

# TRANSFERENCIA EMBRIONARIA DÍA 3

Jornadas AVERMERE 2014  
Controversias en Reproducción  
**MONICA GIL COMERMA**

Robert Edwards  
Patrick Steptoe



Louise Brown



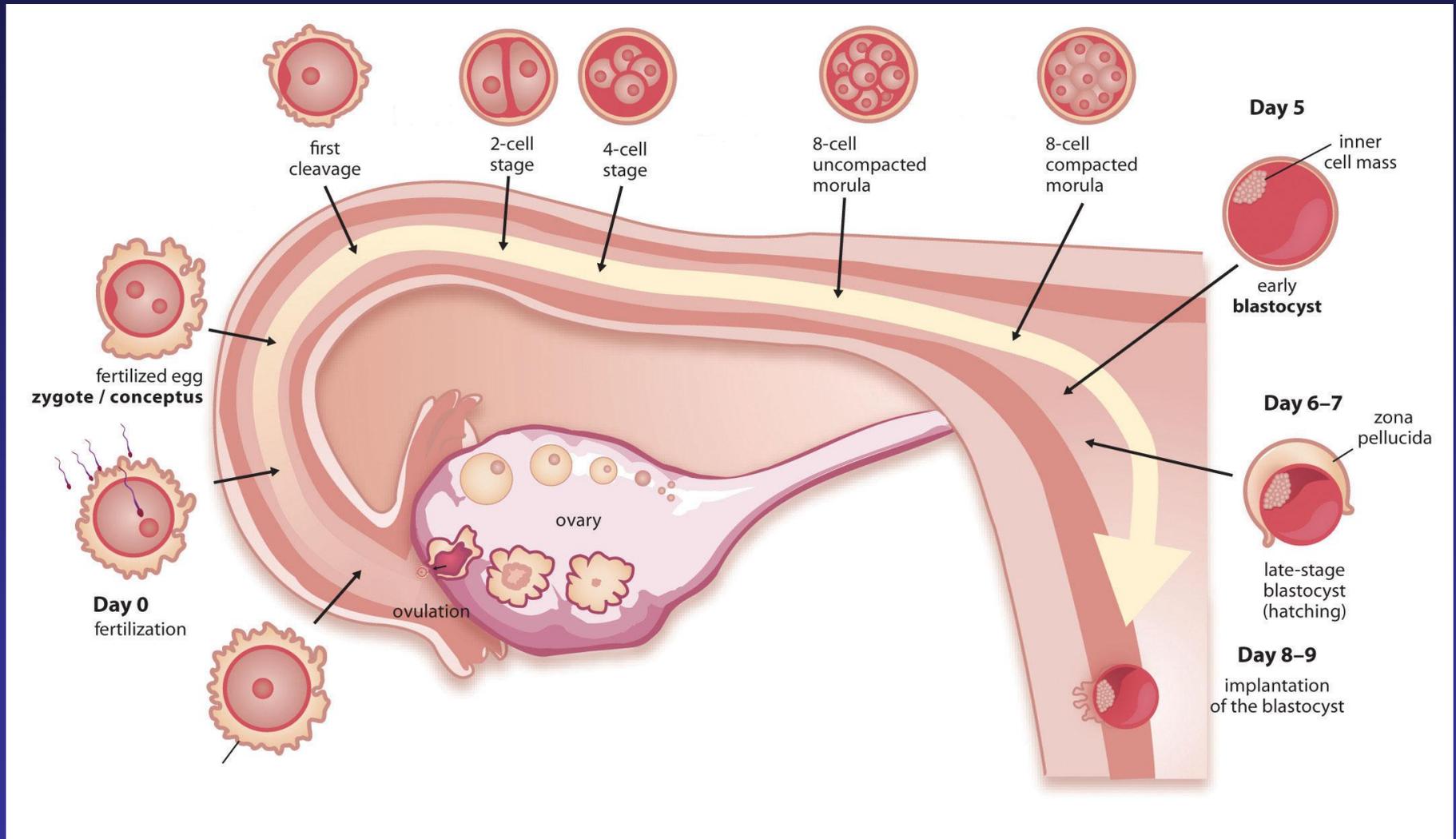
Waters 2006  
80' - 90' .... 20%  
94' - 2003 .... 40%

# FINALIDAD DE LA FIV

- Maximizar el potencial de embarazo de las pacientes
- Tener niños a término sanos y genéticamente normales
- Minimizar el riesgo de embarazos múltiples



