

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Criotransferencia embrionaria en día 4 de cultivo frente a día 3. Resultados reproductivos, obstétricos y perinatales obtenidos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Isabel Calventus Periago

DIRECTORES

Marta Calvo Urrutia
Sara Rafael Fernández
Miguel Ángel Herráiz Martínez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

***CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN DÍA 4 DE CULTIVO FRENTE A
DÍA 3. RESULTADOS REPRODUCTIVOS, OBSTÉTRICOS Y PERINATALES
OBTENIDOS***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

D.^a María Isabel Calventus Periago

DIRECTOR

**Dra. D.^a Marta Calvo Urrutia, Dra. D.^a Sara Rafael Fernández, Prof. Dr. D.
Miguel Ángel Herráiz Martínez**

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Salud pública y Materno-Infantil



***CRIOTRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN DÍA 4 DE CULTIVO FRENTE A
DÍA 3. RESULTADOS REPRODUCTIVOS, OBSTÉTRICOS Y PERINATALES
OBTENIDOS***

**Memoria para optar al grado de doctor
presentada por
D.^a María Isabel Calventus Periago**

**Directoras: Dra. D.^a Marta Calvo Urrutia, Dra. D.^a Sara Rafael Fernández, Prof.
Dr. D. Miguel Ángel Herráiz Martínez**

Madrid, 2020

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber -Albert Einstein-

A Tomás, mi marido y gran impulsor de este trabajo.

A mis preciosas hijas Irene y Celia.

A mis padres, por transmitirme el amor a la ciencia y al estudio.

A mi hermana Gloria.

Agradecimientos

A Marta, por iniciarme en el camino del doctorado, por aprender diariamente de su buen trabajo y porque no olvido todo lo que ha hecho por mí en la esfera profesional y en la personal. A Sara, siempre dispuesta al avance científico de nuestra unidad, por sus inestimables aportaciones y consejos. Al profesor Miguel Ángel Herráiz, por el empuje científico incansable que ejerce sobre todos nosotros. A Manuel Fuentes, por las interminables horas que hemos pasado juntos frente al ordenador. A Nacho, por su generosidad y apoyo en este trabajo sin esperar nada a cambio. A Carmen Rodríguez, bibliotecaria de nuestro hospital, por preocuparse de enviarme cada nuevo artículo indexado. Al resto de mis compañer@s de la Unidad de Reproducción Humana Asistida del Hospital Universitario Clínico San Carlos de Madrid, por su dedicación y buena calidad asistencial diarias. A l@s pacientes, el principal estímulo de nuestro trabajo.

ABREVIATURAS

AEP: asociación española de pediatría

ASEBIR: asociación para el estudio de biología de la reproducción

Arrays CGH: array de hibridación genómica comparativa

BN: binucleada

CIR: crecimiento intrauterino restringido

CP: corpúsculo polar

CT: criotransferencia

DE: desviación estándar

DGP: diagnóstico genético preimplantacional

DPC: desproporción pélvico cefálica

E2: estradiol

EE: embarazo ectópico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EOC: estimulación ovárica controlada

FI: fracaso de inducción

FIV: fecundación in vitro

FSH: hormona folículo estimulante

GCP: gestación cronológicamente prolongada

GIE: grupo de interés de embriología

GnRh: hormona liberadora de gonadotropinas

hCG: gonadotropina coriónica humana

HLA: antígenos leucocitarios humanos

HMG: menotropina

ICMART: comité internacional para la monitorización de las técnicas de reproducción asistida

ICSI: microinyección espermática

KIR: receptores de células natural killer

MCI: masa celular interna

NPP: no progresión de parto

OMS: organización mundial de la salud

OR: odds ratio

PAPPA: proteína plasmática A asociada a la gestación

PE: parto eutócico

PEG: feto pequeño para edad gestacional

PGDIS: sociedad internacional de diagnóstico genético preimplantacional

PGT-A: test genético preimplantacional de aneuploidías

PI: parto instrumental

PN: pronúcleo

RIQ: rango intercuartílico

RR: riesgo relativo

SEF: sociedad española de fertilidad

SHO: síndrome de hiperestimulación ovárica

SPBF: sospecha de pérdida de bienestar fetal

RPM: rotura prematura de membranas

TE: transferencia embrionaria

TEF: transferencia embrionaria en fresco

TRA: técnicas de reproducción asistida

VAoGen: academia virtual de genética

ÍNDICE

RESUMEN.....	13
SUMMARY.....	20
1.INTRODUCCIÓN.....	27
1.1 Preámbulo.....	28
1.2 Técnica de la transferencia embrionaria.....	29
1.3 Elección del mejor momento para realizar la transferencia embrionaria.....	32
1.4 Cultivo hasta mórula-blastocisto.....	37
1.5 Selección embrionaria.....	39
1.5.1 Análisis morfológico tradicional.....	39
1.5.2 Análisis morfocinético.....	45
1.6 Hatching asistido.....	46
1.7 Diagnóstico genético.....	47
1.8 Transferencia embrionaria de embriones criopreservados.....	50
1.8.1 Resultados perinatales con embriones criopreservados.....	53
1.9 Receptividad endometrial.....	54
2. HIPÓTESIS.....	57
3. OBJETIVOS.....	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
4.1 Diseño del estudio.....	62

4.1.1 Tipo y ámbito del estudio.....	62
4.1.2 Descripción de la muestra de estudio.....	62
4.2 Criterios de inclusión.....	63
4.3 Ciclos de fecundación in vitro (FIV).....	63
4.3.1 Proceso de FIV.....	63
4.3.2 Proceso de vitrificación.....	64
4.3.3 Proceso de desvitrificación.....	65
4.4 Variables analizadas.....	66
4.4.1 Tipos de variables.....	66
4.5 Definición de variables.....	68
4.6 Cálculo de tasas.....	70
4.7 Análisis estadístico.....	71
5. RESULTADOS.....	73
5.1 Resultados Descriptivos del total de la muestra.....	74
5.1.1 Edad del total de pacientes incluidas en la muestra.....	74
5.1.2 Resultados reproductivos.....	74
5.1.3 Descriptivo de la patología obstétrica de la población de estudio.....	78
5.1.4 Descriptivo de la patología fetal de la población de estudio.....	78
5.1.5 Descriptivo de los datos perinatales de la población de estudio.....	79
5.2 Comparación día 3 frente a día 4.....	81
5.2.1 Comparación de los datos reproductivos entre ambos grupos de estudio	81
5.2.2 Factores pronósticos reproductivos.....	83
5.2.3 Comparativa de la patología obstétrica entre ambos grupos de estudio.....	84
5.2.4 Comparación de los datos perinatales entre ambos grupos de estudio.....	86

5.2.5 Comparación de la patología fetal entre ambos grupos de estudio.....	89
5.3. Tasas de resultados reproductivos y comparación entre ambos grupos.....	90
6. DISCUSIÓN.....	92
6.1 Cuestiones iniciales.....	93
6.2 Discusión de Resultados Reproductivos.....	95
6.3 Discusión de resultados obstétricos y perinatales.....	102
6.4 Limitaciones.....	105
6.5 Fortalezas.....	106
7. CONCLUSIONES.....	107
8. BIBLIOGRAFÍA.....	109
9. COMUNICACIONES EN CONGRESOS.....	122
10. ANEXO.....	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Calidad del total de los 1440 embriones transferidos.....	77
Figura 2. Comparación entre ambos grupos de estudio de los eventos obstétricos con mayor incidencia.	86
Figura 3. Comparación de los eventos perinatales más relevantes entre ambos grupos de estudio.....	88
Figura 4. Comparativa de los principales eventos analizados sobre patología fetal.....	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características embrionarias previas y posteriores a la compactación.....	37
Tabla 2. Clasificación de los embriones en día 2 y 3 de cultivo según calidades establecida por ASEBIR.....	41
Tabla 3. Clasificación de los embriones en día 4 de cultivo según calidad basada en criterios ASEBIR.....	44
Tabla 4. División de las variables entre cuantitativas y cualitativas.....	68
Tabla 5. Edad de las pacientes incluidas en la muestra.....	74
Tabla 6. Datos reproductivos analizados por transferencia	75
Tabla 7. Datos reproductivos analizados por embrión.....	76
Tabla 8. Datos reproductivos analizados por embarazo.....	77
Tabla 9. Descriptivo de la patología obstétrica de la población de estudio.....	78
Tabla 10. Patología fetal de la población de estudio.....	79
Tabla 11. Descriptivo de los datos perinatales de la población de estudio.....	80
Tabla 12. Comparación de los datos reproductivos entre ambos grupos de estudio...	82
Tabla 13. Factores pronósticos reproductivos..	83
Tabla 14. Comparativa de la patología obstétrica entre ambos grupos de estudio.....	84
Tabla 15. Comparativa de los datos perinatales entre ambos grupos de estudio.....	87
Tabla 16. Comparativa de la patología fetal entre ambos grupos de estudio.....	89
Tabla 17. Comparativa de tasas entre día 3 y día 4.....	91

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Decidir el mejor momento para realizar la transferencia embrionaria (TE) ha sido y sigue siendo un tema controvertido (1). Las transferencias embrionarias realizadas en día 3 y 5 de cultivo han sido estudiadas ampliamente, sin embargo, no ocurre igual con el día 4 (2). La TE en día 4 está escasamente referenciada en la literatura y la principal causa de ello, es que los parámetros morfológicos establecidos para la selección embrionaria de las mórulas presentan mayor variabilidad interobservador y son más difíciles de valorar desde el punto de vista de la embriología clínica (3)(4).

Los embriones en día 4 cuentan con un día adicional de cultivo in vitro con respecto al día 3, un día más de observación y evaluación que permite al embriólogo realizar una mejor selección embrionaria. Los embriones que alcanzan la fase de mórula han superado los hitos de activación del genoma y compactación, ambos considerados puntos críticos en la evolución embrionaria (4).

Otras ventajas asociadas a la TE de día 4 son: permitir aumentar la flexibilidad en la elección del día de la transferencia (5), transferir en un momento más fisiológico y de menor contractilidad uterina (6) y a la vez contar con un menor período de tiempo in vitro (en comparación con el día 5) lo cual, podría reducir el riesgo de alteraciones genéticas/epigenéticas, malformaciones fetales, gemelos monocigóticos (7) y recién nacido pretérmino, desventajas todas ellas asociadas a la TE de blastocistos (8)(9).

OBJETIVOS

El objetivo principal de nuestro trabajo ha sido determinar si existen diferencias en cuanto a la tasa de implantación y a la tasa de embarazo clínico obtenidas en los ciclos de criotransferencia embrionaria realizados en día 4 de cultivo frente a día 3 en nuestro centro.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio es observacional, analítico, de cohortes y retrospectivo. Se realizó una revisión de las criotransferencias embrionarias realizadas en día 3 y 4 de cultivo embrionario entre el 1 de enero del 2011 y el 30 de junio del 2016. El total de estas transferencias embrionarias han sido realizadas en la Unidad de Reproducción Asistida del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, España. Se establecen dos grupos de estudio según el estadio de desarrollo embrionario en el que se realiza la criotransferencia. El primer grupo lo forman transferencias de embriones en día 3 de cultivo (419) y el segundo transferencias de embriones en día 4 (431). El hecho de elegir realizar la transferencia en uno u otro día se debe a razones organizativas de la unidad de reproducción.

En caso de conseguirse gestación evolutiva se compararon resultados reproductivos, obstétricos y perinatales entre ambos grupos de estudio. Este estudio se diseñó según las normas de Buena Práctica Clínica y fue aprobado por el Comité de Ética del centro. La técnica de congelación embrionaria fue la vitrificación en todos los casos.

Análisis estadístico

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de Ji-cuadrado. En el caso de que más de un 25 % de los valores esperados fueran menores de 5, las variables cualitativas se evaluaron con la prueba exacta de Fisher. La comparación de las variables continuas que mostraron una distribución normal se realizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Para las variables que no se ajustaron a una distribución normal se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Se comparó la incidencia de las variables de resultado dicotómicas (patologías obstétricas, perinatales y fetales) entre los dos grupos de estudio mediante el test de Ji-cuadrado. El efecto se evaluó mediante el cálculo del Riesgo Relativo (RR) junto a su intervalo de confianza al 95 %. Se emplearon modelos de regresión ajustados para aquellas variables que no mostraron una distribución homogénea entre los dos grupos ($p < 0.20$) y/o fueron clínicamente relevantes. Para la obtención de los RR ajustados se empleó un modelo de regresión logística-binomial.

Para las diferentes tasas calculadas como variables de resultado se estimaron las tasas agrupadas en cada uno de los grupos de estudio, así como la razón de tasas bruta junto a su intervalo de confianza al 95%. Posteriormente, con el objetivo de obtener tasas ajustadas por edad, se empleó el método de Mantel-Haenszel para la obtención de tasas ajustadas por los siguientes estratos de edad: menores de 34, entre 34 y 38 y mayores o igual a 38 años.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0 y STATA 12.

RESULTADOS

En cuanto a los factores pronósticos reproductivos “edad” y “calidad embrionaria”, existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En el estrato de pacientes menores de 34 años encontramos un porcentaje de pacientes claramente superior en el grupo de día 3 frente a día 4 (37,2 % vs. 26,7 %) así como en el grupo de pacientes mayores o iguales a 38 años encontramos que un 32,7% fueron transferidas en día 4 vs. un 28,6% que lo fueron en día 3. También existen diferencias significativas entre las medias de edad de ambos grupos de estudio, las pacientes son 0.52 años mayores en el grupo de día 4.

Respecto a la calidad embrionaria, si nos basamos en la clasificación ASEBIR y consideramos embriones de buena calidad a aquellos con calidad A y/o B, encontramos que el porcentaje de embriones transferidos de buena calidad en el grupo de día 3 es de 46,85 mientras que en el grupo de día 4 es de 32,20 ($p < 0,001$). Se objetiva por tanto una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio. Los embriones transferidos en día 3 son de mayor calidad que los transferidos en día 4.

Con respecto a la comparativa entre ambos grupos de las tasas analizadas, destacamos por ser objetivo principal del presente estudio, que la tasa de implantación es un 18%, ($p = 0,16$) superior en día 4 con respecto a día 3 y que la tasa de embarazo clínico es un 16% ($p = 0,19$) superior en el grupo de día 4 frente al de día 3.

Si bien es cierto que en cuanto a la comparativa de las tasas analizadas ninguno de los datos obtenidos alcanza la significación estadística, pero se objetiva una tendencia a encontrar resultados más favorables en el grupo de día 4.

En cuanto a la comparativa de la patología obstétrica y fetal entre ambos grupos de estudio, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas entre ambos grupos, por lo que se pueden considerar similares desde el punto de vista obstétrico.

Desde el punto de vista perinatal la comparación de los dos grupos de estudio establece que no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las variables comparadas, por lo que se pueden considerar grupos homogéneos en este aspecto.

DISCUSIÓN

Aunque en la literatura la TE de día 4 está descrita desde 1994 es una práctica poco utilizada en la rutina clínica diaria en los ciclos de FIV (2) (10) (11). La bibliografía existente sobre TE en estadio de mórula aunque escasa, avala los resultados encontrados en nuestro estudio y demuestra que la transferencia en día 4 es más beneficiosa que en día 3 y presenta mayores tasas de implantación y de embarazo clínico (12) (13).

No obstante, en este trabajo no pretendemos afirmar que la TE en día 4 es la mejor de todas las opciones posibles de transferencia, pero sí, que es una alternativa válida a tener en cuenta.

En 1994 Huisman et al. (11) compararon en un estudio retrospectivo la transferencia de embriones en día 2, 3 y 4 de cultivo. En sus resultados muestran una tasa de implantación claramente mayor en el grupo de día 4, al igual que ocurre en nuestro estudio, pero en nuestro caso, sin alcanzar la significación estadística (0,22 vs. 0,19, $p=0,16$).

En el año 2000 Huisman et al. (14) publicaron los resultados de un estudio prospectivo en el que se incluían pacientes con TE en día 3, 4 y 5 de cultivo. Las tasas de implantación fueron similares en los tres grupos (14,4 %, 14,7 % y 15,5 % respectivamente), resultado que estaría en consonancia con los datos obtenidos en nuestro trabajo.

Posteriormente, en un estudio retrospectivo (3) que incluía 242 TE en día 4 y 97 en día 3 se concluía que la tasa de implantación era significativamente mayor en el grupo de día 4. Sus resultados, además, mostraban que el número necesario de embriones a

transferir era claramente menor en día 4 que en día 3, debido a la mejor selección embrionaria de las mórulas en base a sus criterios morfológicos, lo que favorecía la realización de transferencia de embrión único y por ende, disminuía la tasa de gestación múltiple. En nuestro caso la tasa de gestación múltiple es similar entre ambos grupos (0,11 % vs. 0,13 %, $p= 1,14$).

Margreiter et al. (15) publicaron un estudio prospectivo estableciendo 2 grupos (estadio de células, días 2 y 3 y cultivo largo días 4 y 5 de vida embrionaria). Concluye con una diferencia estadísticamente significativa que la tasa de embarazo clínico es mayor en el grupo de TE en días 4 y 5 (30,4 % vs. 50 %). En nuestro caso, la tasa de embarazo clínico no muestra una superioridad desde el punto de vista estadístico en día 4 frente a día 3, pero si se observa que es superior en un 16%.

En 2006 Montag et al. (16) publicaron un estudio prospectivo y aleatorizado que incluía 79 TE en día 3, 76 en día 4 y 79 en día 5. Los resultados en el grupo de día 4 fueron comparables con los de días 3 y 5, con la excepción de la tasa de implantación, que fue significativamente más baja en día 4 comparada con la de día 3 (27,6 % vs. 41,8 %, $p < 0,05$). La tasa de implantación en nuestro estudio es un 18 % superior en día 4 con respecto a día 3, dato que no alcanza la significación estadística aunque sí muestra una tendencia favorable.

Otros trabajos, (7) (10) (13) (17) comparan de forma tanto retrospectiva como prospectiva la TE en día 4 con la de día 3 y encuentran resultados totalmente en consonancia con los obtenidos en el presente estudio, en el que tanto la tasa de implantación, como la de embarazo clínico y la de gestación múltiple fueron superiores en día 4 con respecto a día 3 pero sin alcanzar la significación estadística.

En marzo de 2019 M. Simopoulo et al. (18) publicaron el mayor y más reciente metaanálisis con respecto a la transferencia de embriones en día 4 y presenta resultados reproductivos y perinatales resultantes de comparar la transferencia de día 4 con día 2, día 3 y día 5 respectivamente.

Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de embarazo clínico y la tasa de aborto clínico en ninguna de las comparaciones realizadas. Los resultados del metaanálisis estarían en consonancia con

los del presente estudio, ya que tampoco objetivamos diferencias en ambos grupos de estudio en lo referente a las tasas de embarazo clínico y de aborto del primer trimestre.

No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en los resultados obstétricos y perinatales obtenidos en las gestaciones y partos procedentes de transferir en día 3 o en día 4, por lo que el hecho de mantener en cultivo un día más a los embriones no ha modificado el curso de los embarazos ni la finalización de los mismos.

Los estudios que publican resultados perinatales de gestaciones conseguidas tras transferencias de día 4, en general incluyen a este día junto a los días 2 y 3 y los comparan con los obtenidos en días 5 y 6. De hecho la mayoría de los artículos encuentra una mayor tasa de parto prematuro (por debajo de la semana 37) en el estadio de blastocisto (días 5 y 6) en comparación con el estadio de células al que añaden al día 4 (19)(20)(21)(18).

Limitaciones

El tamaño muestral con el que hemos trabajado, si bien no es bajo (n= 850 transferencias embrionarias), puede considerarse discreto en relación con el gran número de variables estudiadas, lo cual incrementa la dificultad del análisis estadístico. Los datos perdidos a lo largo del estudio principalmente en lo que se refiere a variables obstétricas y perinatales suponen otra limitación.

Fortalezas

El presente estudio muestra nuestra experiencia y resultados transfiriendo embriones en día 4 de cultivo, práctica poco habitual en los ciclos de fecundación in vitro y motivo que justifica la escasez de literatura científica al respecto. Este estudio supone una aportación en esta línea. Otra fortaleza de este trabajo es que es uno de los pocos trabajos que publica resultados perinatales de gestaciones conseguidas tras TE en día 4 de cultivo embrionario y los compara con el día 3.

CONCLUSIONES

Los resultados reproductivos obtenidos en el presente estudio son equiparables en los dos grupos de análisis establecidos, criotransferencia embrionaria en día 3 y en día 4 de cultivo. Las tasas de implantación y embarazo clínico obtenidas en el grupo de transferencia embrionaria en día 4 muestran una tendencia favorable con respecto al día 3. Los resultados obtenidos en cuanto a prevalencia de patología obstétrica, fetal y resultados perinatales han sido similares en ambos grupos de estudio. La transferencia embrionaria en día 4 de cultivo puede considerarse una buena opción con resultados al menos iguales a los obtenidos en día 3. Es necesaria la realización de estudios prospectivos que profundicen en la transferencia embrionaria de mórulas, que avalen estos resultados y permitan la sistematización de la transferencia embrionaria en día 4 en la práctica clínica habitual.

SUMMARY

INTRODUCTION

Still the best moment to proceed with the embryo transfer remains a controversial topic. Day 3 and day 5 embryo transfers (ET) have been widely studied, in contrast to day 4 transfers. Day 4 ET has been barely referenced in literature, and this is mainly because the morphological parameters established for the selection of morula embryo are hard to evaluate due to interobserver variability and the subjectivity of the embryologist.

An additional day of observation and evaluation allows to better select the embryos in comparison to day 3. Those embryos becoming morula have overcome the milestones of genome activation and compaction, which are deemed to be critical points in the embryo evolution.

Other day 4 ET- related advantages are as follows: to allow for an increase of flexibility to choose transfer day, to transfer in a more physiological moment with less uterine contractility, and a shorter in vitro period of time could reduce the risk of epigenetic/genetic alterations, fetal malformations, monozygotic twins and preterm newborn, which are all disadvantages related to blastocyst ET.

OBJECTIVES

The main objective of our research was to determine if there is any difference as to the implantation rate and the clinical pregnancy rate obtained from the embryo cryotransfer cycles done on day 4 of culture, against those done on day 3 in our center.

MATERIAL AND METHODS

This work is an observational, analytical, cohort and retrospective study. A full review was performed on those embryo cryotransfers done on day 3 and day 4 of embryo culture, between the 1st of January of 2011 and the 30th of June of 2016. The total number of these embryo transfers has been conducted in the Assisted Reproduction Unit of the Gynecology and Obstetrics Service at the Hospital Clínico San Carlos in Madrid, Spain. Depending on the stage of embryonic development when the cryotransfer takes place, two study groups are established. The first group does include embryo transfers on day 3 of culture (419), and the second group does include embryo transfers on day 4 (431).

In case of evolutionary gestation, the reproductive, obstetric, and perinatal results were compared. This study was designed according to the principles of Good Clinical Practice, and it was approved by the Ethics Committee of the center. The procedure of embryo freezing was vitrification in all the cases.

The following table shows the total number of collected variables, distinguishing between qualitative and quantitative variables:

Statistical analysis

The Chi-square test was used to evaluate the association among qualitative variables. When more than 25% of the expected values were less than 5, qualitative variables were evaluated with Fisher's Exact test. The comparison of continuous variables showing a normal distribution was performed through Student's t-test for independent samples. For those variables not fitting normal distribution, the nonparametric Mann-Whitney U test was applied.

The impact of dichotomous outcome variables (obstetric, perinatal and fetal pathologies) on both study groups was compared through the Chi-square test. The effect was assessed through relative risk (RR) calculation with its confidence interval at 95% level. Fitted regression models were used for those variables not showing a homogeneous distribution between both groups ($p < 0.20$) and/or clinically irrelevant. A logistic-binomial regression model was implemented to obtain the fitted RR.

For the different rates, calculated as outcome variables, they were estimated for each study group, and also the gross rate ratio along with its confidence interval at 95% level. Subsequently, with the objective of achieving fitted rates by age, the Mantel-Haenszel

method was applied to obtain fitted rates for the following age stratum: under 34, between 34 and 38, and above or equal 38 years old.

In every hypothesis contrast, null hypothesis was rejected with a type I error or less than 0.05. Statistical package SPSS 15.0 and STATA 12 was utilized for the analysis.

RESULTS

Reproductive prognostic factors: age and embryo quality:

There are statistically significant differences between the different age categories in both groups. In the under-34 patient stratum, it is found a percentage which is clearly higher for day 3 group against day 4 (37.2% vs. 26.7%), and in the above or equal 38 patient group, 32.7% is found to have been transferred on day 4 vs. 28.6% on day 3.

There also exist significant differences between average age in both groups, patients are 0.52 years older in day 4 group.

Comparison of reproductive data between both study groups:

Based on ASEBIR classification, those embryos having quality A and/or B are considered good-quality embryos. The percentage of good-quality embryos transferred in day 3 group is 46.85 whereas in day 4 group it is 32.20 ($p < 0,001$).

Between both study groups a statistically significant difference is objectified. Embryos transferred on day 3 are better quality than those transferred on day 4.

Comparison of obstetric pathology between both study groups:

No statistically significant differences were observed in any of the variables analyzed for both groups, therefore they can be considered to be similar from an obstetric point of view.

Comparison of perinatal data between both study groups:

No statistically significant differences were observed in the perinatal variables compared between both study groups, therefore they can be considered to be homogeneous groups.

Comparison of fetal pathology between both study groups:

In summary, regarding the fetal pathology in both study groups, no statistically significant differences were observed, therefore they can be considered to be comparable.

Comparison of rates between day 3 and day 4.

It should be pointed out that implantation rate is 18% ($p= 0,16$) higher on day 4 in comparison to day 3, and clinical pregnancy rate is 16% ($p= 0,19$) higher in day 4 group in contrast with day 3.

None of the results reaches statistical significance. In the rates analyzed in this study, it objectifies a trend to find more favorable results in day 4 group.

DISCUSSION

Although day 4 ET has been widely described in literature since 1994, it is actually an infrequent practice in daily clinical routine in IVF cycles.

The existing bibliography on ET in morula stage endorses the results found in our study which show that day 4 transfer is more beneficial than on day 3, indicating higher implantation and clinical pregnancy rates.

However in this work we do not attempt to prove that day 4 ET is the best possible transfer option, but to highlight it is a valid alternative to be considered.

In 1994 Huisman et al. compared embryo transfers on day 2, 3 and 4 of culture as part of a retrospective study. Evolutionary pregnancy rate was the same but implantation rate was definitely higher in day 4 group, as in our study, but not reaching statistical significance (0.22 vs. 0.19, $p=0.16$).

In 2000 Huisman et al. published the results of a prospective study which included patients with ET on day 3, 4 and 5. Implantation rates were similar in the three groups (14.4%, 14.7%, and 15.5%, respectively). These findings would be in line with the data obtained from our study.

Afterwards a retrospective study, which included 242 ET on day 4 and 97 on day 3, determined that implantation rates were significantly greater in day 4 group. Its results also showed that the necessary number of embryos to be transferred was clearly lower on day 4 than on day 3. This can be explained because of a better embryo selection of morula, based on morphological criteria. In our research, multiple gestation rate is similar in both groups (0.11% vs. 0.13%, $p=1.14$).

Margreiter et al. published a prospective study which defined 2 groups (cell stage, days 2 and 3, and prolonged culture days 4 and 5). This work concluded that clinical pregnancy rate is higher in day 4 and 5 ET groups (30.4% vs. 50%), with a statistically significant difference.

In 2006 Montag et al. released a prospective and randomized study which included 79 ET on day 3, 76 on day 4, and 79 on day 5. In day 4 group, the results were similar to those from day 3, with the exception of implantation rate which was significantly lower on day 4 in contrast with day 3 (27.6% vs. 41.8%, $p < 0.05$). In our study, implantation rate is 18% greater on day 4 in comparison to day 3, not reaching statistical significance but showing a positive trend.

Other works compare ET on day 4 with ET on day 3 from a retrospective and prospective point of view. The results of those studies are consistent with the findings of our work, in which implantation, clinical pregnancy and multiple gestation rates were higher on day 4 than on day 3, though not reaching statistical significance. Our results are in the same line since comparing ET on day 3 against day 4, implantation rate (19% vs. 22%, $p=0.16$), gestation rate (32% vs. 34%, $p=0.58$), clinical gestation rate (32% vs. 37%, $p=0.19$), and embryo survival rate (94% vs. 95%, $p=0.71$) were found to be alike. Indeed the results in all the rates were slightly higher on day 4 in contrast with day 3, but not reaching statistical significance.

No statistically significant differences were found in obstetric and perinatal results obtained from gestations and deliveries after day 3 or day 4 transfers. Consequently, the fact of prolonging cultures one additional day did not modify the pregnancy process nor pregnancy completion.

Studies that publish perinatal results of pregnancies achieved after transfers on day 4, generally include this day together with days 2 and 3 and compare them with those obtained on days 5 and 6. In fact, most articles find a higher Preterm delivery rate (below week 37) in the blastocyst stage (days 5 and 6) compared to the cell stage added to on day 4 (19) (20) (21) (18).

Limitations

Despite the sample size being not low (n=850 embryo transfers), it could be considered to be discreet in relation to the great number of variables analyzed, and this fact makes statistical analysis more difficult. An additional limitation might be the data loss experienced during this study, which was basically related to obstetric and perinatal variables.

Strengths

This research unveils our experience and results by transferring embryos on day 4 of culture, an infrequent practice in in vitro fertilization cycles, which is the main reason for the scarcity of scientific literature on this topic. Indeed this study entails a contribution in this regard. Another strong point of this work is that this is one of the few researches showing perinatal results from gestations after day 4 and compares them with day 3.

CONCLUSIONS

The reproductive results obtained in this study are similar in both analysis groups, embryo cryotransfer on day 3 and day 4 of culture. The implantation rate and clinical pregnancy rate obtained on day 4 ET group show a favorable trend in contrast with day 3. Regarding the prevalence of obstetric and fetal pathology and perinatal results, our findings are similar in both study groups. Day 4 embryo transfer can be considered to be a good option, as it had at least similar results to day 3. It is necessary to conduct prospective studies delving into morula embryo transfers, which support these findings and allow for systematization of day 4 embryo transfers in clinical routine practice.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Preámbulo

Las técnicas de reproducción asistida (TRA) han favorecido el nacimiento de más de 5 millones de niños en el mundo, dato obtenido del comité internacional para la monitorización de las TRA (ICMART). Concretamente en España han nacido 33.640 niños según el último registro, del año 2017, de la Sociedad española de fertilidad (SEF) (22), siendo el país europeo donde más técnicas de reproducción asistida se realizan. Entre los hechos que lo motivan encontramos que España cuenta con una de las leyes más avanzadas en materia de reproducción asistida y, por otro lado, es de los países en los que la mujer llega a tener su primer hijo con mayor edad (más de 32 años de media). La baja tasa de natalidad en nuestro país está dando lugar a un problema socio-demográfico cada vez más acuciante. Es una necesidad que los gobiernos tomen decisiones y apliquen medidas que colaboren al aumento de la natalidad con objeto de detener la progresiva inversión de nuestra pirámide poblacional. Entre estas medidas las TRA tendrán seguro un papel protagonista. Con todo ello se pretende explicar cómo la reproducción humana asistida y las TRA, principalmente la fecundación in vitro (FIV) han tenido en las últimas décadas, tienen y tendrán aún más en un futuro inmediato, un importante auge.

En las siguientes líneas profundizaremos en la transferencia embrionaria (TE), acto culmen del complejo proceso que supone un tratamiento de FIV y tema principal de estudio de esta tesis doctoral.

La transferencia embrionaria (TE) es la intervención que permite el contacto entre el endometrio y el preembrión, haciendo posible la implantación de éste y el establecimiento de una gestación. Para ello, es necesario que el potencial biológico del preembrión sea adecuado, que el endometrio sea receptivo y que la intervención sea técnicamente correcta. En la especie humana, la fecundación tiene lugar en el tercio distal de la trompa y el producto de la fecundación debe ser transportado a lo largo de ésta hasta la cavidad uterina. Por tanto, la formación del preembrión y, por ende, el desarrollo del blastocisto, tienen lugar en la trompa.

El transporte es el resultado de la interacción entre el preembrión y el endosálpinx, y en este proceso parecen jugar un papel los esteroides sexuales, las prostaglandinas y el factor activador de las plaquetas. Inmediatamente después de la fecundación, de la que resulta un ovocito fecundado con dos pronúcleos, se producen una serie de divisiones mitóticas que dan lugar al blastocisto. Analizando la cronología del desarrollo in vitro de preembriones humanos, se evidencia que el estadio de dos células se alcanza a las 28 horas, el de cuatro a las 43 horas y el de ocho células a las 54 horas de la fecundación. Así mismo, la compactación se inicia en el estadio de 16 células y la formación del blastocisto se inicia entre los días 4 y 5 posfecundación (23).

A lo largo de los años se han realizado estudios retrospectivos y prospectivos destinados a analizar la conveniencia de realizar la transferencia en uno u otro plazo pospunción, lo que supone un mayor o menor grado de desarrollo embrionario. Es importante señalar que, en la especie humana, el embrión de 4 a 8 células se encuentra sistemáticamente en la trompa y que sólo va a penetrar en el útero después de la compactación. Según esto, cuando la transferencia se hace en el día 2 o 3, el embrión llega a la cavidad endometrial con 3 o 4 días de adelanto con respecto a la reproducción natural y ello podría tener como consecuencia una merma de las posibilidades de implantación (13).

Como se ha señalado, fisiológicamente el preembrión alcanza la cavidad uterina cuando se han iniciado la compactación y la expresión del genoma embrionario. En consecuencia, al menos desde un punto de vista teórico, puede aceptarse que la capacidad embrionaria para implantar es mayor cuando el preembrión alcanza un mayor grado de desarrollo, siempre que las condiciones del cultivo in vitro sean las adecuadas y no supongan un deterioro de esta capacidad.

Harper et al (24). informaron que en los mamíferos el embrión migra a la cavidad uterina unos 3-4 días después de la fecundación por lo que la TE en fase de mórula estaría más sincronizada con los procesos reproductivos que las TE realizadas en día 3.

1.2 Técnica de la transferencia embrionaria

La transferencia embrionaria es el último acto del complicado proceso de la FIV. Clásicamente se ha postulado que la meticulosidad en la transferencia embrionaria es esencial en el éxito del tratamiento. Sin embargo, la transferencia embrionaria no ha

evolucionado de forma paralela al resto de procedimientos que se siguen en un ciclo de FIV.

Sigue existiendo una gran diferencia entre el número de embriones transferidos y las gestaciones conseguidas. Obtener tasas de implantación en torno al 20-30 % es considerado normal en un tratamiento de FIV. Esta discrepancia se ha atribuido fundamentalmente a anomalías cromosómicas de los embriones, a alteraciones en la receptividad endometrial (se ha objetivado que hasta un 25 % de los fallos recurrentes de implantación son causa de un factor endometrial (25)) y a factores mecánicos. Entre estos factores mecánicos se encuentran: la rapidez con la que se realiza la TE (cuanto más corta mejores resultados), la dificultad en canalizar el cérvix y el grado de repleción vesical.

Para la realización de la transferencia embrionaria se coloca a la paciente en posición de litotomía. Tras especuloscopia para visualizar el cérvix uterino se procede a la limpieza cervical. Se puede eliminar el moco cervical con la ayuda de una jeringuilla, con torundas bañadas en suero fisiológico o con medio de cultivo. La realización de una ecografía abdominal permitirá conocer la posición del útero, la angulación del cérvix, la longitud de la cavidad endometrial y las características del endometrio. La vejiga debe presentar una repleción correcta, se debe evitar la urgencia miccional que sólo aumenta las contracciones uterinas y disminuye por tanto la tasa de gestación.

Existen varios tipos de catéter de transferencia. Pueden utilizarse con los embriones precargados o sin precargar. El ginecólogo introduce el catéter a través del orificio cervical externo y llegado al punto deseado para el depósito embrionario, se procede a descargarlos suavemente con la ayuda de una jeringa. Posteriormente, se retira cuidadosamente el catéter y se examina al microscopio para confirmar su vacuidad. En caso de reflujo embrionario se repetirá el proceso. La paciente permanecerá en reposo en decúbito supino unos 10 minutos.

En la literatura se han estudiado diferentes factores que pueden influir en el resultado de la transferencia embrionaria:

- Transferencia ecoguiada: la transferencia embrionaria clásica se realizaba a ciegas mediante un procedimiento basado en las sensaciones táctiles y la experiencia del operador. En 1997 Woolcott RC et al (26). publican que la transferencia guiada por ecografía podría mejorar sus resultados. La transferencia únicamente basada en el tacto se acompaña con frecuencia de lesiones endometriales y de toques inadvertidos del

fondo uterino. Por otro lado, en ningún estudio se demuestran efectos adversos de la ecografía sobre las tasas de embarazo o de implantación. La mayoría de trabajos se refieren a ecografía abdominal en 2 dimensiones.

