI with 5% O₂ in a Mini-Incubator compared with 21% O₂ in a conventional incubator. 2002. Publication by COOK.
9. Waldenström U, Engström A, Hellberg D, Nilsson S.: Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2009 ; 91(6): 2461-5.
10. Fischer B, Bavister BD.: Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil.* 1993; 99(2): 673-9.

-
11. Kaufman DL, Mitchell JA.: Intrauterine oxygen tension during the oestrous cycle in the hamster: patterns of change. *Comp Biochem Physiol Comp Physiol.* 1994; 107(4): 673-8.
 12. Bean CJ, Hassold TJ, Judis L, Hunt PA. Fertilization in vitro increases non-disjunction during early cleavage divisions in a mouse model system. *Hum. Reprod.* 2002; 17(9):2362-7.
 13. Kwon HC, Yang HW, Hwang KJ, Yoo JH, Kim MS, Lee CH, Ryu HS, Oh KS.: Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro. *J Obstet Gynaecol Res.* 1999 ; 25(5): 359-66.
 14. Iwata H, Minami N, Imai H.: Postnatal weight of calves derived from in vitro matured and in vitro fertilized embryos developed under various oxygen concentrations. *Reprod Fertil* 2000; 12: 391–396.
 15. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG.: Oxygen regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 2004; 71: 1108–1119.
 16. Fujiwara M, Takahashi K, Izuno M, Duan YR, Kazono M, Kimura F, Noda Y.: Effect of micro-environment maintenance on embryo culture after in-vitro fertilization: comparison of top-load mini incubator and conventional front-load incubator. *J Assist Reprod Genet.* 2007 ; 24(1): 5-9. Epub 2006 Dec 13.
 17. Petersen A, Mikkelsen AL, Lindenberg S.: The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2005; 84(12): 1181-4.
 18. Kovacic B, Sajko MC, Vlasisavljević V.: A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil Steril* 2010; 94(2): 511-9. Epub 2009 May
 19. Gomes Sobrinho DB, Oliveira JB, Petersen CG, Mauri AL, Silva LF, Massaro FC, Baruffi RL, Cavagna M, Franco JG Jr.: IVF/ICSI outcomes after culture of human embryos at low oxygen tension: a meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 1;9:143