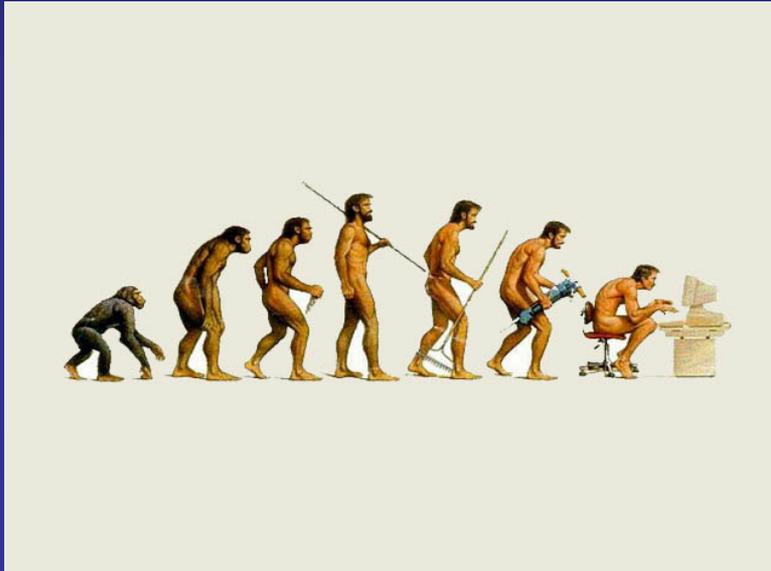
# DESARROLLO EMBRIONARIO



Embriones Día 2-3 / 4-8 Células

# CAMBIOS

- Protocolos de estimulación
- Cultivo celular
- Técnicas de congelación



Sincronización  
Selección

# CULTIVO CELULAR

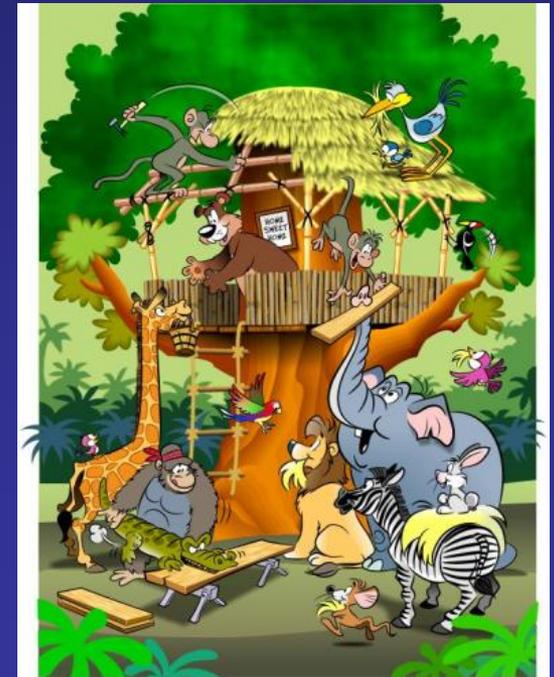
**AL EMPEZAR A TENER CONOCIMIENTO DE LOS REQUERIMIENTOS METABÓLICOS DEL EMBRIÓN, AVANZA EL MEDIO DE CULTIVO**

- **CO-CULTIVO:** desde el 88  
Menezo y col. 1990 ....Wiemer y col. 1998
- **MEDIO SECUENCIAL:** a finales de los 90'  
Menezo y col. 1998....Cook 1998, Gardner 1998.

Los Blastocistos tienen diferentes viabilidades

# OTROS FACTORES

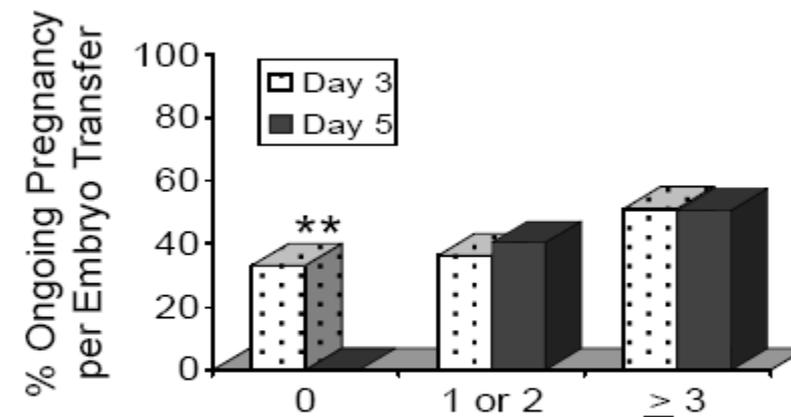
- Ambientes clínicos y de laboratorio
- Calidad de control del material descartable
- Criopresevación
- Volumen de las gotas de cultivo
- Mezclas de gas
- Incubadoras
- Cultivos en grupo
- Gameto masculino



# LOS EMBRIONES EN DÍA 3 PUEDEN LLEGAR IN VIVO A BLASTOCISTO PERO NO POR IN VITRO

Gardner y Schoolcraft 1998

Potential Downsides to Extended Culture  
*Is the Culture System as Good as the Uterus?*



\*\*  $P < 0.01$  Number  $\geq$  8-cell Embryos on Day 3

Conclusion: Day 5 ET decreases the chance of pregnancy  
in cases of poor day 3 embryo quality