El mecanismo por el que la transferencia embrionaria ecoguiada mejora las tasas de embarazo e implantación no ha sido exactamente determinado. Se ha atribuido a la confirmación de que la punta del catéter está dentro de la cavidad uterina y al conocimiento de la distancia entre el catéter y el fondo del útero. También se consigue evitar tocar el fondo uterino y la disminución de la incidencia de sangre en el catéter. Las transferencias ecoguiadas permiten estandarizar los procedimientos entre diferentes operadores y comprobar la correcta repleción vesical.

Un metaanálisis de 18 trabajos sobre 5.959 casos concluye que se obtienen mejores resultados reproductivos con transferencias ecoguiadas, por lo que existe una fuerte evidencia científica a su favor (27).

- Reposo postransferencia embrionaria: la práctica clásica de recomendar hasta 24 horas de reposo como medida favorecedora de la implantación embrionaria se ha ido modificando con el paso de tiempo y en la actualidad indicamos un período de reposo de aproximadamente 10-20 minutos.

Dos estudios prospectivos y aleatorizados comparan el reposo de 24 horas postransferencia con la movilización precoz (28). Comparan un grupo de pacientes con reposo de 24 horas y un grupo con reposo de 20 minutos postransferencia. No existieron diferencias en las tasas de implantación (24,1 vs 23,6 %), ni en las de aborto (19 vs 18,1 %) entre ambos grupos.

Otro estudio (29), analiza la comparación de un grupo con 24 horas de reposo postransferencia con uno de 1 hora. Las tasas de embarazo clínico (21,5 vs 18,2 %) fueron similares para ambos grupos mientras que la tasa de implantación fue significativamente mayor para el grupo con reposo de una hora (14,4 vs 9 %).

Aunque la evidencia es limitada y son necesarios estudios más amplios, se puede aceptar que el reposo superior a 20 minutos no mejora los resultados reproductivos.

- Tipo de Catéter: la influencia del catéter en el éxito de la transferencia embrionaria, podría estar condicionada por su diseño (doble luz, guía de inserción, forma de la punta, etc.) por los materiales empleados (metálicos, plásticos duros o blandos etc.) y su maleabilidad.

Los catéteres rígidos y maleables facilitan el paso de la curvatura del canal cervical, pero se han asociado a una mayor posibilidad de traumatismo, sangrado y aumento de las contracciones uterinas. Los catéteres blandos disminuirían estos riesgos, pero su inserción podría ser más difícil.

Con respecto al impacto de los distintos tipos de catéteres sobre la tasa de embarazo, encontramos estudios heterogéneos que no arrojan conclusiones definitivas.

Los resultados de 6 trabajos que comprenden 2894 pacientes y comparan catéteres blandos y rígidos objetivan que la tasa de implantación era claramente superior con catéteres blandos, por lo que se acepta que los catéteres blandos se asocian con mejores resultados reproductivos (30).

- Situación del catéter en la cavidad uterina: los resultados de los estudios sobre la situación de la punta del catéter en la cavidad uterina han sido discordantes. La transferencia ecoguiada ha permitido realizar la transferencia embrionaria en el punto seleccionado de la cavidad endometrial y medir sus resultados.

Se han utilizado diferentes criterios, algunos utilizan como medida la distancia entre la punta del catéter y el fondo de la cavidad endometrial y otros consideran más importante una “distancia relativa” en la que se valora la distancia entre la punta del catéter y el fondo de la cavidad endometrial en relación a la longitud total de dicha cavidad.

Aún teniendo en cuenta la disparidad de criterios parece existir una coincidencia en que la transferencia realizada en el segmento medio de la cavidad uterina se acompaña de mejores tasas de implantación y de embarazo (31) (32).

1.3 Elección del mejor momento para realizar la transferencia embrionaria

Decidir el mejor momento para realizar la transferencia embrionaria ha sido y sigue siendo un tema controvertido que alberga muchas dudas. Para ponernos en antecedentes, el primer embarazo documentado procedente de FIV tras TE de blastocisto fue descrito en 1995 por Edwards et al. (33), hasta ese momento la TE en estadio de células era la práctica estándar. No se contaba con medios de cultivo sofisticados que permitieran el cultivo largo y además en los embriones humanos se había observado la capacidad de sobrevivir una vez que se transferían al útero materno, aunque fuera de forma prematura como es el caso del día 2 y día 3 de cultivo. En

condiciones in vivo el embrión en estadio de células se encuentra en la trompa de Falopio.

En los últimos años de la década de los 90, con el conocimiento progresivo de los distintos requerimientos metabólicos en cada estadio de desarrollo embrionario, surgen los medios de cultivo secuenciales. Esto permitió llevar a cabo el cultivo largo o cultivo prolongado.

En día 2 y 3 de desarrollo el embrión sufre sus primeras divisiones, en estos momentos, el potencial del embrión depende principalmente de la calidad del ovocito. A partir del día 3, el embrión tiene su propia entidad y se produce la activación de su genoma. Esto da lugar a un proceso de autoselección, por lo que muchos embriones quedan detenidos en este estadio debido a anomalías cromosómicas. Esto producirá una disminución de la proporción de blastocistos cromosómicamente anormales.

Básicamente, el cultivo largo en sí mismo es ya un proceso de selección. Por tanto, los embriones que llegan a estadio de blastocisto han demostrado mayor potencial de implantación. Cuentan con un genoma funcional que les permite continuar su ritmo de divisiones hasta llegar a conformar una mórula compactada y la posterior diferenciación entre masa celular interna y trofoectodermo.

Las mejoras en los sistemas de cultivo implican un incremento en el porcentaje de embriones que alcanzan la etapa de blastocisto, de hecho, la tasa de blastulación es uno de los parámetros que mide el buen funcionamiento de un laboratorio de embriología.

Un dato llamativo es que, en mujeres mayores de 36 años, el 60 % de los embriones de “muy buena” calidad que se transfieren en día 3 presentan anomalías cromosómicas, mientras que en día 5 ese porcentaje se reduce al 35 % (34)(35).

En la era de la morfocinética embrionaria, somos capaces de estudiar el desarrollo del embrión en profundidad y correlacionar dichos cambios morfocinéticos con la ploidía. Hay evidencia de que la expansión del blastocisto y la eclosión del mismo están correlacionados con el potencial de implantación (36), así como con la euploidía embrionaria (37). Algunos autores sostienen que el screening genético preimplantacional demuestra que los embriones aneuploides llevan un ritmo de división más lento, aunque el grado de evidencia de esta asociación no es fuerte (38).

Comentaremos a continuación las ventajas y desventajas de la realización de cultivo prolongado.

Ventajas de la realización de cultivo prolongado:

- Los embriones presentan mayor correlación de su estatus morfológico con su estatus genético, lo que permite una mejor selección del embrión con más potencial de implantación. De hecho, estudios recientes muestran que la morfología embrionaria en estadio de células (día 2 y día 3) no guarda relación con la morfología que se objetiva en estadio de blastocisto, por lo que un embrión de muy buena calidad en día 3 no es predictor de un blastocisto de iguales características (39). Otro estudio compara la tasa evolutiva de embarazo en día 3 usando un sistema de time-lapse para la selección embrionaria frente a día 5 usando estrictamente criterios morfológicos para la selección y encuentran que ésta es mayor en día 5 (40).
- Mejor sincronización con el endometrio receptor. La ventana de implantación del endometrio es limitada. Si conseguimos aproximar las dos partes, el estadio embrionario y la receptividad endometrial, incrementaremos las tasas de implantación del embrión.
- Más fisiológico, puesto que los embriones en condiciones in vivo alcanzan la cavidad uterina e implantan en estadio de blastocisto.
- Necesidad de transferir menos embriones, es decir, mayor tendencia a la transferencia de embrión único (41)(42).
- Realizando cultivo prolongado se minimiza la exposición embrionaria a un ambiente endometrial con concentraciones hormonales suprafisiológicas (en el caso de TE en fresco) (43).
- Se minimizan las contracciones uterinas y disminuye la tasa de gestación ectópica en comparación con día 3 (44).
- Tras la activación del genoma embrionario el sistema de apoptosis y los puntos de control celular se activan. Esto da lugar a una reducción del mosaicismo en los embriones de día 4 y en los blastocistos (2).
- Ventajas en la realización de biopsias embrionarias: en primer lugar, solo se biopsiarán los embriones que alcanzan la fase de blastocisto. En segundo lugar, al biopsiar células del trofoectodermo, podemos obtener mayor número de células sin comprometer la viabilidad del embrión. En día 3 sólo se puede biopsiar una célula, como mucho dos, mientras que en día 5 pueden biopsiarse 4 o 5 células, por lo que se obtendrá mayor fiabilidad en el diagnóstico realizado.

Desventajas de la realización de cultivo prolongado:

- Detención embrionaria “In vitro”: las condiciones de cultivo in vitro, aunque sofisticadas no se pueden comparar con las condiciones del útero materno, la pregunta que cabría realizarse es si por mantener a los embriones en cultivo más tiempo existe mayor probabilidad de bloqueo de los mismos. La respuesta a esta pregunta depende en gran medida del tipo de laboratorio de embriología. En general se considera satisfactoria una tasa de blastulación (porcentaje de ovocitos fecundados que alcanza la fase de blastocisto) de entre el 40-60% (45).
- Mayor tasa de TE canceladas, con la consiguiente frustración que supone para los pacientes.
- Menor tasa de criopreservación embrionaria (23) (24).
- Mayor coste, ya que supone mayor inversión en recursos materiales y humanos. Se deben tener en cuenta el trabajo de fines de semana de biólogos, de ginecólogos y la necesidad de iniciar más ciclos de estimulación ovárica con sus consiguientes punciones ováricas. Los pocos estudios de coste-efectividad que existen, muestran, que aunque la tasa de recién nacido vivo es mayor en día 5, la diferencia con día 3 no es estadísticamente significativa, por tanto la TE en día 3 se postula como una opción más económica que obtiene resultados aceptables (5) (46).
- Mayor tasa de gemelos monozigóticos (42).
- Alteración de la proporción de sexos a favor de los hombres (47).
- Mayor relación con las alteraciones epigenéticas: Las alteraciones epigenéticas se podrían definir como un cambio en la estructura química del ADN que no altera su secuencia de codificación. Una persona presenta alteraciones epigenéticas cuando se añaden o se eliminan del ADN grupos químicos llamados grupos metilo, o cuando hay cambios en las proteínas (histonas) que se unen al ADN en los cromosomas. Es posible que estos cambios aparezcan con la edad y/o con la exposición a factores ambientales, como la alimentación, el ejercicio, los medicamentos y las sustancias químicas. Estos cambios modifican el riesgo de padecer determinadas enfermedades y pueden heredarse de padres a hijos.

La evidencia actual apoya que las alteraciones epigenéticas influyen en el proceso de crecimiento intrauterino desde el estadio de blastocisto hasta los primeros años de vida. Ejercen una fuerte influencia en el riesgo de padecer futuras enfermedades crónicas, y dicha influencia en muchos casos puede ser mayor que la propia carga genética del paciente.

Como ya se ha descrito, las TE en día 3 y 5 han sido ampliamente estudiadas y comparadas entre sí, no ocurre lo mismo con el día 4. La transferencia embrionaria en día 4 está escasamente referenciada en la literatura, la principal causa de ello es que los parámetros morfológicos establecidos para la selección embrionaria de las mórulas son más difíciles de valorar, y existe mayor variabilidad interobservador, así como mayor influencia del componente subjetivo del embriólogo. La fisiología de la mórula es más compleja de delimitar que la de los otros dos estadios, ya que transferir mórulas supone una opción fuera del estadio de células y fuera del estadio de blastocisto. La mórula puede representarse como una masa borrosa de células lo que supone un verdadero desafío para el embriólogo a la hora de clasificarlas (4). El estadio de embrión compactado se caracteriza por una intensa síntesis de ADN que permite las divisiones celulares y por otro lado se describen también el fenómeno de las contracciones embrionarias que irán dirigidas a aumentar el volumen del embrión y a prepararlo para la diferenciación celular. Las blastómeras pierden esfericidad y las uniones intercelulares se modifican con la expresión de distintas moléculas, como la E-cadherina, que permiten enlaces más íntimos entre ellas. Por todo ello la demanda metabólica del embrión mórula es más exigente que el requerido en el estadio de células (18).

La TE en día 4 fue descrita por primera vez en 1994. Tao et al. (6) compararon retrospectivamente las TE de día 3 con las de día 4 en una población no aleatorizada y donde clasificaron a todos los embriones de “óptimos” en cuanto a su calidad. Mostraron que los embriones en fase de mórula permitían realizar una mejor selección que los embriones de etapas anteriores, así como una mejor sincronización endometrio receptivo-embrión y redujeron significativamente el número de embriones necesarios a transferir. De acuerdo con los resultados obtenidos el día 4 logró una mayor tasa de implantación en comparación con el día 3, estadísticamente significativa (46,4 vs. 21,4 %, $p < 0,01$).

Gianaroli et al. (48) obtuvieron resultados exitosos de embarazo con TE en día 4 después de diagnóstico genético de preimplantacional. Los autores postulan que un día adicional de observación y evaluación permite seleccionar mejor a los embriones en comparación con el día 3, sin algunos de los riesgos potenciales asociados con las transferencias de blastocistos (49).

Otros artículos más recientes han demostrado la correlación existente entre la morfología de los embriones compactados y las tasas de implantación (50)(51), así

como la relación existente entre la morfología de la mórula y su capacidad para la formación de blastocistos (6) (3).

El objetivo presente y futuro dentro de las técnicas de reproducción asistida es conseguir gestaciones únicas y la manera de evitar el aumento en la tasa de embarazos múltiples es transferir un único embrión a la mayoría de las pacientes. Para lograr este objetivo, la selección del embrión más viable para la transferencia es un aspecto crítico del tratamiento de los ciclos de FIV. En la práctica clínica gran parte de los embriones se siguen transfiriendo el tercer día tras la fertilización. Sin embargo, la transferencia de embriones en estas etapas de escisión implica la transferencia antes de que se produzca la activación del genoma embrionario y antes de la compactación y blastulación, que son fases críticas del desarrollo.

In vivo, el blastocisto humano se desplaza desde la trompa hasta el útero en el 4 día de desarrollo y durante esta etapa el embrión se compacta (52). La activación del genoma supone la capacidad embrionaria de regular su propia fisiología y homeostasis (3).

Otra de las ventajas estudiadas en relación a la TE de día 4 es a nivel logístico en cuanto al funcionamiento de los laboratorios de embriología de las clínicas y centros hospitalarios. La eficacia de la transferencia de embriones en día 4 permite minimizar los requerimientos de personal durante el fin de semana, así como aumentar la flexibilidad (tanto para el clínico como para los pacientes) a la hora de elegir un día para la TE sin comprometer los resultados obtenidos ni la atención al paciente (5).

1.4 Cultivo hasta mórula/blastocisto

Si consideramos al embrión que llega a día 4 de cultivo como aquel que presenta 16 células que se compactan para dar lugar a una mórula, podríamos de la siguiente manera diferenciar a los embriones en pre y post compactación como vemos en la tabla 1.

Tabla 1. Características embrionarias previas y posteriores a la compactación.

Pre-compactación	Post-compactación
Baja actividad biosintética	Alta actividad biosintética
Bajo consumo de oxígeno	Alto consumo de oxígeno

Consumo preferente de piruvato y lactato	Consumo preferente de glucosa
Aminoácidos esenciales	Aminoácidos no-esenciales y esenciales
Genoma materno	Genoma embrionario
Un solo tipo celular	Dos tipos celulares: MCI y trofoectodermo

La capacidad de implantación de un embrión es, desde el punto de vista del embriólogo, el único marcador real de la calidad embrionaria. Otro aspecto esencial a considerar es la evolución de los medios de cultivo embrionarios. Para conseguir un medio de cultivo eficaz es necesario recrear las condiciones del medio natural donde se desarrolla el embrión de forma in vitro. Esto es posible conociendo los nutrientes y metabolitos que requiere el embrión en cada estadio por los que pasa hasta llegar al útero.

Los medios de cultivo empleados en los albores de la medicina reproductiva eran los mismos que se utilizaban para el cultivo de células somáticas. Se trataba de soluciones salinas básicas, que con el tiempo fueron evolucionando hacia composiciones cada vez más complejas. A mediados de los años 80 aparecieron los primeros medios de cultivo diseñados específicamente para el cultivo de embriones humanos (53). Se incorporó por primera vez al medio una combinación definida de aminoácidos, además de utilizar albúmina sérica como fuente de macromoléculas. Poco después, en 1985 se publicó (34) la composición de uno de los medios de cultivo que más se han empleado en los laboratorios de FIV. Se dio a conocer con el nombre de HTF (Human Tubal Fluid) y consistía en una solución salina balanceada, libre de aminoácidos, en la que la concentración del ion potasio era igual a la del tracto reproductor femenino.

Todas estas modificaciones en la formulación de los medios supusieron un incremento en las tasas de embarazo transfiriendo embriones tras 2 o 3 días de evolución en dichos cultivos. Sin embargo, no ofrecían las condiciones necesarias para sostener el desarrollo embrionario hasta estadios más tardíos (mórula/blastocisto).

Los medios convencionales no tenían en cuenta la naturaleza dinámica del metabolismo del embrión durante su desarrollo. Los requerimientos nutricionales varían a lo largo del desarrollo embrionario, cambiando la preferencia por el sustrato energético. En estadios tempranos el embrión emplea piruvato y lactato como sustratos y no utiliza glucosa, que puede llegar a ser tóxica en determinadas concentraciones. Por otro lado, tras la activación del genoma embrionario, el metabolismo se basa en el uso de glucosa. En respuesta a estos resultados se modificó la composición de los medios.

A mediados de los 90, surgieron los denominados medios secuenciales, diseñados para cubrir las necesidades metabólicas y nutricionales del embrión en cada fase de desarrollo. Pronto se comercializaron y se convirtieron en el sistema de cultivo embrionario más generalizado en los laboratorios de FIV.

Los medios secuenciales aportan los nutrientes, oligoelementos y hormonas que precisan los embriones en cada uno de sus estadios de desarrollo pero como desventaja tienen un coste elevado.

El cultivo secuencial se lleva a cabo en dos medios distintos dependiendo de las necesidades metabólicas y nutricionales. Gardner et al. (54) no sólo defendieron el cambio de necesidades nutricionales, sino que profundizaron en las distintas concentraciones de metabolitos que hay a lo largo del recorrido que realiza el embrión en condiciones in vivo.