Racowsky et al Fertil Steril '00

# SELECCIÓN EMBRIONARIA

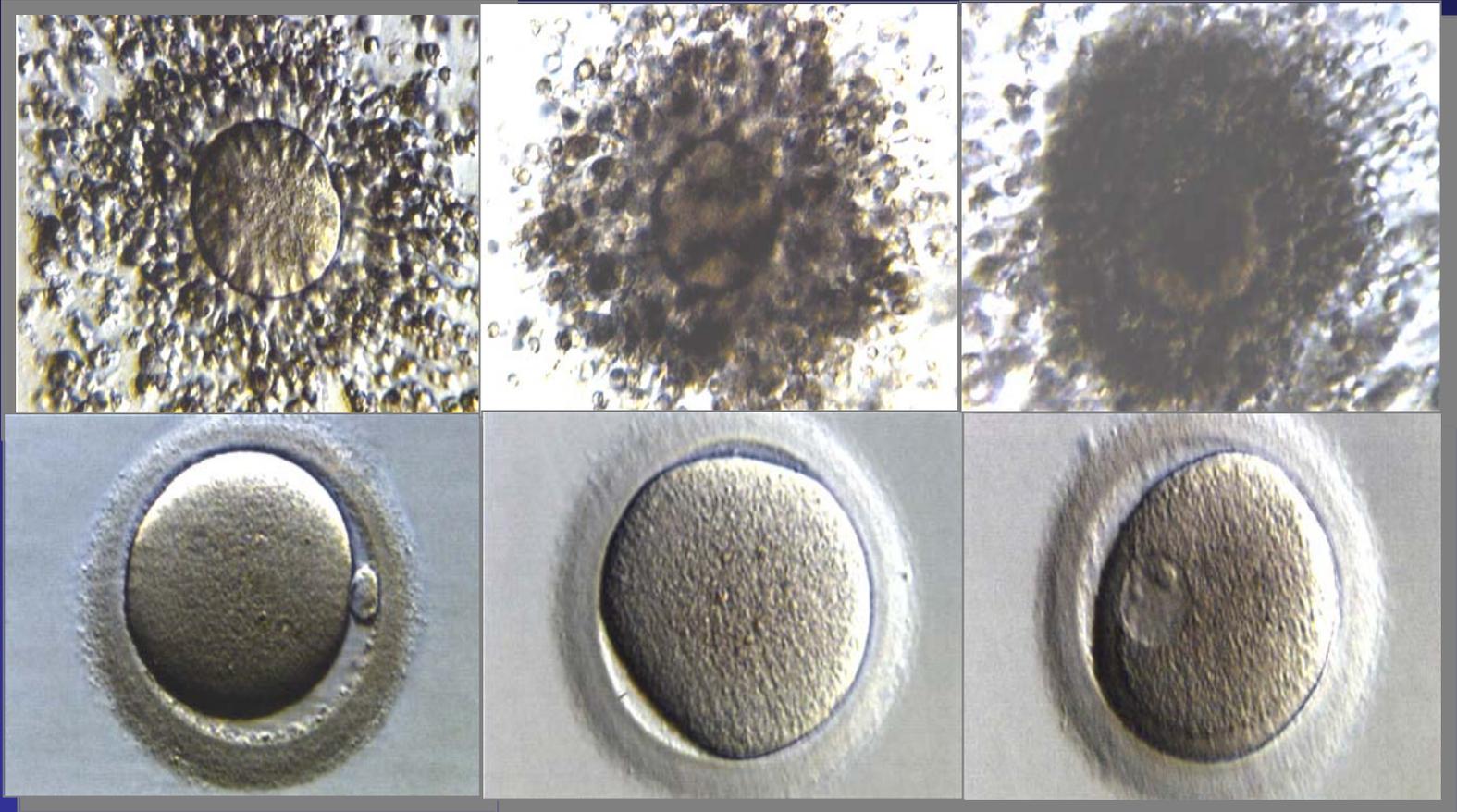
## FINALIDAD

- Reducir las tasas de embarazos múltiples
- Disminuir el número de embriones transferidos
- SET

## MANERA

- Valoración morfológica del embrión: número, tamaño y forma de las blastómeras, presencia de multinucleación, simetría y porcentaje de fragmentos
- Diagnósticos preimplantatorios
- Time lapse

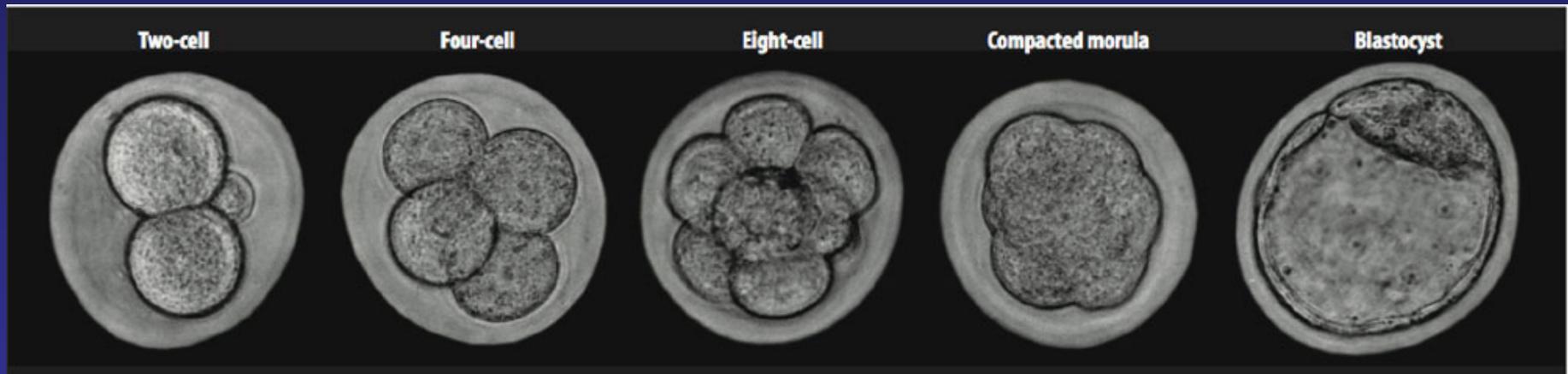
# CLASIFICACIÓN DE ÓVULOS



# FERTILIZACIÓN



# DESARROLLO EMBRIONARIO



# CONSENSO DE ISTANBUL

Human Reproduction, Vol.26, No.6 pp. 1270–1283, 2011

Advanced Access publication on April 18, 2011 doi:10.1093/humrep/der037

human  
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *ESHRE pages*

## The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting<sup>†</sup>

**Alpha Scientists in Reproductive Medicine and ESHRE Special  
Interest Group of Embryology**

Correspondence addresses. Basak Balaban, ALPHA Scientists in Reproductive Medicine, PO Box 754, CH-3076 Worb, Switzerland, E-mail: alpha2@bluewin.ch and M. Cristina Magli, ESHRE SIGE (Special Interest Group Embryology), Meerstraat 60, B-1852 Grimbergen (Belgium), E-mail: cristina.magli@sismer.it

Submitted on January 21, 2011; resubmitted on January 21, 2011; accepted on January 24, 2011

**BACKGROUND:** Many variations in oocyte and embryo grading make inter-laboratory comparisons extremely difficult. This paper reports the proceedings of an international consensus meeting on oocyte and embryo morphology assessment.

**METHODS:** Background presentations about current practice were given.

**RESULTS:** The expert panel developed a set of consensus points to define the minimum criteria for oocyte and embryo morphology assessment.

**CONCLUSIONS:** It is expected that the definition of common terminology and standardization of laboratory practice related to embryo morphology assessment will result in more effective comparisons of treatment outcomes. This document is intended to be referenced as a global consensus to allow standardized reporting of the minimum data set required for the accurate description of embryo development.

# CONCLUSIONES CONSENSO

## EMBRIONES EN DIVISIÓN

### NÚMERO DE CÉLULAS:

- 4 células día 2, 8 células día 3
- estadios de desarrollo esperados en horas post-inseminación
- rapidez de división celular

### FRAGMENTACIÓN:

- grados: leve (<10%), moderado (10-25%) severo (>25%)
- basado en equivalencia al tamaño de célula

### MULTINUCLEACIÓN:

- debe hacerse en día 2
- evaluación: binaria (presencia o ausencia)

### TAMANO DE LAS CÉLULAS:

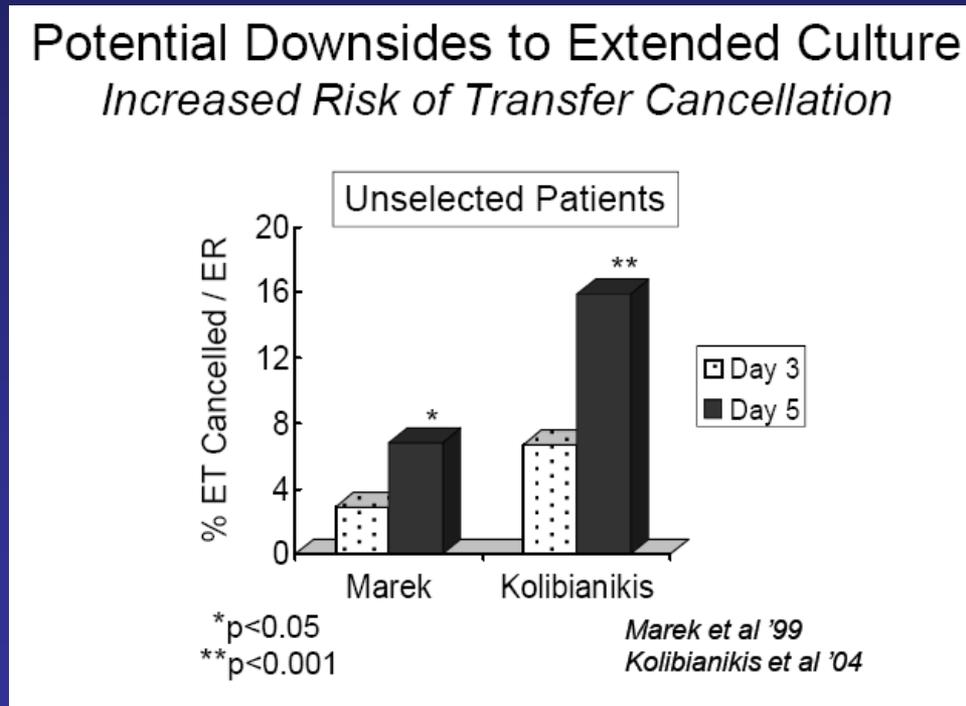
- evaluación: binaria ( simétricas o asimétricas)

### CLASIFICACIÓN:

- grado 1: < 10% fragmentos, sin multinucleación, simétricas
- grado 2: 10-25% fragmentos, sin multinucleación, la mayoría simétricas
- grado 3: >25% fragmentos, con multinucleación, asimétricas

# PROS

- 1.- Menor tasa de cancelación de transferencia en casos no seleccionados



RACOWSKY 2000

# PROS

- 2.- Mayores tasas de embarazo en pacientes de mal pronóstico

Aquellos que tienen embriones de baja calidad en día 3, o bajas respuestas en los ciclos de estimulación

# PROS

- 3.- Hay mayor tasa de congelación de embriones, lo que eventualmente se refleja en una mayor tasa de embarazo acumulado



# PROS

- 4.- Hay una menor incidencia de gemelos

## Potential Downsides to Extended Culture *Increased Risk of Monozygotic Twins*

	<u>Incidence of MZ Twins</u>		Fold Increased Risk
	Day 3	Day 5	
Rijnders et al '98	0.7%	2.7%	4.0
Milki et al '03	2.0%	5.6%	2.8
Da Costa et al '01	0.7%	3.9%	5.6
Wright et al '04	0.4%	1.5%	3.8
Behr et al '00	--	5.0%	n/a



# PROS

- 5.- La tasa a favor del sexo masculino no se ve alterada



# Controversia: gemelos - sexo

**Behr:** 2000 JARG Estudio multicéntrico 199 embarazos  
Incremento en la tasa de gemelos luego de la  
transferencia en blastocisto con hatching asistido.