El medio secuencial se basa en el cambio de piruvato por glucosa para responder al incremento en la demanda de energía para el desarrollo hasta blastocisto. El medio G1 (Vitrolife) está basado en el nivel de carbohidratos presente en las trompas y los niveles de aminoácidos esenciales para la división. Del mismo modo está presente el quelante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para secuestrar los cationes bivalentes tóxicos y contrarrestar la actividad glicolítica del embrión. El medio G2 (Vitrolife) está basado en el nivel de carbohidratos existente en el útero, además de contener aminoácidos esenciales, no esenciales y no contiene EDTA.

Sin embargo, en 2015, se publicó un estudio controlado y aleatorizado que incluyó a 128 pacientes y a 1356 cigotos, y comparó la utilización de medio de cultivo único frente al medio secuencial usando un sistema de time-lapse para la selección embrionaria (55). El parámetro de medición fue el porcentaje de blastocistos de buena calidad en día 5. El estudio concluye que no se objetivó inferioridad del medio de cultivo único con respecto al secuencial ya que el porcentaje de blastocistos de buena calidad fue similar en los dos grupos.

Asimismo, una revisión Cochrane de Youssef et al. (56) publicada en 2015 y que incluía 32 estudios controlados y aleatorizados acerca de qué medio de cultivo es más óptimo utilizar en los ciclos de FIV, concluye que no hay suficiente evidencia científica para recomendar la utilización de un medio de cultivo específico frente a otro.

1.5 Selección embrionaria

1.5.1 Análisis morfológico tradicional

La valoración morfológica de los embriones en día 2 y 3 ha constituido tradicionalmente la base de la determinación de la calidad embrionaria.

A día de hoy sigue siendo la forma más rápida, sencilla y eficiente de valorar a los embriones en la práctica clínica diaria (12).

Existe un cierto acuerdo sobre lo que es un buen y un mal embrión, pero las diferencias entre laboratorios aparecen principalmente a la hora de valorar embriones de calidad intermedia, en estos casos hay una gran variabilidad interlaboratorio debida a la falta de consenso. De ahí la importancia de realizar controles intra e interlaboratorio entre los embriólogos y de seguir las recomendaciones que las asociaciones de biología de la reproducción proponen para este fin, en nuestro centro seguimos las de ASEBIR (Asociación para el Estudio de Biología de la Reproducción).

La clasificación ASEBIR (57) tiene valor pronóstico no sólo para la tasa de implantación sino también para la tasa de recién nacido, ya que estas tasas aumentan gradualmente según es más alta la categoría embrionaria, siendo máximas en los embriones de categoría A y mínimas en los embriones de categoría D.

La observación embrionaria en día 3 se debe hacer en el intervalo horario de 67 a 69 horas posinseminación. Los parámetros evaluados en día 3 son los siguientes:

- Número de células y ritmo de división.
- Porcentaje y tipo de fragmentación celular.
- Tamaño de las blastómeras
- Visualización de los núcleos y grado de multinucleación.
- Anillo citoplasmático (vacuolas, moteados y anillo citoplasmático)
- Forma de la blastómera.
- Zona pelúcida.
- Grado de compactación/adhesión temprana.

Estos parámetros morfológicos están incluidos en el sistema de clasificación y están claramente relacionados con la tasa de implantación. La clasificación y categorización de un embrión permite tomar decisiones importantes en la práctica clínica diaria como la decisión de transferirlo o congelarlo. La asignación de una categoría a un embrión

será producto de múltiples observaciones embrionarias a lo largo de su desarrollo evolutivo respetando los intervalos posinseminación establecidos.

La clasificación ASEBIR tiene en cuenta la evolución previa del embrión, con lo que sólo puede ser un embrión óptimo aquel que ha llevado un desarrollo correcto desde el inicio del cultivo.

Para el sistema de gradación se ha empleado la opción de 4 categorías divididas en función del potencial de implantación esperado:

Categoría A: embrión de óptima calidad con máxima capacidad de implantación.

Categoría B: embrión de buena calidad con elevada capacidad de implantación.

Categoría C: embrión regular con media capacidad de implantación.

Categoría D: embrión de mala calidad con una capacidad de implantación baja. Algunos de estos embriones tienen anomalías diversas que hacen que su probabilidad de implantación sea casi nula.

La asignación de una categoría a un embrión depende de variables exclusivamente morfológicas.

En la siguiente tabla observamos un esquema de gradación embrionaria basado en los criterios ASEBIR que facilita la práctica clínica habitual.

Tabla 2. Clasificación de los embriones en día 2 y 3 de cultivo según calidades establecidas por ASEBIR.

Grado	Día	Nº células	% Fragmentos	Simetría celular	Multinucleación	Otros
A	Día 2	4	<10 %	estadio-específico	No	Normal
	Día 3	7, 8				
B	Día 2	5	>10-25 %	4, 7 células No estadio-específico en Día +3	No	<50 % con vacuolas pequeñas o ZP normal
	Día 3	5, 7-10 4, 9-10				
C	Día 2	2,3,6	>25-35 %	2,4,8 células No estadio específico	1 célula bn en Día +2 o 1-2 células bn en Día +3 y el resto como grado A	< 50 % de células con vacuolas grandes
	Día 3	6,11,12 2,3,6-9 6, 8-10				
D	Día 2	3 (No estadio-específico), >6	>35 %	3 células No estadio-específico en Día + 2	Cualquier otro tipo de multinucleación.	>50 % de células con vacuolas pequeñas o grave alteración citoplasmática.
	Día 3	3, 5 Una más que				

bn: Binucleada

Quedan excluidos de la clasificación los embriones con prácticamente nulas posibilidades de implantación: falta de división en 24 horas, > 50 % de fragmentación y vacuolas grandes en > 50 % de las células.

Revisión morfológica y categorización embrionaria en día 4 (según ASEBIR) (58):

el grupo de interés de embriología de ASEBIR consideró la necesidad de profundizar más, así como de dar una clasificación a los embriones de día 4. Presentaron entonces una revisión actualizada y una propuesta de categorización embrionaria para el día 4. Se sigue la idea de clasificación dinámica y por ello se tendrá en cuenta el histórico de la evolución de los embriones en día 2 y día 3 para dar una gradación final al embrión de día 4. El intervalo de observación para día 4 se establece entre 90 y 94 horas posinseminación, de acuerdo con el tiempo de observación propuesto por el Consenso de Estambul (ESHRE 2011). Los parámetros evaluados serán:

- División celular: el embrión óptimo se encontrará en un número de células superior a 8 células.
- Adhesión celular: las células se pueden identificar por separado, aunque con membranas adyacentes. Este es el primer paso para la compactación, blastómeras con amplias zonas de contacto pero que se pueden diferenciar entre sí.

Puede existir una adhesión temprana en día 3 que puede ser favorable siempre que el embrión tenga 7 u 8 células.

- Compactación: estadio en el que es difícil distinguir blastómeras entre sí. Visualmente es una masa de células compacta y se pueden identificar los núcleos. Se debe a las fuertes uniones entre las células (tight junctions). La activación del genoma embrionario es un requisito previo para la correcta compactación. En esta fase las células dejan de ser totipotentes lo cual corresponde a un preembrión ya especializado.

Según el grado de Compactación:

- Compactación total, afecta a todas las células del embrión. Es completa cuando todas las células están compactadas y visualmente se caracteriza por una masa multicelular. Es incompleta cuando todas las células están iniciando el proceso de compactación, pero en distinto grado, pudiéndose distinguir aún algunas blastómeras mientras que otras ya empiezan a formar una masa compacta.

- Compactación parcial, afecta solamente a algunas células del embrión. Se observan embriones que excluyen células de su compactación; esta pérdida de citoplasma puede ser más o menos importante en función de la proporción de células que quedan excluidas y se correlaciona con el tamaño del embrión resultante.
- Fragmentación, tanto la fragmentación como la vacuolización son indicadores de apoptosis, pero no hay referencias bibliográficas que las relacionen directamente en el caso del día 4. Los fragmentos y células que entran en apoptosis no compactan y quedan excluidos fuera del embrión.

En cuanto a las transferencias embrionarias en día 4, la mayoría de los estudios describen tasas de embarazo e implantación similares a las que se obtienen transfiriendo en día 3 (5) (13).

Estudios más recientes ponen de manifiesto que transferir en día 4 es una alternativa viable a hacerlo en día 5 y que no compromete las tasas de implantación y embarazo clínico (25).

Cuando más de la mitad del embrión está excluido de la compactación, el pronóstico implantatorio es más bajo. Parece que incluso los embriones que se encuentran en estadio de células (14-16 células) en día 4 son capaces de formar blastocistos viables e implantar en porcentajes aceptables (3) (50).

Es de consenso que un embrión óptimo en día 4 es el que está compactado o compactándose y que ha iniciado la cuarta ronda de divisiones mitóticas (más de 8 células). La compactación debe incluir el total del volumen del embrión.

Según los parámetros previamente descritos (división celular, adhesión, compactación total o parcial, cavitación temprana y anomalías morfológicas de mal pronóstico como la excesiva fragmentación o vacuolización), el Grupo de interés de Embriología de ASEBIR propone una clasificación para categorizar a los embriones en día 4 como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 3. Clasificación de los embriones en día 4 de cultivo según calidad basada en criterios ASEBIR.

D+3	Características morfológicas D+4	D+4
A	Cavitación temprana Compactación total y > 8 células	A
	Compactación parcial (1-2 células excluidas)	B
	Compactación parcial (> 2 células excluidas) No compactación (> 8 células)	C
B	Cavitación temprana Compactación total y > de 8 células Compactación parcial (1-2 células excluidas)	B
	Compactación parcial (> 2 células excluidas) No compactación (> de 8 células).	C
C	Cavitación temprana Compactación total y > de 8 células	D
	Compactación parcial No signos de compactación (> 8 células)	
D	Cualquier característica	

Las características propias del grado D en día 4 serían: cualquier embrión que presente una fragmentación superior al 35 %, excesiva vacuolización, compactación inferior al 50 % y menos de 8 células sin signos de compactación.

De hecho, algunos grupos ya han hecho sus propias propuestas de categorización embrionaria en día 4 de cultivo, como en el caso del grupo de Tao et al. (6) que realizó una gradación de 1 a 4, siendo 1 el embrión de peor categoría y 4 el de mejor.

En el grado 4 los embriones están completamente compactados, no se identifican blastómeras. El grado 3 implica al menos un 75 % del embrión compactado y la morfología esférica del mismo. El grado 2 muestra una morfología embrionaria irregular y el grado 1 en el que menos del 50 % de las blastómeras se hayan compactado.

El grupo de Feil et al. (3) propuso una categorización con 5 categorías. Grado 1 sería un blastocisto temprano iniciando cavitación y distingue entre 1a (con presencia de blastocele) o una mórula completamente compactada que sería 1b. El grado 2 sería un grado 1 en el que se describen vacuolas, fragmentos o la compactación no es total. El grado 3 muestra una compactación parcial con más de 8 células. El grado 4 serían 8 blastómeras o incluso más, pero sin evidencia de compactación. El grado 5 sería el de aquellos embriones con menos de 8 células en su día 4 de desarrollo.

El consenso de Estambul de 2011 propuso una gradación para embriones en estadio de mórula y los dividía en 5 categorías. El grado 1 correspondería a las mórulas de mejor calidad y el 5 a las de peor. En el grado 1 encontraríamos a las mórulas con más del 75% de compactación.

Este sistema aporta al embriólogo más información para una adecuada selección embrionaria entre los días 3 y día 4 de cultivo, así como entre los días 4 y día 5.

Fabozzi et al. en 2015 (12) establecieron un sistema de gradación de las mórulas valoradas 96 horas tras la fertilización; consideraban mórula a todo aquel embrión que contara con 14 o más blastómeras, independientemente de que el embrión estuviera o no compactado. Analizaron los parámetros de compactación y fragmentación. El score oscilaba entre 4 categorías de la A a la D. Este sistema de gradación demostró ser útil para la selección embrionaria de la mejor mórula para transferir en día 4 y como modelo predictor de la tasa de blastulación y de la calidad de los blastocistos formados. Por otro lado, este modelo superó en capacidad de predicción al clásico score de día 3 de cultivo.

1.5.2 Análisis Morfocinético

Es el tipo de análisis que incluye a los sistemas de time-lapse. Estos sistemas consisten en seguir el desarrollo embrionario de manera continuada mediante una cámara introducida en una incubadora y realizar un video de la evolución embrionaria. Posteriormente un software reconstruye las imágenes y nos permite seguir el desarrollo de los embriones. Para este fin, se han desarrollado incubadoras con el sistema de captura de imagen necesario para poder generar estas secuencias sin necesidad de manipular el embrión en exceso.

Estas incubadoras incorporan sistemas de control de los parámetros de incubación embrionaria (CO₂, O₂, temperatura) y un sistema óptico adaptado para evitar el efecto nocivo que las luces de alta energía puedan causar al embrión.

Se obtienen imágenes de los embriones cada 20 minutos, generándose secuencias de todo el proceso de su desarrollo.

Sin embargo, las publicaciones en torno a este tipo de análisis morfocinético son controvertidas. Son muchos los estudios que no han demostrado una evidencia científica sobre el aumento de las tasas de embarazo. En 2016 Goodman et al. (59) publicaron un estudio sobre el impacto que podría causar añadir el sistema time-lapse como método de selección embrionaria sobre los resultados reproductivos. Se incluyeron 235 pacientes, 119 con un sistema convencional de valoración morfológica de los embriones y 116 con el sistema de time lapse para estudio morfocinético. Concluyó que el sistema time-lapse no mejoró los resultados reproductivos ni en tasas de implantación ni en tasas de gestación clínica.

En 2016 Kiesllinger et al. (60) compararon en un estudio prospectivo la diferencia entre realizar la selección embrionaria de forma convencional mediante la morfología embrionaria y la utilización del sistema time-lapse en estadios iniciales del cultivo embrionario. No se objetivaron diferencias en la tasa de gestación evolutiva entre los dos grupos.

1.6 Hatching Asistido

Otra de las ventajas que se han relacionado clásicamente con la realización de TE en día 4 es poder llevar a cabo el hatching asistido que en determinados casos puede ser de utilidad para mejorar la capacidad de implantación del embrión. Es muy complejo de realizar en embriones en estadio de blastocisto ya que tienen un espacio perivitelino

muy reducido o incluso no lo tienen. En estadio de mórula el hatching es más fácil, seguro y hay menor riesgo de compromiso celular (13).

Los óvulos se encuentran recubiertos por una capa exterior, denominada zona pelúcida, encargada de proteger tanto al óvulo como posteriormente al embrión en su paso por las trompas de Falopio hasta su implantación en el útero. De forma natural, tras la fecundación, la zona pelúcida se va adelgazando gradualmente hasta que, en el sexto día de su desarrollo, el embrión se desprende de ella para poder adherirse al endometrio del útero materno (hatching).

Sin embargo, en determinadas ocasiones, algunos embriones presentan una zona pelúcida más engrosada o endurecida de lo habitual, lo cual puede dificultar su salida y, por tanto, reducir las probabilidades de implantación. Es en estos casos en los que la eclosión asistida puede resultar una herramienta útil.

Esta técnica consiste en realizar un pequeño orificio en la zona pelúcida para facilitar la salida del embrión. Para ello, el embrión es “sujetado” con una micropipeta y por diferentes métodos (generalmente láser o soluciones enzimáticas) se procede a la realización de un pequeño orificio, siempre tratando de dañar lo menos posible al resto del embrión.

Cada centro tiene sus propios criterios para la aplicación de esta técnica, pero algunos de los casos en los que puede utilizarse son:

- Óvulos con la zona pelúcida engrosada por encima de los 15 μm de espesor.
- Transferencias de embriones descongelados, ya que durante la congelación se produce un endurecimiento de la zona pelúcida.
- Fallos de implantación recurrente en ciclos de FIV.
- Embriones con desarrollo lento.
- Embriones con fragmentación elevada.

Existe cierta controversia entre los embriólogos respecto al uso de esta técnica, no habiendo suficientes estudios prospectivos que demuestren un efecto beneficioso en las tasas de gestación. Por ello, actualmente su empleo queda restringido a casos muy puntuales.

Si bien es cierto que se siguen publicando muchos artículos en torno al beneficio del Hatching asistido en relación con el fallo repetido de implantación principalmente en embriones criopreservados, y la conclusión general es que no parece demostrado que haya un aumento en la tasa de recién nacido vivo tras la realización sistemática de esta

técnica (61). Hay que seleccionar bien los casos y es en ellos, en los que sí hay publicaciones que lo relacionan con un aumento de la tasa de embarazo, implantación y recién nacido vivo (62).

1.7 Diagnóstico Genético

Las bajas tasas de implantación resultantes de las técnicas de reproducción asistida se han relacionado con muchos factores como es la alta incidencia de trastornos cromosómicos que se originan durante la ovogénesis y la fase de escisión temprana en ciclos estimulados. Esta condición es especialmente notable en pacientes de edad avanzada, cuyo declive en tasa de recién nacido vivo está claramente relacionada con una mayor incidencia de aneuploidías (14).

Se ha demostrado una íntima correlación entre la morfología del embrión y anomalías cromosómicas que estos pueden presentar. Por lo tanto, el bloqueo del desarrollo embrionario en el caso de un genoma aberrante ocurrirá en etapas posteriores al estadio de células, cuando los embriones empiezan a usar completamente su propia maquinaria transcripcional. En consecuencia, un período prolongado de cultivo (cultivo largo) podría permitir la selección embrionaria más precisa, basada en la identificación de aquellos embriones capaces de pasar por la cuarta ronda de división mitótica, como un indicador de la actividad genómica (38).

Determinadas publicaciones (63) relacionaron la TE en día 4 con una ventaja a la hora de realizar diagnóstico genético preimplantacional a los embriones. Se realizaba la biopsia de la blastómera en día 3 (estadio de 7-8 células) y se contaba con 24 horas para la realización de la técnica de FISH en 8 cromosomas, con la posterior TE en fresco en estadio de mórula. A día de hoy esto no supone una ventaja en nuestra práctica clínica diaria. En primer lugar, porque ya no se realiza la técnica de FISH en 8 cromosomas para el DGP (diagnóstico genético preimplantacional) sino que se valora el análisis de todos los cromosomas con los Arrays de CGH y más recientemente con las técnicas de secuenciación masiva y en segundo porque la biopsia se lleva a cabo en estadio de blastocisto (trofoectodermo embrionario) y se realiza transferencia embrionaria en ciclo diferido tras criopreservación de los embriones euploides.