**Papanikolaou:** 2010 dice que no hay diferencia en la  
tasa de gemelos día 5

Gemelos y Sexo Masculino podrian estar ligados a el  
medio de cultivo, el solo hecho del cultivo celular o a la  
selección morfológica

Algunos autores dicen que el desbalance se  
puede rectificar

# PROS

- 6.- No se perturba la expresión génica como en el cultivo extendido
- No hay evidencia clínica directa para FIV..Estudios en animales indican alteraciones en los cultivos extendidos
- Mayor riesgo de Beckwith Weidemann's y Angelman's (Maher et al '03; Debaun et al '03; Amor et al '08; Manipalviratn et al '09)
  - Estimulación ovárica
  - Sub-fertilidad de los padres
  - Medios de cultivo (Doherty et al '00; Khosla et al '01; Rivera et al '08)

# PROS

- 7.-El laboratorio no requiere de más espacio, incubadoras, tiempo del embriólogo, ni condiciones especiales de cultivo (como baja concentración de oxígeno para mejorar las tasas de implantación)

# PROS

- 8.- Hay disminución de bebés pre-término y malformaciones congénitas

# CONTRAS

- 1.- Desventaja con respecto a la receptividad Uterina

Antes de la compactación el embrión va a estar expuesto a concentraciones **de carbohidratos** (Gardner,D.K., Lane,M., Calderon,I., and Leeton,J. (1996) Fertil Steril. 65,349-353.) y **amino acidos** (Iritani,A., Nishikawa,Y., Gomes,W.R., and VanDemark,N.L. (1971) J Anim Sci. 33,829-835. Y Miller,J.G., Schultz,G.A. (1987) Biol Reprod. 36,125-129.) a los que no estarían normalmente expuestos.

Esta adaptación en fisiología y metabolismo le produce estrés al embrión

# CONTRAS

- 2.- No hay una reducción de las contracciones uterinas como en el día 5

Fanchin y Ayoubi 2009

# CONTRAS

- 3.- Hay una pequeña disminución en la selección de embriones con aneuploidías

No hay un aumento en el potencial de implantación de los blastos por auto-selección

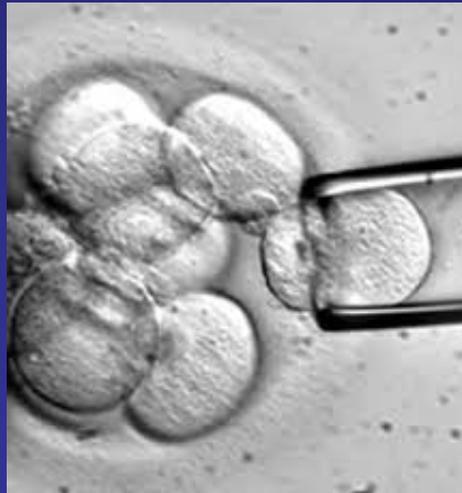
- Morfología normal..cromosomopatía
- 80-90 % de las fallas de implantación en día 3

# MÁS DE ANEUPLOIDÍAS

- En el día 3, 59% de los embriones de buena calidad fueron genéticamente anormales. En el día 5 solo el 35% (Staessen et al., 2004).
- Revisión de Muné (2005) - los embriones con trisomías alcanzan el estadio de blastocisto – Las aneuploidías no están relacionadas al dismorfismo de la división embrionaria – Las anomalías de las divisiones tempranas como mosaicismos, trisomias y poliploidias persisten en los blastocistos y no se pueden eliminar por completo con el cultivo extendido aunque algunas de ellas tienen efectos perjudiciales en el desarrollo embrionario

# CONTRAS

- 4.- El análisis genético está en desventaja por ser más invasivo y utilizar solo una célula para el diagnóstico



# PGS

1 de 8

Gleicher et al. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014, **12**:22  
<http://www.rbej.com/content/12/1/22>



REVIEW

Open Access

## Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review

Norbert Gleicher<sup>1,2\*</sup>, Vitaly A Kushnir<sup>1</sup> and David H Barad<sup>1,2</sup>

### Abstract

Only a few years ago the *American Society of Assisted Reproductive Medicine (ASRM)*, the *European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE)* and the *British Fertility Society* declared preimplantation genetic screening (PGS#1) ineffective in improving in vitro fertilization (IVF) pregnancy rates and in reducing miscarriage rates. A presumably upgraded form of the procedure (PGS#2) has recently been reintroduced, and is here assessed in a systematic review. PGS#2 in comparison to PGS#1 is characterized by: (i) trophectoderm biopsy on day 5/6 embryos in place of day-3 embryo biopsy; and (ii) fluorescence in-situ hybridization (FISH) of limited chromosome numbers is replaced by techniques, allowing aneuploidy assessments of all 24 chromosome pairs. Reviewing the literature, we were unable to identify properly conducted prospective clinical trials in which IVF outcomes were assessed based on "intent to treat". Whether PGS#2 improves IVF outcomes can, therefore, not be determined. Reassessments of data, alleged to support the efficacy of PGS#2, indeed, suggest the opposite. Like with PGS#1, the introduction of PGS#2 into unrestricted IVF practice again appears premature, and threatens to repeat the PGS#1 experience, when thousands of women experienced reductions in IVF pregnancy chances, while expecting improvements. PGS#2 is an unproven and still experimental procedure, which, until evidence suggests otherwise, should only be offered under study conditions, and with appropriate informed consents.

**Keywords:** Preimplantation genetic diagnosis (PGS), Assisted reproduction (ART), In vitro fertilization (IVF), Trophectoderm biopsy, Blastocyst stage embryo transfer

21,4% más aneuploidías d3.. Tasa de implantación menos 9,6%

# CONTRAS

- 5.- Hay más embarazos múltiples



# DÍA 2 VS DÍA 3

- Shen et al., 2006, retrospectivo en pacientes menores de 40 años (36), bajas respondedoras (a las que se les transfiere todo lo que tienen) Mejor día 2
- Bahceci et al., 2006, prospectivo randomizado (al final de la estimulación) en bajas respondedoras (menos de 5 folículos) de 36 años. Mejor día 2
- Shahine et al., 2011, prospectivo randomizado (en el momento de la fertilización), bajas respondedoras (pocos embriones para transferir). Igual día 2 que 3



## Transferencia de embriones al tercer día versus al segundo día después de la fertilización *in vitro* o la inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Oatway C, Gunby J, Daya S

Reproducción de una revisión Cochrane, traducida y publicada en *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2008, Número 2

### Conclusiones de los autores

Aunque se demostró un aumento de la tasa de embarazo clínico con la transferencia de embriones al tercer día, actualmente no existen pruebas suficientes de buena calidad que sugieran una mejoría en los nacidos vivos cuando la transferencia de embriones se demora desde el segundo al tercer día.