Las biopsias de blastómeras en embriones en día 3 de cultivo se han realizado de forma generalizada en los laboratorios de FIV a nivel mundial, y por ello, mientras esta técnica ha tenido lugar, la opción de TE en día 4 ha sido de gran utilidad. Biopsiar

trofoectodermo permite aislar mayor cantidad de material genético lo que facilita el análisis y proporciona mejores resultados a la hora de detectar de forma más precisa anomalías genéticas y cromosómicas. Por otro lado, la biopsia del trofoectodermo en día 5 postfertilización implica a embriones que han tenido éxito en su desarrollo evolutivo, por lo tanto, estos embriones tienen mayor potencial de implantación.

Son varios los estudios que muestran que la tasa de aneuploidía es significativamente menor en blastocistos que en embriones en estadio celular (34)(35).

El actualmente conocido como test genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A) requiere igualmente de la biopsia embrionaria en estadio de blastocisto y a diferencia del diagnóstico genético preimplantacional (DGP) no es decisivo en sus resultados. De ahí que no se considere a día de hoy todavía una técnica generalizable, ya que su utilización como método de selección embrionaria es controvertido. Teóricamente tendría mayor rendimiento en las pacientes con mayor riesgo de aneuploidía embrionaria. La controversia viene determinada principalmente porque no hay todavía suficiente evidencia científica que demuestre una tasa superior de embarazo evolutivo y de recién nacido vivo tras la utilización del PGT-A. Determinados estudios sí defienden que su uso aumenta la eficacia de las TRA en mujeres mayores de 35 años (64) e incluso otros que lo hace en todos los rangos de edad (65).

No es un proceso inocuo desde el punto de vista embrionario, (ya que la biopsia es inherentemente traumática y puede disminuir el potencial de implantación del embrión) por lo que si el riesgo de dañar al embrión supera al de ser aneuploide, el PGT-A no ofrece ningún beneficio en cuanto a la selección embrionaria se refiere. Se puede considerar un buen sistema siempre que se cuente con protocolos estables y con embriólogos experimentados.

El problema de que no presente resultados decisivos es precisamente que informe de resultados de mosaicismo embrionario. El mosaicismo es la convivencia al mismo tiempo y dentro de un mismo embrión, de 2 o más líneas celulares con distinta dotación cromosómica. Los resultados de mosaicismo generan dudas y dilemas éticos en los pacientes, a veces complejos de manejar.

Las recomendaciones VAoGen (Academia virtual de genética) y PGDIS (Sociedad internacional de diagnóstico genético preimplantacional) de su interpretación desde un punto de vista genético serían:

- Optar en primer lugar por embriones euploides.
- Seleccionar únicamente a los embriones con mosaicos simple.

- Priorizar los mosaicismos euploide/monosomía.
- Priorizar los embriones en los que los cromosomas implicados en la línea aneuploide pertenezcan a los pares 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20 y 22.
- Los embriones mosaico para trisomías de los cromosomas 2, 7 y 16 son de prioridad reducida por estar asociados a retardo en el crecimiento intrauterino.
- No transferir embriones en los que el mosaicismo implique a los cromosomas: 14, 15, 13, 18, 21, X e Y.
- El porcentaje de células aneuploides pierde relevancia (66).

Con respecto a la posibilidad de biopsiar los embriones en día 4, Zakharova et al. (67) publican un estudio en el que se biopsian mórulas y valoran que este proceso podría tener los mismos beneficios que la biopsia en día 5 siendo clínicamente más sencillo. Presentan resultados de 215 ciclos de FIV con micoinyección espermática (ICSI) con DGP. La biopsia se realizó en 709 mórulas y se biopsiaron entre 3 y 7 células por mórula. No se observó aneuploidía en el 72,7% de los embriones y el 91% de ellos alcanzaron fase de blastocisto. Los embriones fueron transferidos en fresco los días 5-6 de su desarrollo. El embarazo clínico se diagnosticó en el 32,8% de los casos y hubo 60 recién nacidos vivos. Se concluyó que el procedimiento de biopsia en día 4 no afecta al desarrollo embrionario in vitro. El aumento del número de células obtenidas al biopsiar mórulas puede facilitar el análisis genético y hay tiempo suficiente después de la biopsia para obtener resultados genéticos que permitan la transferencia embrionaria en fresco en los días 5-6 de su desarrollo.

1.8 Transferencia embrionaria de embriones criopreservados

La criopreservación a través de la vitrificación consigue un aumento en la tasa de supervivencia embrionaria en todos los estadios y mejora las tasas de gestación en relación a la congelación lenta. La primera publicación de criopreservación con vitrificación en embriones humanos fue en 1998 (68). La vitrificación evita la formación de cristales de hielo tanto en el medio intracelular como en el extracelular, que directamente se solidifican y pasan a un estado vítreo. Para que esto pueda ocurrir, se deben utilizar altas concentraciones de crioprotectores, aumentar la velocidad de enfriamiento y disminuir el volumen de la solución de vitrificación.

Con la vitrificación como técnica de criopreservación embrionaria, la supervivencia de los embriones congelados en estadio de mórula y de blastocisto no se ve comprometida y la tasa de embarazo e implantación de estos embriones es comparable a la de los ciclos en fresco. Esto conlleva que la congelación en estos estadios es igual o superior a la conseguida en embriones en estadios tempranos y no supone una limitación para la realización de cultivo prolongado (69).

Se han publicado múltiples estudios de congelación embrionaria en diferentes estadios de evolución (estadio de 2 a 4 células, estadio de 7 a 8 células y estadio de blastocisto).

La congelación embrionaria en cada uno de los diferentes estadios tiene ventajas e inconvenientes, en el caso del estadio de 2 a 4 células presenta como ventajas proporcionar a la pareja un número alto de embriones congelados y tasas de supervivencia embrionaria altas tras la descongelación. Como desventajas encontramos que la capacidad de selección embrionaria es totalmente inconcluyente.

En el estadio de 7 a 8 células, se mejora considerablemente la capacidad de seleccionar adecuadamente a los embriones para la criotransferencia pero las tasas de supervivencia de los embriones descongelados comienzan a disminuir. Cuando se produce la lisis de alguna blastómera durante el proceso de descongelación (evento que es relativamente frecuente) el potencial de desarrollo del embrión se reduce considerablemente.

En cuanto al estadio de blastocisto, es el que aporta la mayor y mejor información para seleccionar adecuadamente a los embriones para la criotransferencia (CT). Con respecto a sus desventajas, la tasa de supervivencia en la descongelación es también más baja que en estadio de células aunque cada vez se obtienen mejores datos en este sentido (15).

La opción de congelación embrionaria en estadio de mórula es la que menos se ha tenido en cuenta y la menos estudiada, aun así, están descritos embarazos y nacimientos tras criotransferencias de embriones congelados en estadio de mórula. El principal problema es que no existe una clasificación estandarizada para la evaluación de la viabilidad embrionaria poscongelación.

Hay estudios que comparan la viabilidad embrionaria poscongelación de embriones murinos vitrificados en estadio de mórula y en estadio de blastocisto y concluyen que los blastocistos con mayor celularidad en la masa celular interna y en el trofooctodermo son los que provienen de mórulas vitrificadas (70). En cualquier caso, se requiere de la realización de estudios prospectivos que estandaricen la morfología de mórulas desvitrificadas.

Es un hecho que cada día realizamos más transferencias de embriones descongelados y el argumento más sólido a favor de ello es la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica (SHO). Este síndrome sigue siendo la causa más frecuente de morbilidad relacionada con la estimulación ovárica controlada con una incidencia aproximada de 3 muertes por cada 100.000 ciclos.

El SHO se produce por un aumento de la permeabilidad vascular provocado por la administración de hCG exógena para desencadenar la ovulación e inducir la maduración final de los ovocitos (SHO precoz). El SHO tardío ocurre cuando se transfiere en fresco y se consigue una gestación, debido a la producción de gonadotropina coriónica humana (hCG) endógena por el sincitiotrofoblasto. Con la criopreservación de todos los embriones y posterior transferencia en ciclo diferido se obtienen muy buenos resultados reproductivos además de evitar el riesgo de SHO tardío.

La criotransferencia en ciclo diferido parece estar relacionada también con la disminución de la tasa de gestación extrauterina. Un estudio que evaluó un total de 103.700 ciclos de FIV en los que se consiguió gestación clínica, encontró una incidencia de gestación ectópica de 1,38%. El riesgo fue un 65% menor en aquellas pacientes que se habían sometido a CT cuando se comparó con los embarazos de ciclos en fresco. Una posible explicación es la alteración del ambiente tubárico-uterino provocado por la estimulación ovárica controlada (EOC) que contribuiría a una placentación anormal (71) (72).

Otro argumento que ha llevado a realizar cada vez con más asiduidad la transferencia de embriones congelados es el posible efecto perjudicial sobre la receptividad endometrial de la estimulación ovárica controlada (73).

El reclutamiento y el desarrollo de los múltiples folículos ováricos conducen a concentraciones suprafisiológicas de estrógenos en sangre y elevaciones prematuras de la progesterona durante la EOC que afectan al patrón de expresión génica del endometrio cíclico normal. Estas alteraciones se traducen en una asincronía embrio-endometrial que a su vez puede tener efectos perjudiciales en la implantación de un embrión sano (74). También hay evidencia de que la superovulación altera el ambiente inmune del endometrio con un descenso significativo de linfocitos natural killer a nivel endometrial durante los ciclos estimulados en comparación con los ciclos naturales (75). La presencia de estas células (natural killers uterinas) así como la correcta interacción con sus receptores KIR y el HLA embrionario son necesarios para una adecuada placentación (invasión trofoblástica).

Se ha demostrado que estos efectos de la EOC tienen un impacto negativo en las tasas de implantación de las transferencias en fresco en comparación con la transferencia de embriones congelados.

Los mejores resultados después de criotransferencias electivas en el contexto de una estrategia de congelación total podrían atribuirse, al menos parcialmente, a la ausencia de deterioro endometrial durante un ciclo no estimulado y al poder retrasar la TE. Ambas cosas conducirían a una mejor sincronía entre el desarrollo embrionario y la ventana de implantación endometrial (76) resultando en una mejor placentación, como lo demuestran los estudios en modelos murinos (77).

1.8.1 Resultados Perinatales con embriones criopreservados

Hoy día se dispone de evidencia científica que avala mejores resultados perinatales en ciclos de criotransferencia en comparación con transferencia en fresco (78).

Se debe tener en cuenta que los datos publicados corresponden a estudios observacionales de CT con embriones de “peor calidad” no escogidos inicialmente para la transferencia en fresco. En el caso de que se realizaran políticas de congelación de todos los embriones, probablemente los resultados perinatales se decantarían aún más hacia la TE diferida.

Una posible explicación es el efecto deletéreo de la EOC sobre la placentación precoz y en particular los niveles suprafisiológicos de estradiol presentes en los ciclos de transferencia embrionaria en fresco (TEF). Se han confirmado niveles de PAPP-A significativamente más bajos en el primer trimestre de gestaciones conseguidas por FIV-ICSI en comparación con gestaciones espontáneas (79).

La PAPP-A es una proteína producida por el trofoblasto placentario y las células decidualizadas del estroma endometrial en la interfase entre endometrio y placenta. Parece que los niveles suprafisiológicos de estradiol producirían una zona subóptima de interfase endometrio-placenta y con ello una disminución en los niveles de PAPP-A en el primer trimestre. Sin embargo, esta relación no aparece en pacientes con niveles de estradiol similares a los fisiológicos (80).

Partiendo de estas premisas otro de los objetivos presentes y futuros en la evolución de las TRA es ampliar el contexto de un programa sofisticado de criopreservación embrionaria en clínicas y centros hospitalarios que permita una estrategia de realización

electiva de congelación de todos los embriones (*freeze all*) con las ventajas que esto aporta, como realizar más fácilmente el test genético preimplantacional de aneuploidías (PGT-A), la no necesaria utilización de análogos de GnRH para la supresión ovárica y la posibilidad de emplear el ciclo natural para la ulterior preparación endometrial, lo que supone mayor comodidad para las pacientes. Estas políticas también se enfrentan a desafíos, como es el requerir de un laboratorio de embriología dotado de tecnología adecuada para una vitrificación óptima, en cualquier caso, son necesarios estudios de coste-efectividad que demuestren la mejoría de los resultados reproductivos y perinatales de esta estrategia.

1.9 Receptividad Endometrial

Uno de los criterios que se expone con unanimidad entre las publicaciones que estudian la TE en día 4 es la ventaja que aporta desde el punto de vista de la receptividad endometrial. El endometrio es un tejido muy dinámico que experimenta modificaciones a lo largo del ciclo menstrual. Su función principal es facilitar la implantación embrionaria para que pueda producirse una gestación evolutiva.

Tradicionalmente la evaluación del endometrio se ha realizado mediante métodos visuales (ecografía, histeroscopia e histología tras biopsia) y, más recientemente las nuevas técnicas genómicas que estudian a través de microarrays cientos de genes que se expresan a nivel endometrial, y que ayudan a decidir el mejor momento para que el endometrio reciba la transferencia embrionaria. A día de hoy, faltan estudios prospectivos que afirmen la existencia de diferencias significativas en cuanto a la mejora de las tasas de implantación, gestación evolutiva y recién nacido vivo en la aplicación de este tipo de test, pero lo que parece innegable es que el factor endometrial se tiende a personalizar. La sincronización de la velocidad del desarrollo del embrión con el estado del endometrio parece ser un factor clave a tener en cuenta en la obtención de resultados óptimos en reproducción asistida. La firma transcriptómica de la receptividad endometrial revela que el factor endometrial es responsable de hasta un 25% de los casos de fallo de implantación (25).

Recientemente, el estudio de la microbiota endometrial ha permitido profundizar en el conocimiento de la fisiología endometrial y maximizar los resultados de las TRA, ya que parece influir en la implantación embrionaria y en la tasa de gestación evolutiva.

Partiendo de la premisa de que actualmente conocemos que la cavidad endometrial no es estéril se han publicado estudios que encuentran que una flora poco abundante en lactobacilos se asocia a unos peores resultados en FIV (81).

Por otro lado, la progesterona es la hormona por excelencia de la fase lútea, esencial para inducir cambios secretorios que favorecen la implantación del embrión y el mantenimiento de la gestación. La fase lútea en los ciclos de estimulación ovárica es siempre deficiente en esta hormona en comparación con los ciclos naturales. La progesterona asciende hasta 4-5 días tras la punción de forma directamente proporcional a la respuesta ovárica, pero a los 7-8 días sufre una disminución llamativa debido a que la luteólisis se produce siempre de forma precoz en los ciclos de estimulación.

En cuanto a cuál es el mejor protocolo de suplementación de la fase lútea la revisión de la Cochrane 2015 concluye que no hay ninguno superior a otro (83).

En el caso de ciclos estimulados de FIV se ha observado que la ventana óptima para comenzar la administración de progesterona es entre el día 0 y el 4 postpunción. Este es el modo de proceder mayoritario en la práctica clínica, iniciándose la progesterona el día de la punción. Es cierto que en pacientes con una ventana de implantación normal (entre 6 y 10 días tras ovulación), cuando se inicia la progesterona, dicha ventana está completamente sincronizada con los días de desarrollo del embrión.

En los ciclos de transferencia de embriones congelados habitualmente se emplea la opción del ciclo sustituido y se administran preparados de estradiol en fase folicular para madurar y engrosar el endometrio y cuando se estudia a través de ecografía y es superior a 7 mm, añadimos progesterona el mismo número de días que el embrión tiene de desarrollo in vitro. Pero esta premisa no siempre es correcta, hasta un 25% de pacientes tienen esta ventana de receptividad desplazada (acelerada o retrasada) y es en estos casos en los que se podrían aplicar los nuevos test de receptividad endometrial para así poder personalizar el inicio de la suplementación de la fase lútea.

Labarta et al. en 2017 (82) observaron que en ciclo sustituido una concentración baja de progesterona sérica menor de 9,2 ng/ml el día de la TE se relacionaba con una disminución significativa de la tasa de gestación evolutiva en ciclos de criotransferencia, por lo que la determinación de esta hormona el día que tengamos programada la misma o el día previo nos ayudaría a decidir si posponer o no la CT. Esta afirmación es equiparable a la de Gaggiotti-Marre et al. (83) que realizaron un estudio similar en 2018 con CT de embriones euploides, testados genéticamente.

Así mismo Sonntag et al. en 2013 (60) encuentran que los niveles de progesterona a los 7 días de la TE son altamente predictivos de la posibilidad de embarazo y gestación evolutiva y que éstas son mayores en las pacientes con niveles de progesterona elevados.

En el ámbito del ciclo sustituido dentro del marco de las criotransferencias una revisión Cochrane sobre 22 estudios concluyó que no hay evidencia suficiente de que algún fármaco tenga superioridad sobre otro para la preparación del endometrio (84).

Otra consideración a tener en cuenta en cuanto al factor uterino es la contractilidad uterina en el momento de la TE. En los últimos años numerosas publicaciones han puesto de manifiesto la importancia de estas contracciones para que se produzca la gestación (62).

En condiciones in vivo el peristaltismo uterino es fundamental para que el espermatozoide alcance el óvulo además, de para facilitar la implantación en la fase lútea. La contractilidad uterina tiene su impacto también en la FIV. Los niveles suprafisiológicos de estradiol que se producen durante la estimulación ovárica controlada están asociados a la síntesis de oxitocina, receptores de oxitocina y prostaglandinas (PGF2a) y dan lugar a un aumento de la actividad contráctil en comparación con un ciclo natural.

Los factores que influyen en el peristaltismo uterino durante un ciclo de FIV pueden ser mecánicos (dificultad en el momento de la transferencia, tocar el fundus, uso de garfios), uterinos (endometriosis, adenomiosis, miomatosis, malformaciones uterinas, etc.) o endocrinológicos (hiperestrogenismo o niveles inadecuados de progesterona). Todos ellos pueden aumentarlo y repercutir negativamente en la implantación (85).

Las contracciones van disminuyendo desde la punción hasta hacerse prácticamente quiescentes a los 6 días, por lo que realizar la TE a partir del día 4 de desarrollo embrionario está relacionado con una disminución de dicha actividad contráctil en comparación con las TE en estadio de células.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

Hipótesis conceptual

La transferencia embrionaria en día 4 de cultivo es una opción válida en ciclos de criotransferencia embrionaria.

Hipótesis Nula

La transferencia embrionaria en día 4 de cultivo ofrece peores resultados reproductivos que la transferencia en día 3. El día 4 no es una opción a considerar a la hora de escoger el momento en el que realizar la transferencia embrionaria.

Hipótesis Alternativa

La transferencia embrionaria en día 4 de cultivo ofrece al menos los mismos resultados reproductivos en tasa de implantación y de embarazo clínico que la transferencia en día 3.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo principal: Determinar si existen diferencias en cuanto a la tasa de implantación y a la tasa de embarazo clínico obtenidas en los ciclos de criotransferencia embrionaria realizados en día 4 de cultivo frente a día 3 en nuestro centro.

Objetivos secundarios:

1. Determinar si existen diferencias en cuanto a la tasa de aborto clínico en los ciclos de criotransferencia embrionaria realizados en día 4 de cultivo frente a día 3.
2. Determinar si existen diferencias en cuanto a la tasa de embarazo múltiple en los ciclos de criotransferencia embrionaria realizados en día 4 de cultivo frente a día 3.
3. Comparar la prevalencia de las complicaciones obstétricas de las gestaciones conseguidas tras criotransferencia embrionaria en día 4 de cultivo frente a día 3.
4. Comparar la prevalencia de la patología fetal diagnosticada en las gestaciones conseguidas tras criotransferencia embrionaria en día 4 de cultivo frente a día 3.
5. Comparar los resultados perinatales en cuanto a prevalencia de cesáreas en las gestaciones conseguidas en día 4 de cultivo frente a día 3.

MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Diseño del estudio

4.1.1 Tipo y ámbito del estudio

El presente estudio es observacional, analítico, de cohortes y retrospectivo. Se realizó una revisión de las criotransferencias embrionarias realizadas en día 3 y 4 de cultivo embrionario entre el 1 de enero del 2011 y el 30 de junio del 2016. El total de estas transferencias embrionarias ha sido realizado en la Unidad de Reproducción Asistida del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, España. Se establecen dos grupos según el estadio de desarrollo embrionario en el que se realiza la transferencia. El primer grupo lo forman transferencias de embriones en día 3 de cultivo (419 criotransferencias) y el segundo transferencias de embriones en día 4 (431 criotrasnferencias). El hecho de elegir realizar la transferencia en uno u otro día se ha realizado en base a criterios organizativos de la unidad de reproducción. Al inicio de este estudio transferir en fresco en día 2 o en día 3 era parte de la práctica clínica habitual. De hecho nuestras tasas de embarazo en fresco eran similares en estos dos días, por lo que se transfería en cualquiera de ellos en función de razones logísticas y organizativas de nuestra unidad. Por ese motivo se realizaba la criopreservación de los embriones excedentes y aptos en día 2 y 3 respectivamente. Al realizar la

descongelación de estos embriones se procedió a dejarlos 1 día adicional de cultivo, por lo que fueron transferidos en día 3 o 4 respectivamente.

En caso de conseguirse gestación evolutiva se ha analizado su curso a nivel obstétrico y la finalización de la misma para obtener datos perinatales.

De esta forma se compararon resultados reproductivos, obstétricos y perinatales derivados de transferir en día 3 frente a día 4 de cultivo, siempre en el marco de la criotransferencia embrionaria.

El presente estudio se diseñó según las normas de Buena Práctica Clínica de la Conferencia Internacional de Armonización y los principios éticos que tienen sus orígenes en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética de este centro (anexo).

4.1.2 Descripción de la muestra estudio

Se incluyeron un total de 850 criotransferencias embrionarias. Éstas fueron realizadas en día 3 o en día 4 de cultivo. Se establecieron por tanto 2 grupos de estudio: el grupo de TE en día 3 (419 TE) y el grupo de TE en día 4 (431 TE). Se recogieron numerosas variables clínicas, embriológicas, maternas, fetales y perinatales. En caso de gestación se realizó un seguimiento a todas las pacientes durante el período comprendido entre la Beta-hCG positiva en sangre periférica hasta el momento del parto. Se incluyó el primer caso el 1 de enero de 2011 y se recogieron los últimos datos perinatales en abril de 2017. Cabe señalar que los datos obstétricos y perinatales correspondientes a las últimas pacientes transferidas en junio de 2016 se recogieron ya comenzado el estudio por lo que estrictamente el diseño se consideraría ambispectivo (parte retrospectiva y parte prospectiva).

4.2 Criterios de Inclusión

1. Parejas con diagnóstico de esterilidad o infertilidad primaria al inicio del tratamiento.
2. Ciclos de FIV con gametos propios.
3. Parejas que han realizado ciclo de FIV en nuestro centro y en las que ha habido embriones criopreservados.

4. Ciclos de criotransferencia embrionaria con embriones viables y aptos para ser transferidos en día 3 o 4 de cultivo.

4.3 Ciclos de Fecundación In Vitro (FIV)

4.3.1 Proceso de FIV

Todos los pacientes fueron sometidas a ciclo de FIV en nuestro centro.

La estimulación ovárica controlada (EOC) se inició tras la administración de anticonceptivos orales, empleados en nuestra práctica habitual para programar los ciclos. Se llevó a cabo mediante protocolo antagonista corto como primera elección o, agonista largo de la GnRh. Para el desarrollo folicular múltiple se empleó FSH recombinante y en los casos de pacientes con edad igual o superior a 36 años se añadió menotropina (HMG). Se introdujo el antagonista (Ganirelix o Cetrorelix) en pauta flexible con folículos iguales o superiores a 14 mm. Se realizaron controles ecográficos seriados según nuestro protocolo habitual, el primero al sexto día desde el inicio de la estimulación ovárica y posteriormente cada 48 horas. Tras objetivar al menos 3 folículos con un diámetro medio igual o superior a 17 mm se procedió a la inducción de la ovulación mediante la administración de Coriogonadotropina alfa (hCG recombinante). En caso de estradiol sérico superior a 3000 pg/mL o bien en caso de observación ecográfica de más de 15 folículos en desarrollo el día del trigger, éste se realizó con un bolo de Triptorelina (0,3 mg).

La punción ovárica bilateral ecoguiada para la recuperación ovocitaria se realizó en quirófano 36 horas tras el desencadenamiento de la ovulación y bajo sedación.

Los ovocitos obtenidos fueron fertilizados con el semen de la pareja en el laboratorio de embriología mediante FIV clásica vs. ICSI vs. fecundación mixta en función de la calidad de la muestra seminal, del número de ovocitos recuperados y, a criterio del embriólogo, en función de calidad ovocitaria y de resultados obtenidos en ciclos previos.

A las 16-18 horas de la fertilización se valoró la fecundación mediante la observación de 2 pronúcleos y 2 corpúsculos polares (2PN +2CP) y posteriormente se procedió a la evaluación diaria de los embriones en cultivo hasta realizar TE. En aquellos casos en los que el trigger se realizó con Triptorelina, se procedió directamente a la vitrificación embrionaria para TE diferida.

El medio de cultivo empleado ha sido Vitrolife (medio secuencial, Suecia AB, G-IVF Plus, G1 Plus y G2 Plus).

Los embriones excedentes fueron criopreservados para posterior uso por parte de la mujer (firmado así en el consentimiento informado).

La técnica de criopreservación fue la vitrificación en todos los casos.

4.3.2 Proceso de vitrificación

La vitrificación embrionaria es un proceso de congelación ultrarápida mediante la cuál se alcanza una temperatura de -196°C en pocos segundos, lo que evita la formación de cristales de hielo que puedan dañar las células.

En nuestro centro para la vitrificación embrionaria utilizamos el equipo ViT-Kit-Freeze (Irvine Scientific, California, USA).

En nuestro centro este proceso se realiza a temperatura ambiente, manteniendo la superficie de la mesa de trabajo entre 22 y 27°C . En primer lugar, se equilibran a temperatura ambiente durante 7 minutos los dos medios de vitrificación. Posteriormente, se toman los embriones del medio de cultivo secuencial en el que se encuentren (Vitrolife) y se colocan en $50\ \mu\text{l}$ de medio de equilibrado (ES), manteniéndose en esta solución 8 minutos.

Por último, se lavan los embriones de la gota de $50\ \mu\text{l}$ de medio de vitrificación (VS) y se cargan en el soporte de vitrificación CBS (CryoBioSystem, IMV Technologist, Francia), dejándolos con la menor cantidad de medio posible. Se coloca dicho soporte en su funda, se realiza un termosellado en la parte opuesta a los embriones y se introducen en nitrógeno líquido. Todo este proceso se realiza en 90 segundos para minimizar el tiempo de exposición a la solución de vitrificación y maximizar la viabilidad embrionaria.

4.3.3 Proceso de desvitrificación

Para la desvitrificación embrionaria utilizamos el equipo ViT-Kit-Thaw (Irvine-Scientific, California, USA).

Este proceso se realiza a temperatura ambiente, manteniendo la superficie de la mesa de trabajo entre 22 y 25°C . Antes de comenzar se debe atemperar el medio de

desvitrificación (TS) a 37°C durante 30 minutos, y los medios de dilución (DS) y de lavado (WS) a temperatura ambiente durante 15 minutos.

En primer lugar, se corta la funda del soporte de vitrificación (CBS) dentro del nitrógeno líquido, se extrae la parte interior que contiene los embriones congelados y se coloca rápidamente sobre 450 µl de TS durante 1 minuto. En segundo lugar, se colocan los embriones en 50 µl de medio DS durante 4 minutos. Por último se lavan en 2 gotas de medio de lavado (WS) de 50 µl por gota durante 4 minutos en cada una de ellas.

Tras este proceso, los embriones se colocan en el medio de cultivo secuencial correspondiente (Vitrolife) suplementado con 0.5% de seroalbúmina humana y se observan en el microscopio para evaluar su calidad.

La congelación embrionaria se realizó en estadio de células (día 2 o día 3 de cultivo) y, tras la desvitrificación, los embriones permanecieron 1 día adicional en cultivo siendo transferidos en día 3 (en caso de haber sido vitrificados en día 2) o en día 4 (en caso de haber sido vitrificados en día 3).

La preparación endometrial de las pacientes fue realizada en ciclo sustituido con 6mg al día de Estradiol vía oral iniciándose en los tres primeros días del ciclo menstrual y tras comprobación ecográfica de reposo ovárico. A los 10-12 días de tratamiento se realizó una ecografía transvaginal de control para confirmar la ecoestructura del endometrio así como su grosor. El límite inferior de grosor endometrial para proceder a transferencia fue de 7mm.

La transferencia embrionaria se realizó de forma ecoguiada con cánula Labotect (Alemania).

El número de embriones transferidos fue de 1 o 2 por paciente (y en 6 casos fue de 3 embriones), basándonos principalmente en la calidad embrionaria y en el número de transferencias previamente realizadas.

El soporte de fase lútea se realizó con progesterona vaginal en dosis de 200 mg cada 8 horas adaptando el número de días al estado madurativo del embrión.

14 días postransferencia realizamos una determinación de la hormona Beta-hCG en sangre periférica. En caso de embarazo, se realizó el primer control ecográfico con ecografía transvaginal en semana 6 de gestación.

4.4 Variables analizadas

4.4.1 Tipos de variables

Relativas a las características personales de las pacientes: edad de las pacientes.

Relativas al laboratorio de embriología: número de ovocitos recuperados en la punción, número de embriones desvitrificados, número de embriones transferidos y calidad de los mismos.

Relativas a resultados reproductivos: test de embarazo positivo en sangre periférica, número de sacos gestacionales observados por ecografía transvaginal, abortos (bioquímicos o clínicos), embarazos ectópicos (EE) y embarazos evolutivos.

Relativas a patología materna obstétrica: rotura prematura de membranas, abrupcio de placenta, diabetes gestacional, preeclampsia, hipotiroidismo gestacional, colestasis intrahepática, anemia y placenta previa.

Relativas al estudio del feto: anomalías cromosómicas, estructurales, feto pequeño para edad gestacional (PEG), crecimiento intrauterino restringido (CIR).

Relativas a resultados perinatales: edad gestacional en el momento del parto, inducción del parto e indicación del mismo, vía del parto (parto vaginal frente a cesárea), pH fetal intraparto, puntuación neonatal en la escala de APGAR y peso fetal.

Las cesáreas las dividimos según su causa de indicación: fracaso de inducción, no progresión de parto, desproporción pélvico cefálica, sospecha de pérdida de bienestar fetal y electiva.

Si el parto fue vaginal: parto eutócico o parto instrumental mediante fórceps o ventosa tipo Kiwi.

El número de variables recogidas ha sido muy amplio. Ha habido datos perdidos, principalmente los que se refieren al seguimiento de la gestación y sobre todo los relativos a datos perinatales. La Unidad de Reproducción Asistida del Hospital Clínico San Carlos es centro de referencia para otros hospitales públicos de la Comunidad de Madrid que carecen de dicha unidad. Tras la realización de la TRA, las pacientes gestantes en muchas ocasiones regresan a sus hospitales de referencia para el seguimiento de la gestación y para el parto o bien, deciden llevar el control en medicina privada. Para la recogida de los datos de estas pacientes hemos usado el portal Horus de la Comunidad de Madrid en el que se incluyen y comparten los datos de los hospitales públicos de la Comunidad. Las pacientes que no figuraban en Horus se han contactado telefónicamente. Aún así hay pacientes que no se han podido localizar y otras que

aunque han sido llamadas no nos han aportado toda la información requerida en las variables.

Los datos perdidos han sido excluidos en el análisis estadístico, por este motivo el tamaño muestral (n) puede no ser el mismo en cada una de las variables analizadas.

En la siguiente tabla se muestran las variables diferenciadas entre cualitativas y cuantitativas

Tabla 4. División de las variables entre cuantitativas y cualitativas.

VARIABLES CUALITATIVAS	VARIABLES CUANTITATIVAS
Día de cultivo embrionario	Número de ovocitos recuperados
Calidad embrionaria	Número de embriones desvitrificados
Aborto/Embarazo ectópico	Número de embriones transferidos

Diabetes gestacional	Número de sacos embrionarios observados ecograficamente
Rotura Prematura de membranas	Número de embriones observados ecograficamente
Colestasis intrahepática	Edad gestacional en el momento del parto
Placenta previa	pH fetal intraparto
Abruptio Placentae	APGAR1
Preeclampsia	APGAR5
Anemia	Peso
Hipotiroidismo subclínico	pH en segundo gemelo
Tipo de parto	APGAR1 en segundo gemelo
Tipo de parto en segundo gemelo	APGAR2 en segundo gemelo
Cesárea: indicación	Peso segundo gemelo
Alteraciones cromosómicas	Edad de las pacientes
Alteraciones estructurales	
Feto pequeño para edad gestacional	
Crecimiento intrauterino restringido	
Indicación de inducción del parto	
Test de embarazo positivo	

4.5 Definición de variables

Edad de las pacientes: se estratifica en tres grupos; menor de 34 años, entre 34 y 38 años y mayores o iguales a 38 años. El grupo de las pacientes “jóvenes” desde un punto de vista reproductivo sería el de menores de 34 años, por asumirse una reserva ovárica correcta inherente a dicho grupo de edad y por ende mejor pronóstico. El grupo de pacientes mayores o iguales a 38 años serían por el contrario aquellas en las que se obtienen peores resultados reproductivos por el hecho de la disminución de la reserva ovárica asociada a dicho grupo de edad. Entre ambos se encontraría un grupo que se puede considerar de edad intermedia entre los 34 y 38 años (86).

Calidad embrionaria: establecida según criterios ASEBIR. Consideramos embriones de buena calidad a todos aquellos de calidad A y/o B. Nos remitimos al apartado de valoración morfológica embrionaria en la introducción.

Test de embarazo positivo: Beta-hCG superior o igual a 10 mU/ml analizada 14 días postransferencia embrionaria en determinación de sangre periférica.

Aborto bioquímico: Beta-hCG positiva en sangre periférica 14 días postransferencia embrionaria y determinación ecográfica a las 4 semanas postransferencia de la línea media endometrial por debajo de 15 mm.

Aborto retenido: ausencia de botón embrionario en el saco gestacional observado a las 4 semanas postransferencia (gestación anembrionada) o bien ausencia de latido cardiaco en botón embrionario mayor de 5 mm (aborto diferido).

Aborto tardío: aquel que ha ocurrido más allá de la semana 12 de gestación.

En el análisis estadístico se ha considerado aborto clínico a todo aquel aborto en el que se ha llegado a diagnosticar la presencia de saco gestacional ecográficamente, es decir, se ha contado con los abortos retenidos y los abortos tardíos.

Puntuación en el test de APGAR: estratificado en mayor de 6 y menor o igual a 6. Se establece este punto de corte ya que, según la Asociación Española de Pediatría (AEP), la puntuación en este test inferior o igual a 6 se considera por debajo de la normalidad y precisa intervención médica proactiva (87).

El pH fetal intraparto: el pH de sangre arterial de cordón umbilical es un criterio objetivo usado para determinar el estado metabólico del recién nacido tras el parto, y por tanto del bienestar fetal. Estratificado en menor de 7,25 y mayor o igual a 7,25, según la Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia (SEGO) el pH por debajo de 7,25 se considera anormal, englobando prepatológico (entre 7,20 y 7,25) y patológico (por debajo de 7,20) (73).

El peso al nacimiento: estratificado en menor de 2500 g y mayor o igual a 2500 g. Este límite es el considerado por la AEP como “bajo peso al nacer” (73).

Edad gestacional en el momento del parto: estratificada en menor de 37 semanas y mayor o igual a 37 semanas, momento en el que se considera el término de la gestación.

Vía del parto: parto vaginal (eutócico o instrumentado) o parto mediante cesárea (consideraremos incluidos en la variable cesárea todos aquellos partos gemelares en los que al menos uno de los dos gemelos ha nacido mediante cesárea).

4.6 Cálculo de tasas

- Tasa de implantación: definida como número de sacos gestacionales observados en ecografía transvaginal en semana 6 de embarazo por embrión transferido.
- Tasa de embarazo: definida como el número de pacientes que presentan positividad en el test de embarazo de sangre periférica (Beta-hCG superior a 10IU/ml) 14 días postransferencia embrionaria por transferencia embrionaria realizada.
- Tasa de embarazo clínico: definida mediante la presencia de saco gestacional observado en ecografía transvaginal en semana 6 de embarazo por transferencia embrionaria realizada.
- Tasa de aborto clínico: definida como el número de abortos registrados por debajo de la semana 23 de embarazo, (siempre y cuando se haya diagnosticado por ecografía transvaginal el embarazo con la presencia de saco gestacional) por transferencia embrionaria realizada.
- Tasa de embarazo múltiple: definida como el número de gestaciones con 2 o más sacos gestacionales observados en ecografía transvaginal en semana 6 de embarazo por transferencia embrionaria realizada.
- Tasa de supervivencia embrionaria: definida como número de embriones que sobreviven a la descongelación entre número de embriones descongelados.