- Scholtes y Zeilmaker. Blastocyst transfer in day-5 embryo transfer **depends primarily on the number of oocytes retrieved** and not on age. Fertil Steril 1998;69:78–83.
- Racowsky y col. The **number of eight-cell embryos is the key** determinant for selecting day-3 or day-5 transfer. Fertil Steril 1999;73:558–64
- Plachot y col. 2000 Human Reproduction . Grupo de pacientes seleccionados con **buena respuesta** a la estimulación y **por lo menos 8 óvulos MII**
- Racowsky y col. 2000 pacientes con **más de 3 embriones en 8 células**. Pacientes jóvenes
- Takafumi Utsunomiya 2004 HR, cuya selección en día 3 es de **2 o más fertilizados**, y uno de sus criterios de **exclusión son las pobres respondedoras** ..y el criterio de inclusión del **día 5 son embriones haciendo hatching**. En su trabajo, la tasa de blastulación es de 35,4%, y la de hatching de 28,6%..

# Utsunomiya y col. 2004

**Table VIII.** Papers that compared the result of day 2/3 ET with day 5/6 ET

Author	Journal <sup>a</sup>	Year	No. of patients		Pregnancy rate (%)		Implantation rate (%)		Abortion rate (%)		Design
			Day 2/3	Day 5/6	Day 2/3	Day 5/6	Day 2/3	Day 5/6	Day 2/3	Day 5/6	
Gardner <i>et al.</i> , USA	HR	1998	47	45	66.0	71.0	37.0	55.4	–	–	Pro
Cruz <i>et al.</i> , USA	FS	1999	22	15	9.18	40.4*	3.4*	11.3*	–	–	Retro
Marek <i>et al.</i> , USA	FS	1999	463	292	47.5*	61.6*	23.3*	32.4*	10.6	14.7	Retro
Patton <i>et al.</i> , USA	FS	1999	86	30	31.0*	47.0*	17.0*	31.0*	–	–	Pro
Gardner <i>et al.</i> , USA	FS	2000	–	107	–	87.0	–	70.0	–	–	Retro
Hsieh <i>et al.</i> , Taiwan	JARG	2000	–	–	37.3	41.8	10.8	22.2	–	–	Retro
Milki <i>et al.</i> , USA	FS	2000	16	66	46.0*	68.0*	20.0*	47.0*	–	–	Retro
Schoolcraft and Gardner, USA	FS	2000	116	113	75.0*	87.6*	47.1*	65.8*	–	–	Retro
Abdelmassih <i>et al.</i> , Brazil	RBO	2001	296	154	34.8	45.3	11.5	18.5	–	–	Retro
Pantos <i>et al.</i> , Greece	CEOG	2001	427	228	23.6	42.1	8.6	19.4	–	–	Retro
VanLangendonck, Belgium	FS	2001	33.6	48.7	23.3	39.4	82.0	76.0	–	–	Pro
Kovavic <i>et al.</i> , Slovakia	FS	2002	133	132	22.9*	37.3*	17.8	34.3	26.6	14.3	Retro
VanderAuwera, Belgium	HR	2002	63	66	35.0*	60.0*	29.0	46.0	15.0	17.2	Pro
Wilson <i>et al.</i> , USA	FS	2002	419	570	48.0*	57.0*	27.0*	43.0*	12.0	9.0	Retro
Scholtes <i>et al.</i> , The Netherlands	FS	1996	233	410	26.0	25.0	13.0	12.0	–	–	Pro
Coskun <i>et al.</i> , Saudi Arabia	HR	2000	101	100	39.0	39.0	21.0	24.0	12.8	7.7	Pro
Huisman <i>et al.</i> , The Netherlands	FS	2000	590	709	25.3	27.8	14.4	15.5	3.6	5.7	Pro
Plachot <i>et al.</i> , France	HR	2000	–	–	41.7	38.8	18.9	24.1	–	–	Pro
Toledo <i>et al.</i> , USA	AJOG	2000	109	109	61.0	51.0	35.0	33.0	–	–	Retro
Yoon <i>et al.</i> , Korea	JARG	2001	1032	1952	34.9	36.1	16.1	16.4	–	–	Retro
Balaban <i>et al.</i> , Turkey	FS	2001	162	158	27.2	33.5	5.9*	15.0*	20.4	13.2	Pro
Karaki <i>et al.</i> , USA	FS	2002	82	80	26.0	29.0	13.0*	26.0*	–	–	Pro
Levron, Israel	FS	2002	44	46	45.5*	18.6*	38.7*	20.2*	–	–	Pro
Lundqvist, Sweden	AOGS	2002	103	120	26.0	30.0	–	–	22.0	55.0	Retro
Milki, USA	FS	2002	48	38	26.3	29.2	17.8	34.3	–	–	Retro
Rienzi, Italy	HR	2002	–	–	58.0	62.0	35.0	38.0	–	–	Pro
Zollner, Germany	ZG	2002	–	100	–	26.0	–	–	–	–	Pro
Utsunomiya, Japan	HR	2002	184	180	26.5	25.9	11.7	9.2	25.0	33.3	Pro

<sup>a</sup>HR = Human Reproduction; FS = Fertility and Sterility; JARG = Journal of Assisted Reproduction and Genetics; RBO = Reproductive Biomedicine Online; CEOG = Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology; AJOG = American Journal of Obstetrics and Gynecology; AOGS = Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica; ZG = Zentralblatt Gynäkologie.