4.7 Análisis estadístico

Análisis descriptivo

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Los parámetros con ausencia de valor no han sido incluidos en el cálculo de porcentaje. Las variables cuantitativas se resumen en su media y su desviación estándar (DE) y las variables que no siguen una distribución normal se expresan con mediana y rango intercuartílico (RIQ).

Comparación de las características entre los dos grupos de estudio

Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de Ji-cuadrado. En el caso de que más de un 25 % de los valores esperados fueran menores de 5, las variables cualitativas se evaluaron con la prueba exacta de Fisher. La comparación de las variables continuas que mostraron una distribución normal se realizó mediante la prueba t de Student para muestras independientes. Para las variables que no se ajustaron a una distribución normal se aplicó el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

Evaluación de las variables de resultado

Se comparó la incidencia de las variables de resultado dicotómicas (obstétricas, fetales y perinatales) entre los dos grupos de estudio mediante el test de Ji-cuadrado. El efecto se evaluó mediante el cálculo del Riesgo Relativo (RR) junto a su intervalo de confianza al 95 %. Se emplearon modelos de regresión ajustados para aquellas variables que no mostraron una distribución homogénea entre los dos grupos ($p < 0.20$) y/o fueron clínicamente relevantes. Para la obtención de los RR ajustados se empleó un modelo de regresión logística-binomial.

Para las diferentes tasas calculadas como variables de resultado se estimaron las tasas agrupadas en cada uno de los grupos de estudio, así como la razón de tasas bruta junto a su intervalo de confianza al 95 %. Posteriormente, con el objetivo de obtener tasas ajustadas por edad, se empleó el método de Mantel-Haenszel para la obtención de tasas ajustadas por los siguientes estratos de edad: menores de 34, entre 34 y 38 y mayores o igual a 38 años.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I o error α menor a 0,05. Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS 15.0 y STATA 12.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Resultados descriptivos del total de la muestra

5.1.1. Edad del total de las pacientes incluidas en la muestra

Realizamos 850 transferencias embrionarias. La edad media de las pacientes fue de 34,84 años con una desviación estándar de 3,83 años.

Se ha estratificado a las pacientes por grupos de edad, las pacientes más “jóvenes” menores de 34 años, las de edad “más avanzada” mayores o igual a 38 años y el grupo intermedio comprendido entre 34 y 38 años.

Tabla 5. Edad de las pacientes incluidas en la muestra.

Datos Personales	n (%) n= 850
------------------	-----------------

Edad media (años)	34,84 (\pm 3,83) *
Rango de edad	20 – 42
Edad en categorías (años)	
<34	271 (31,9)
34-38	318 (37,4)
\geq 38	261 (30,7)

Datos expresados como media y desviación estándar

5.1.2. Resultados reproductivos

En las tablas 6, 7 y 8 se muestran las principales características desde el punto de vista reproductivo de las 850 transferencias que conforman la muestra analizada. De ellas, 419 se llevaron a cabo en día 3 de cultivo y 431 en día 4. Se transfirieron un total de 1440 embriones; 713 embriones fueron transferidos en día 3 de cultivo y 727 en día 4. De ellos 197 fueron de calidad A, 335 fueron de calidad B, 738 fueron de calidad C y 169 de calidad D. La media de embriones transferidos por transferencia fue de 1,69. De las 850 transferencias 280 (32,9%) presentaron un test de embarazo positivo en sangre periférica (beta-hCG positiva). De los 280 embarazos un 20,6% finalizó en aborto, un 0.4% en embarazo ectópico y un 79.0% en gestación evolutiva.

Tabla 6. Datos reproductivos analizados por transferencia. El tamaño muestral es de 850 y representa el total de TE realizadas.

--	--

Datos Reproductivos por transferencia	n (%) n= 850
Nº de ovocitos recuperados por punción	14.05 (\pm 5,79) *
Nº de transferencias	
Día 3	419
Día 4	431
Media de embriones desvitrificados por TE	1.78 (\pm 0,52) *
Embriones desvitrificados por TE:	
1 embrión	219 (25,8)
2 embriones	605 (71,2)
3 embriones	17 (2,0)
4 embriones	9 (1,1)
Media de embriones transferidos por TE	1,69 (\pm 0,47) *
Ciclos con transferencia de:	
1 embrión	266 (31,3)
2 embriones	578 (68)
3 embriones	6 (0,7)

*Datos expresados como media y desviación estándar.

Tabla 7. Datos reproductivos analizados por embrión. En la tabla 7 el tamaño muestral (n) es de 1440 y equivale al total de embriones transferidos.

Datos Reproductivos por embrión	n (%) n= 1440
Embriones transferidos en:	
Día 3	713
Día 4	727

Calidad de los embriones:	
Calidad A	197 (13,70)
Calidad B	335 (23,26)
Calidad C	739 (51,32)
Calidad D	169 (11,75)

En la figura 1 se muestra de forma gráfica la calidad del total de los 1440 embriones transferidos.

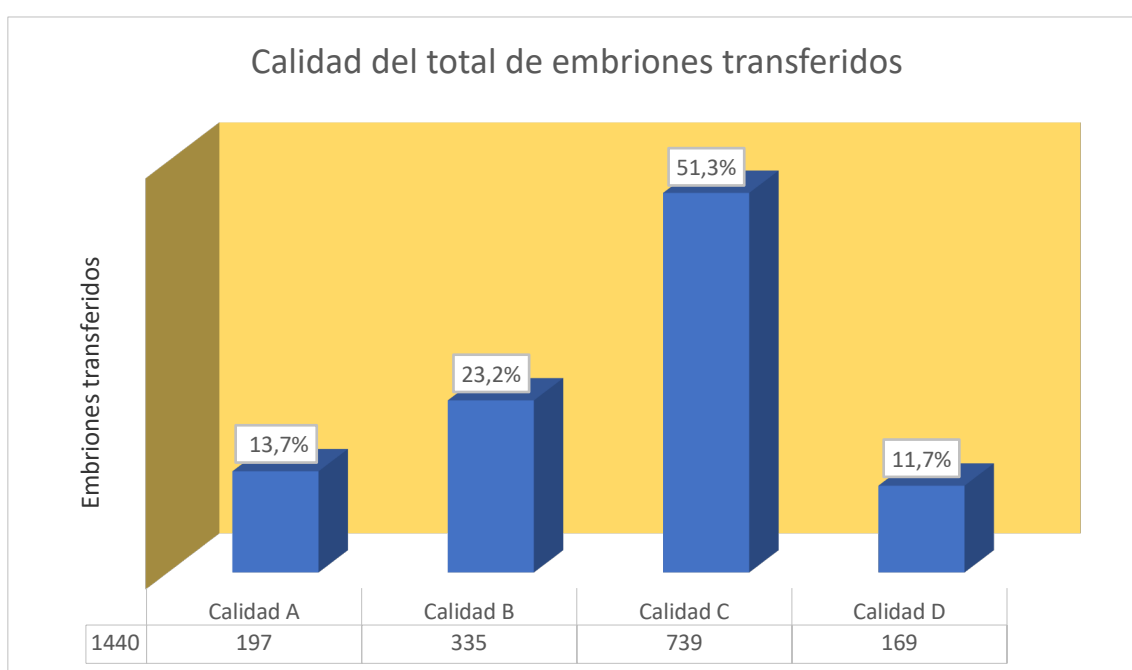


Figura 1. Calidad del total de los 1440 embriones transferidos.

Tabla 8. Datos reproductivos analizados por embarazo. En la tabla 8 el tamaño muestral (n=252) representa el número de gestaciones en las que se objetivó saco gestacional intrauterino, es decir no se han tenido en cuenta los abortos bioquímicos y los consumados incompletos que fueron 28 casos.

Datos Reproductivos	n (%)
---------------------	-------

por embarazo	n=252
Sacos gestacionales observados ecográficamente:	
1 saco	209 (74,6)
2 sacos	43 (15,4)
Aborto clínico	52 (20,6)
Embarazo ectópico	1 (0,4)
Gestaciones evolutivas	199 (79,0)

5.1.3. Descriptivo de la patología obstétrica de la población de estudio

En la tabla 9 se muestra un descriptivo de las variables estudiadas en cuanto a patología obstétrica se refiere. Cabe destacar que la patología con más prevalencia fue la diabetes gestacional seguida del hipotiroidismo gestacional y tan solo se presentó un caso de abruptio placentae.

En esta tabla el tamaño muestral (n) es de 194 ya que de las 199 gestaciones evolutivas los datos obstétricos se han podido constatar en 194 casos y ha habido 5 casos perdidos.

Tabla 9. Descriptivo de la patología obstétrica de la población de estudio.

Patología Obstétrica	n	n (%)
Diabetes gestacional	194	56 (28,8)
Hipotiroidismo gestacional	194	28 (14,4)
Anemia	194	14 (7,3)
Placenta Previa	194	11 (5,7)
Preeclampsia	194	6 (3,1)
Colestasis intrahepática	194	3 (1,5)

Abruptio placentae	194	1 (0,5)
--------------------	-----	---------

5.1.4 Descriptivo de la patología fetal de la población de estudio

En la tabla 10 se resumen las variables analizadas en cuanto a patología fetal se refiere. El tamaño muestral (n) sobre el que se ha estudiado cada variable no incluye los casos perdidos.

Tabla 10. Patología fetal de la población de estudio.

Patología Fetal	n	n (%)
Alteraciones cromosómicas	191	2 (1,0)
Alteraciones estructurales	190	5 (2,6)
Feto PEG	188	8 (4,3)
Feto CIR	188	7 (3,7)

PEG: pequeño para edad gestacional. CIR: crecimiento intrauterino restringido.

5.1.5 Descriptivo de los datos perinatales de la población de estudio

En la tabla 11 se resumen los datos perinatales estudiados en relación con la finalización de la gestación. Entre los más relevantes encontramos que el 50,5% de los partos se realizó mediante cesárea y el 49,4 % fueron partos vaginales, que el 84,5% fueron gestaciones a término y que el porcentaje de gestación múltiple fue del 16,6%. La edad gestacional media de finalización de la gestación fue de 38,4 semanas.

Dentro de nuestra población de estudio, existen 4 casos de partos gemelares en los que el primer gemelo nació mediante parto vaginal y el segundo por cesárea; estos 4 casos han sido considerados como cesáreas en el análisis estadístico.

Del 16,6% de partos múltiples, 32 casos fueron gestaciones gemelares y un caso fue de gestación triple.

Tabla 11. Descriptivo de los datos perinatales de la población de estudio.

Datos Perinatales	n	n (%)
RPM	191	44 (23,0)
Cesárea	188	95 (50,5)
Indicación de cesárea:		
FI		26 (13,8)
NPP		7 (3,7)
DPC	188	11 (5,9)
SPBF		20 (10,6)
Electiva		31 (16,5)
Parto vaginal	188	93 (49,4)
Parto vaginal categorías		
PE		49 (26,0)
PI	188	44 (23,4)
EG parto		38,44 (\pm 3,6) *
< 37 semanas		29 (15,4)
\geq 37 semanas	188	159 (84,5)
Inducción	185	77 (41,6)
Indicación inducción:		
GCP		40 (21,6)

RPM	185	16 (8,6)
CIR		1 (0,5)
Interés materno fetal		7 (3,8)
Otros		13 (7,0)
Gestaciones con parto múltiple	199	33 (16,6)
pH intraparto < 7.25	146	42 (28,8)
APGAR 1 (≤ 6)	163	12 (7,4)
APGAR 5 (≤ 6)	162	3 (1,9)
Peso < 2500	172	26 (15,1)

CIR: crecimiento intrauterino restringido. DPC: desproporción pélvico-cefálica. FI: fracaso de inducción. GCP: gestación cronológicamente prolongada. NPP: no progresión de parto. PE: parto eutócico. PI: parto instrumental. RPM: rotura prematura de membranas. SPBF: sospecha de pérdida de bienestar fetal
 * datos expresados como media y desviación estándar

5.2 COMPARACIÓN DÍA 3 FRENTE DÍA 4

En los siguientes apartados se realiza la comparación entre los dos grupos que se han establecido en este estudio, el grupo de transferencias realizadas en día 3 de cultivo embrionario y el grupo de transferencias realizadas en día 4 de cultivo embrionario.

5.2.1 Comparación de los datos reproductivos entre ambos grupos de estudio

Los diferentes tamaños muestrales (n) a los que hace referencia la siguiente tabla son: 850 que equivale al total de TE incluidas en este trabajo, 1440 que es el total de embriones transferidos y 252 que indica el total de gestaciones en las que se observa saco gestacional ecográficamente. De los 1440 embriones transferidos, 713 fueron transferidos en día 3 y 727 en día 4.

Cabe destacar en la tabla 12 la diferencia estadísticamente significativa existente en la calidad embrionaria de ambos grupos. Entre los embriones transferidos en día 3 hay un total de 316 de buena calidad (calidad A y calidad B), lo que representa un 44,32 %, mientras que en el grupo de transferencia en día 4 es de 216, y representa un 29,67%.

Tabla 12. Comparación de los datos reproductivos entre ambos grupos de estudio.

Datos reproductivos	n	Día 3 n (%)	Día 4 n (%)	p
Embriones desvitrificados por transferencia:				
1 embrión	850	100 (23,9)	119 (27,6)	0,45
2 embriones		305 (72,8)	300 (69,6)	
3 embriones		8 (1,9)	9 (2,1)	
4 embriones		6 (1,4)	3 (0,7)	
Ciclos con transferencia de:				
1 embrión	850	127 (30,3)	139 (32,3)	0,58
2 embriones		290 (69,2)	288 (66,8)	
3 embriones		2 (0,5)	4 (0,9)	
Calidad de los embriones:				
Calidad A	1440	134	63	<0,001
Calidad B		182	153	
Calidad C		319	420	
Calidad D		78	91	
Sacos gestacionales observados ecográficamente:				
1 saco	252	100 (74,6)	109 (74,7)	0,21
2 sacos		17 (12,7)	26 (17,8)	

La media de embriones transferidos por transferencia fue de 1,68 en día 4 y de 1,69 en día 3, resultado obviamente similar entre ambos grupos, ($p= 0,58$).

5.2.2 Factores pronósticos reproductivos

En la tabla 13 se muestra la comparación entre los dos grupos de: la variable edad distribuida por categorías, de las edades medias y de la variable *embriones de buena*

calidad definida como aquellos embriones de calidad A y/o B. Ambos, edad y calidad embrionaria, son factores que condicionan el pronóstico reproductivo en las TRA.

Tabla 13. Factores pronósticos reproductivos.

Factores pronósticos reproductivos	Día 3 n = 419 (%)	Día 4 n = 431 (%)	<i>p</i>
Edad (años) <34	156 (37,2)	115 (26,7)	0,004
Edad (años) 34-38	143 (34,1)	175 (40,6)	
Edad (años) ≥38	120 (28,6)	141 (32,7)	
Edad media (años)	34,58 (±3.78)*	35,10 (±3.87)*	0,045
Embriones de buena calidad	46,85	32,20	<0,001

*Datos expresados como media

Existen diferencias estadísticamente significativas entre las distintas categorías de edad de ambos grupos. Llama la atención que en el estrato de pacientes menores de 34 años encontramos un porcentaje claramente superior en el grupo de día 3 frente a día 4 (37,2 % vs. 26,7 %) y por otro lado, en el grupo de pacientes mayores o iguales a 38 años encontramos que un 32,7 % fueron transferidas en día 4 vs. un 28,6 % que fueron en día 3. También existen diferencias significativas entre las medias de edad de ambos grupos, las pacientes son 0.52 años mayores en el grupo de día 4.

Basándonos en la clasificación ASEBIR, consideramos embriones de buena calidad a aquellos con calidad A y/o B. El porcentaje de embriones transferidos de buena calidad en el grupo de día 3 es de 46,85 mientras que en el grupo de día 4 es de 32,20.

Se objetiva una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio. Los embriones transferidos en día 3 son de mayor calidad que los transferidos en día 4.

En las siguientes tablas hemos analizado los resultados de cada variable tanto a nivel bruto (sin ajustar), como ajustados por: *categorías de edad* y por *embriones de buena calidad*, puesto que éstas han sido las variables en las que hemos encontrado

diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. Por tanto los resultados comentados a pie de tabla serán siempre los riesgos relativos ajustados, ya que carecen de los sesgos asociados al hecho de que en día 3 de cultivo las pacientes sean más jóvenes y se les hayan transferido embriones de mayor calidad.

5.2.3 Comparativa de la patología obstétrica entre ambos grupos de estudio

A continuación, en la siguiente tabla, se muestra la frecuencia de las diferentes patologías obstétricas estudiadas en ambos grupos de estudio, así como la reducción relativa o el mayor riesgo de aparición de las mismas en cada grupo.

El tamaño muestral (n) es de 252 en el caso de la variable aborto y equivale al número de gestaciones en las que se objetivó saco gestacional en ecografía como ya se comentó en la tabla 8 y de 194 para el resto de variables de índole obstétrica sin tener en cuenta los casos perdidos.

Tabla 14. Comparativa de la patología obstétrica entre ambos grupos de estudio.

Patología obstétrica	n	Día 3 n (%)	Día 4 n (%)	P	RR (bruto)	IC (95%)	P	RR (ajustado)	IC (95%)
Aborto**	252	22 (13,9)	31 (15,0)	0,95	0,98	(0,68-1,42)	0,66	0,92	(0,63-1,34)
Diabetes gestacional	194	31 (33,3)	25 (24,7)	0,185	0,74	(0,47-1,15)	0,17	0,73	(0,46-1,15)
Colestasis intrahepática	194	2 (2,2)	1 (1,0)	0,608	0,46	(0,42-4,99)	0,41	0,36	(0,03-4,10)
Preeclampsia	194	1 (1,1)	5 (5)	0,214	4,60	(0,54-38,6)	0,18	4,32	(0,50-37,07)
Placenta Previa	194	5 (5,4)	6 (5,9)	0,893	1,08	(0,34-3,42)	0,98	0,98	(0,30-3,21)
Abruptio Placentae	194	0 (0)	1 (0,98)	1,000	-	-	-	-	-
Hipotiroidismo	194	12 (13,0)	16 (15,7)	0,601	1,20	(0,60-2,40)	0,75	1,11	(0,55-2,26)
Anemia	194	6 (6,5)	8 (7,9)	0,693	1,22	(0,44-3,40)	0,69	1,22	(0,44-3,40)

RR ajustado: Riesgo relativo ajustado por las variables edad y embriones de buena calidad

** Incluye abortos clínicos

Como vemos en la tabla 14, no existe aparente asociación entre la incidencia de los eventos: aborto (RR: 0,92), placenta previa (RR:0,98) e hipotiroidismo (RR: 1,11) en relación con el día en que se realiza la criotransferencia.