Pro = prospective study; Retro = retrospective study.

\*Statistically significant difference.



# EVIDENCIA COCHRANE

- Primera publicación en la biblioteca de Cochrane fué en el **2000** con 10 trabajos. En el **2003** se agregaron 4 trabajos y se publicó en el HR. Luego se hace una actualización en el **2005** (7 trabajos fueron eliminados y 13 se agregaron). En la actualización del **2007** se agregaron 2 para hacer 18. En la del **2012** se le suman 5 trabajos para 23



## **Transferencia del embrión en el estadio de división versus estadio de blastocisto en la concepción asistida**

**Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M**

Reproducción de una revisión Cochrane, traducida y publicada en *La Biblioteca Cochrane Plus*, 2008, Número 2

### **Conclusiones de los autores**

Esta revisión aporta pruebas de que existe una diferencia significativa en las tasas de embarazo y de nacidos vivos a favor de la transferencia de blastocistos en pacientes con un buen pronóstico, con números elevados de embriones de ocho células en el día 3 que se ven más favorecidos en el subgrupo para el que no se observa ninguna diferencia en la interrupción del ciclo. Existen pruebas emergentes para sugerir que en los pacientes seleccionados, el cultivo de blastocistos puede ser posible para la transferencia de un solo embrión.

# Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology (Review)

Glujovsky D, Blake D, Farquhar C, Bardach A



**THE COCHRANE  
COLLABORATION®**

This is a reprint of a Cochrane review, prepared and maintained by The Cochrane Collaboration and published in *The Cochrane Library* 2012, Issue 7

<http://www.thecochranelibrary.com>

La finalidad del trabajo fué: determinar si la transferencia de blastocistos mejora la tasa de nacido vivo y otros aspectos asociados  
Demián Glujovsky, Debbie Blake, Ariel Bardach, Cindy Farquhar

# METODOLOGÍA

- La búsqueda fue hasta **Febrero 2012**. Solo se incluyeron trabajos **randomizados** y comparaban la efectividad de transferir en día 3 o 5 de desarrollo embrionario
  - Sin restricción de **lenguaje**.
  - Búsqueda inicial: **296** estudios, que cumplían los criterios de inclusión: **23 RCT** (+5 up dates)
- La revisión incluye **3823 parejas**. La mayoría de los trabajos se llevaron a cabo en menos de **6 meses**, con trabajos de **12 países**, edades entre 29 y 34 años, 18 trabajos usaron medios secuenciales
- Hubo 3 grupos: pacientes no seleccionadas – buen factor pronóstico – mal factor pronóstico (fallas repetidas de implantación o bajas respuestas)

# RESULTADOS

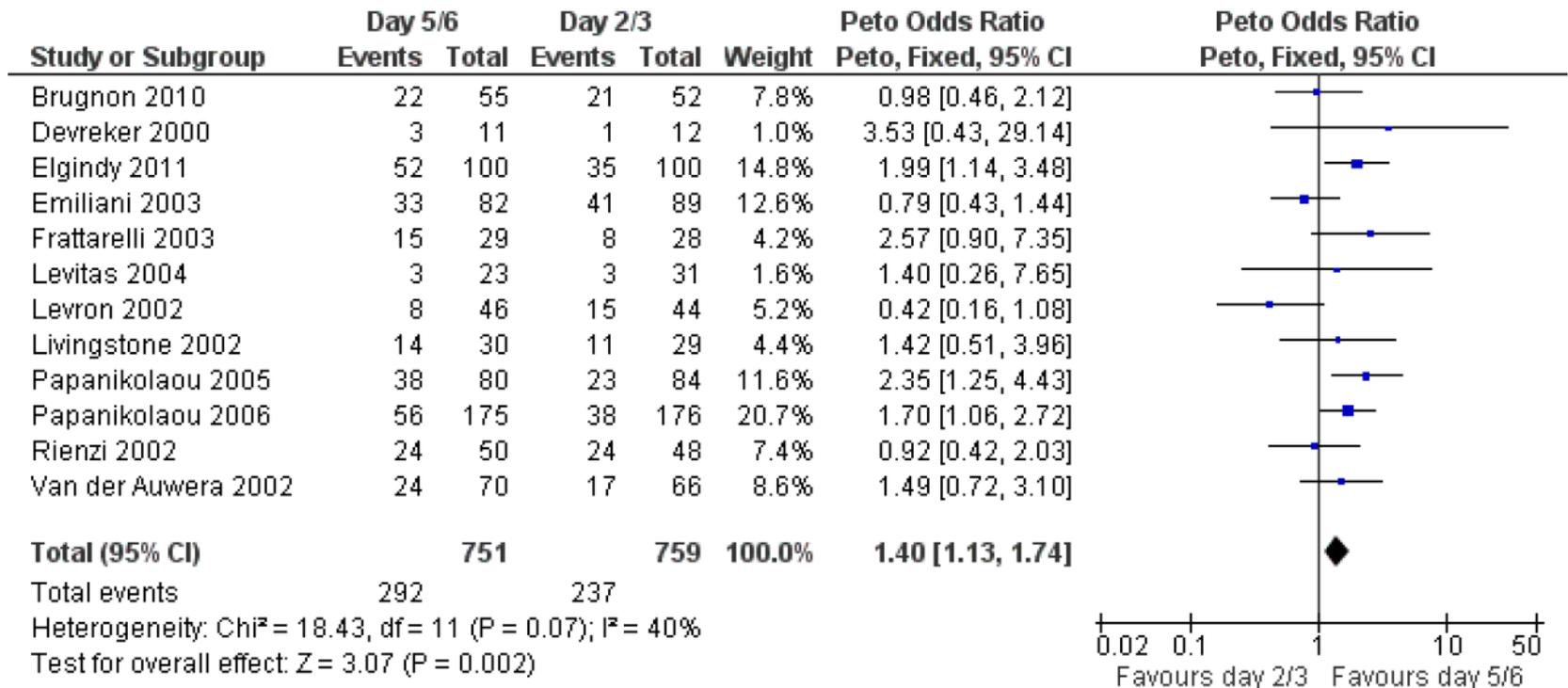
La medida de resultado primaria fue la tasa de nacidos vivos.

12/23 trabajos reportaron nacidos vivos, con evidencia de diferencia significativa a favor de la transferencia en blastocisto

Day 2 to 3: 31%; Day 5 to 6: 38.8%

# TASA DE NACIDOS VIVOS

Figure 3. Forest plot of comparison: I Live birth rate, outcome: I.I Live birth per couple.

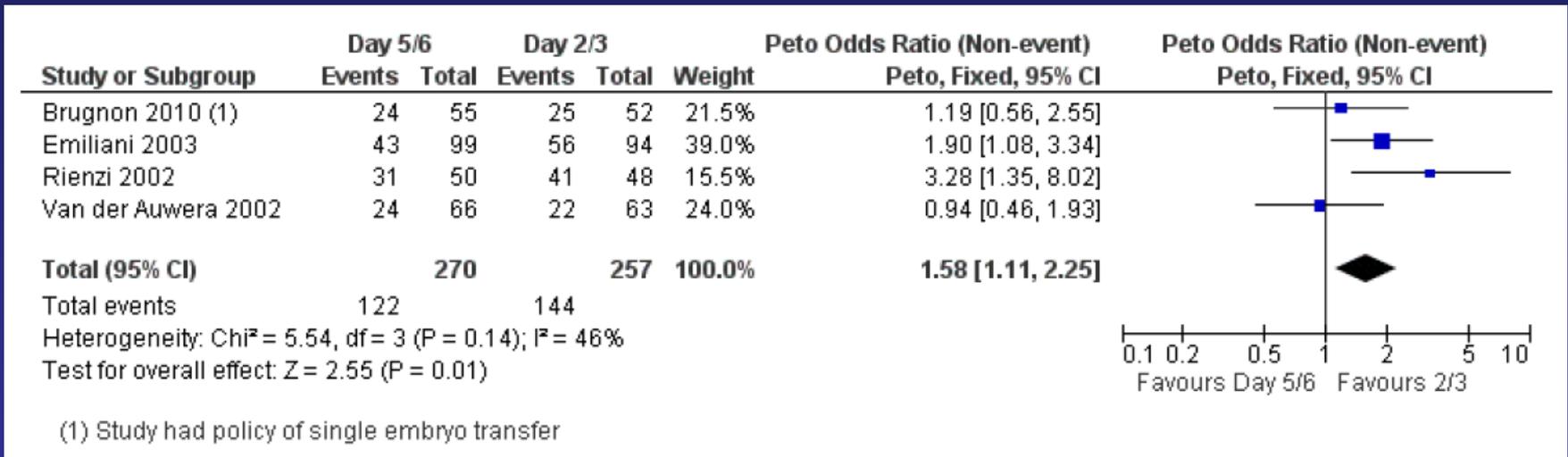


# RESULTADOS

## Las medidas de resultado secundarias

- Tasa de embarazo clínico por pareja 23/23 NS
  - Tasa de embarazo clínico acumulado 4/23
    - 56.8% d3 - 46.3% d5**
      - Embarazo múltiple 16/23 NS
      - Aborto espontáneo 14/23 NS
- Fracaso en la transferencia de embriones 16/23 ↑ d3
  - 3.4% d3 - 8.9% d5**
    - Criopreservación 11/23 ↑d3

# TASA DE EMBARAZO ACUMULADO



Glujovsky et al. 2012

# CONCLUSIONES

Esta revisión aporta evidencia de que existe una **pequeña pero significativa diferencia en las tasas de nacidos vivos a favor de la transferencia de blastocistos** (día 5 a 6) comparada con la transferencia en estadio de división (día 2 a 3). Sin embargo la **tasa de embarazo clínico acumulada de divididos** (derivada de ciclos frescos y congelados) resulto ser **más alta que para ciclos de blastocistos**. La explicación mas adecuada para esto son las mas altas tasas de **embriones congelados**, y las mas bajas tasas de **falla de transferencia** obtenidas de protocolos en estadio de división. Trabajos futuros deben reportar abortos, nacidos vivos y tasas de nacidos vivos acumulada para ofrecer un servicio que ayude a tomar decisiones bien informadas con respecto a la mejor opción de tratamiento disponible.

# CONCLUSIONES

- **No está claro el margen de beneficio** de la transferencia día 5 sobre día 3
  - Que la transfer de blastocistos parece ser una **buena opción para un subgrupo de pacientes** con una buena cantidad de embriones de buena calidad
  - Que pacientes a los que se les transfieren en **día 3** y se congelan los embriones restantes, tienen una **mayor tasa de embarazo acumulado**
- **La tasa de congelación y la tasa de falla de transferencia hablan a favor de la transfer en día 3**
- Los autores sugieren que los próximos trabajos deben reportar tasas de pérdidas, de embarazos acumulado e investigar en el criterio de inclusión para la selección embrionaria