En cuanto a la diabetes gestacional, existe una reducción relativa del riesgo en el día 4 con respecto al día 3 de un 27% (RR: 0,73). Reducción que no alcanza la significación estadística.

Con respecto a la colestasis intrahepática, existe una reducción relativa del riesgo del 64% en el grupo de día 4 (RR:0,36). Reducción no estadísticamente significativa y aunque muy llamativa desde el punto de vista clínico hay que interpretar estos resultados con prudencia ya que la incidencia del evento en la población de estudio ha sido muy baja (3 casos entre ambos grupos).

La preeclampsia y la anemia son eventos que aparecen con mayor incidencia en el grupo de día 4 frente al de día 3. Llama la atención el caso de la preeclampsia que aparece 4.3 veces más en el grupo de día 4, dato que hay que analizar con prudencia debido a que estos resultados sean producto de la baja incidencia del evento (6 casos entre ambos grupos).

Con respecto al abruptio placentae no se ha realizado la comparativa entre ambos grupos por su baja incidencia de aparición en la población de estudio (tan sólo 1 caso en día 4).

En resumen, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables estudiadas entre ambos grupos, por lo que se pueden considerar similares desde el punto de vista obstétrico.

En la figura 2 observamos la comparativa de la patología obstétrica más frecuente en la población de estudio.

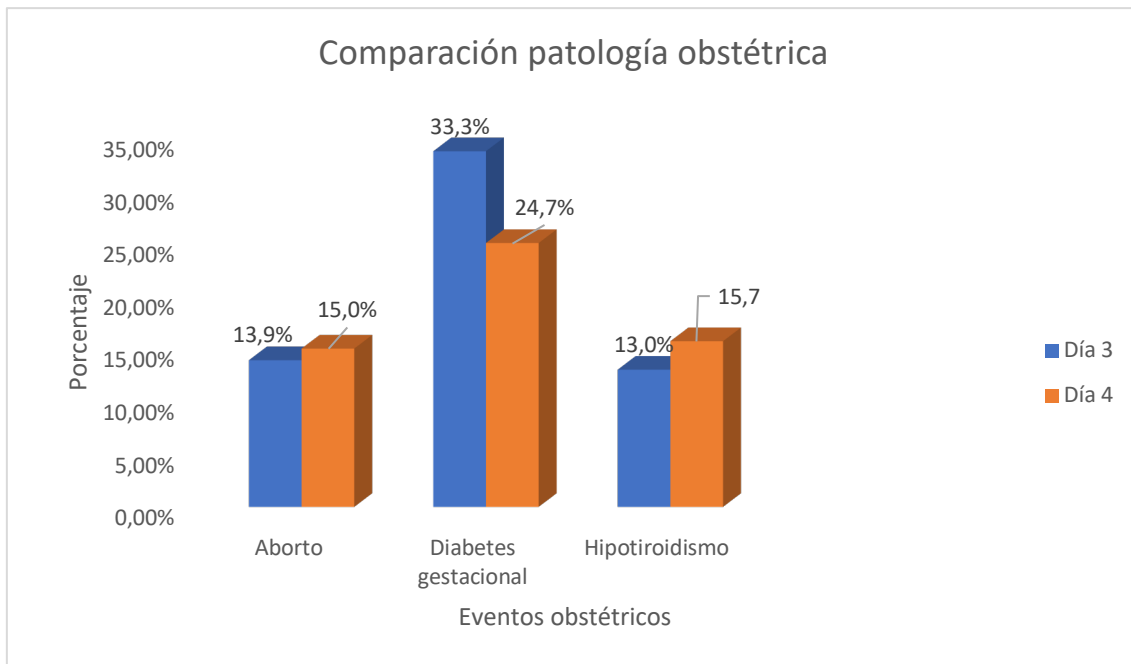


Figura 2. Comparación entre ambos grupos de estudio de los tres eventos obstétricos con mayor incidencia.

5.2.4 Comparación de los datos perinatales entre ambos grupos de estudio

La tabla 15 muestra la comparación de los eventos perinatales en ambos grupos de estudio. También se muestra el aumento o reducción relativa de la incidencia de las variables en cada uno de los grupos.

Tabla 15. Comparativa de los datos perinatales en ambos grupos de estudio.

Datos perinatales	n	Día 3 n (%)	Día 4 n (%)	<i>p</i>	RR (bruto)	IC (95 %)	<i>p</i>	RR (ajustado)	IC (95 %)
RPM	191	19 (20,9)	25 (25)	0,49	1,19	(0,70-2,02)	0,42	1,24	(0,73-2,11)
Parto vaginal		42 (46,6)	51 (52,1)						
PE	188	21 (23,3)	28 (28,6)	0,71	-	-	-	-	-
PI		21 (23,3)	23 (23,5)						
Cesárea	188	48 (53,3)	47 (47,9)	0,50	0,91	(0,69-1,19)	0,49	0,90	(0,68-1,20)
Indicación cesárea:									
FI		11 (12,4)	15 (15,2)						
NPP		4 (4,5)	3 (3)					-	
DPC	188	4 (4,5)	7 (7,1)	0,73	-	-	-	-	-
SPBF		12 (13,5)	8 (8,1)						
Electiva		16 (18,0)	15 (15,2)						
EG parto (semanas).									
< de 37	188	12 (13,5)	17 (17,1)	0,48	0,95	(0,84-1,08)	0,38	0,94	(0,83-1,07)
≥ de 37		77 (86,5)	82 (82,8)						
Gestaciones con parto múltiple	199	17 (17,9)	16 (15,4)	0,63	0,85	(0,46-1,60)	0,78	0,91	(0,48-1,72)
pH <7.25	146	19 (30,2)	23 (27,7)	0,74	0,91	(0,55-1,53)	0,66	0,89	(0,52-1,50)
APGAR 1 (≤6)	163	4 (5,4)	8 (9,0)	0,38	1,66	(0,52-5,30)	0,31	1,81	(0,56-5,88)
APGAR 5 (≤6)	162	0 (0)	3 (3,4)	0,25	-	-	-	-	-
Peso <2500	172	15 (18,3)	11 (12,2)	0,26	0,66	(0,32-1,37)	0,23	0,64	(0,30-1,33)

RPM: rotura prematura de membranas. PE: parto eutócico. PI: parto instrumental. EG: edad gestacional. FI: fracaso de inducción. NPP: no progresión de parto. DPC: desproporción pélvico cefálica. SPBF: sospecha de pérdida de bienestar fetal. RR ajustado por las variables edad y embriones de buena calidad

El parto mediante cesárea presenta una reducción relativa del riesgo del 10% en día 4 frente a día 3. Existe una reducción relativa de la incidencia de parto múltiple del 9% en día 4 frente a día 3.

Con respecto a la prematuridad (gestaciones con parto por debajo de la semana 37), se observa una reducción relativa del riesgo del 6% en el grupo del día 4 respecto al 3. Igualmente, en las gestaciones con parto múltiple observamos una reducción relativa del riesgo es en este caso del 9% en el grupo del día 4 respecto del 3.

En las variables pH <7.25 (engloba pH prepatológico y patológico) y peso por debajo de 2500 g encontramos una reducción relativa del riesgo en el grupo de día 4 con respecto a día 3 de un 11%. y un 36% respectivamente. En el caso del test de APGAR (≤ 6) en el minuto 5 no se ha estudiado la comparativa entre ambos grupos por su baja incidencia en la población de estudio.

En resumen no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en las variables comparadas en cuanto a datos perinatales entre ambos grupos de estudio, por lo que se pueden considerar homogéneos.

En la figura 3 se observa de forma gráfica la comparación de los eventos perinatales más importantes desde el punto de vista clínico.

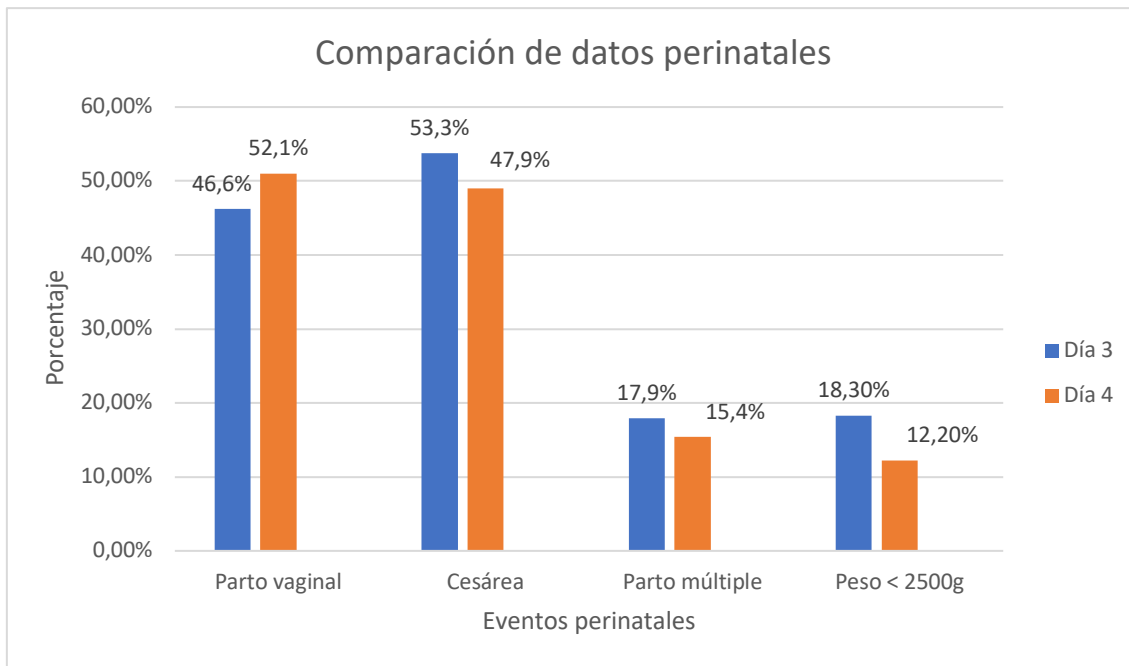


Figura 3. Comparación de los eventos perinatales más relevantes entre ambos grupos de estudio.

5.2.5 Comparación de la patología fetal entre ambos grupos de estudio

En la siguiente tabla se compara la incidencia de las diferentes patologías fetales en los dos grupos de estudio, así como el aumento o reducción relativa de su riesgo de aparición.

Tabla 16. Comparativa de la patología fetal en ambos grupos de estudio.

Patología fetal	n	Día 3 n (%)	Día 4 n (%)	<i>p</i>	RR (bruto)	IC (95%)	<i>p</i>	RR (ajustado)	IC (95%)
Alteraciones cromosómicas	191	0 (0)	2 (2,0)	0,49	-	-	-	-	-
Alteraciones estructurales	190	2 (2,2)	3 (3,0)	1,00	1,35	(0,23-7,89)	0,69	1,42	(0,23-8,49)
PEG	188	6 (6,7)	2 (2,0)	0,15	0,30	(0,06-1,44)	0,15	0,31	(0,06-1,52)
CIR	188	3 (3,4)	4 (4,0)	1,00	1,19	(0,27-5,21)	0,80	1,20	(0,26-5,40)

RR ajustado por las variables edad y embriones de buena calidad

Cabe destacar que la variable feto pequeño para edad gestacional (PEG), presenta una reducción relativa del riesgo de incidencia en el grupo de día 4 con respecto al de día 3 del 69%, reducción no estadísticamente significativa. Se debe ser cauteloso en la interpretación de este resultado aparentemente llamativo ya que la aparición del evento en nuestra población de estudio es muy baja.

El resto de variables estudiadas de la tabla, alteraciones estructurales y diagnóstico de crecimiento intrauterino restringido (CIR) son eventos que suceden con mayor incidencia en el grupo de día 4 con respecto al de día 3, sin que exista una asociación significativa en ninguno de los casos.

En el caso de las alteraciones cromosómicas no se ha estudiado la comparativa entre ambos grupos por su baja incidencia en la población de estudio.

En resumen, respecto a la patología fetal de ambos grupos, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas por lo que se deben considerar equiparables.

La figura 4 representa de forma gráfica la comparación entre ambos grupos de estudio de las variables más relevantes (desde el punto de vista clínico) de la patología fetal estudiada.

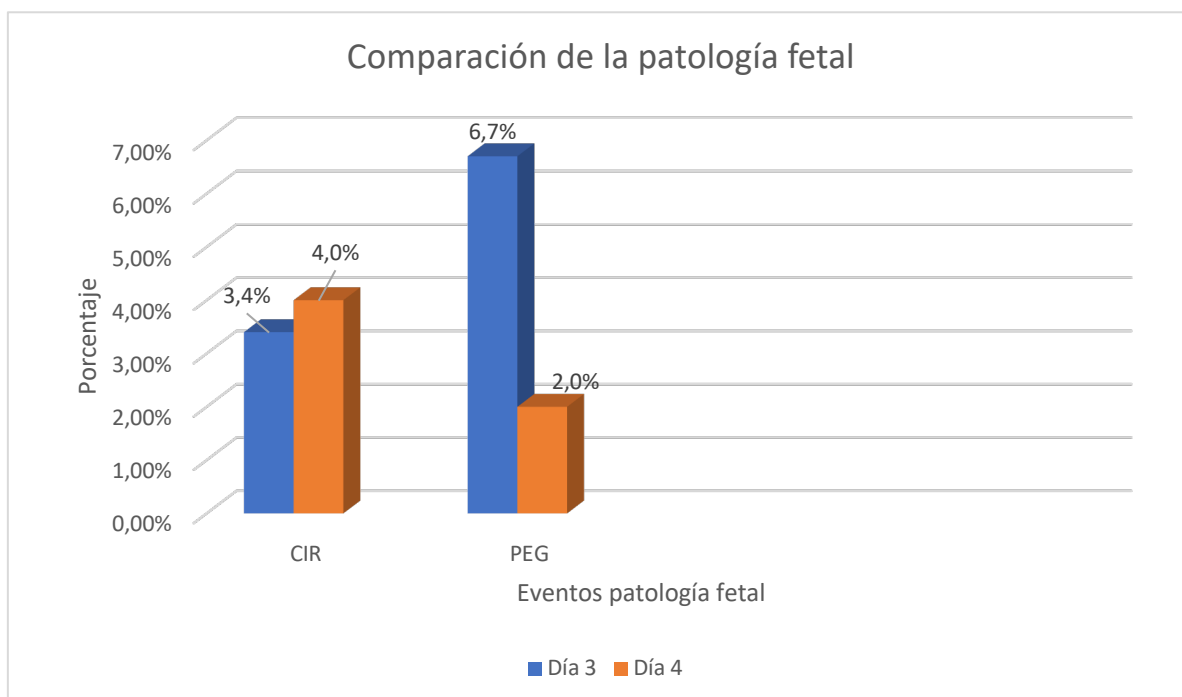


Figura 4. Comparativa de los principales eventos analizados sobre patología fetal.

5.3. Tasas de resultados reproductivos y comparación entre ambos grupos

La tabla 17 compara las tasas obtenidas en cada uno de los grupos de estudio (día 4 frente a día 3 de cultivo) tanto en términos de tasas brutas como ajustadas por categorías de edad (menor de 34 años, entre 34 y 38 años y mayores o iguales a 38 años).

Tabla 17. Comparativa de tasas entre día 3 y día 4.

Tasas	Día de transferencia	Tasa IC (95%)	Razón de tasas (bruta) Día 4 / Día 3 IC (95%)	<i>P</i>	Razón de tasas (ajustada) Día 4 / Día 3 IC (95%)	<i>p</i>
Tasa de supervivencia embrionaria	Día 4	0,95 (0,89-1,03)	0,98 (0,88-1,08)	0,73	1,02 (0,91-1,13)	0,71
	Día 3	0,94 (0,87-1,01)				
Tasa de implantación	Día 4	0,22 (0,18-0,25)	1,18 (0,94-1,48)	0,17	1,18 (0,94-1,48)	0,16
	Día 3	0,19 (0,15-0,22)				
Tasa de embarazo	Día 4	0,34 (0,28-0,39)	1,06 (0,87-1,28)	0,55	1,07 (0,84-1,35)	0,58
	Día 3	0,32 (0,27-0,38)				
Tasa de embarazo clínico	Día 4	0,37 (0,31-0,43)	1,17 (0,92-1,47)	0,20	1,16 (0,92-1,47)	0,19
	Día 3	0,32 (0,26-0,37)				
Tasa de aborto clínico	Día 4	0,21 (0,14-0,30)	1,29 (0,74-2,23)	0,43	1,21 (0,68-2,13)	0,50
	Día 3	0,16 (0,10-0,24)				
Tasa de embarazo múltiple	Día 4	0,11 (0,06-0,17)	0,86 (0,44-1,70)	0,80	0,94 (0,47-1,86)	1,14
	Día 3	0,13 (0,07-0,20)				

Destacamos de esta tabla el resultado de la tasa de implantación, que es un 18% superior en día 4 con respecto a día 3, así como la tasa de embarazo clínico que es un 16% más alta en el grupo de día 4 frente al de día 3. Ninguno de los datos obtenidos alcanza la significación estadística. Se objetiva una tendencia a encontrar resultados más favorables en el grupo de día 4 (con excepción de la tasa de aborto clínico) en las tasas analizadas en el presente estudio.

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

6.1 Cuestiones iniciales

La transferencia embrionaria se puede llevar a cabo entre un día 2 y un día 6 de vida embrionaria. Tal como se ha comentado en el apartado de introducción la tendencia en la actualidad es realizar cultivo prolongado y transferir en estadio de blastocisto. El hecho de que el embrión supere las fases de activación del genoma, compactación y blastulación implican un mayor potencial de implantación, por lo que la selección embrionaria será realizada de una forma más precisa y conseguiremos elegir el “embrión adecuado” en el “momento adecuado”, siendo éste el principal reto que se nos plantea en la unidades de reproducción asistida a día de hoy.

La TE de día 4 está descrita en la literatura desde 1994 (10) (11). Posteriormente Grifo (63) y Gianaroli (48) reportaron TE exitosas en día 4 de cultivo habiendo sido los embriones biopsiados en día 3 para realización de DGP. Gianaroli afirmó que transferir en día 4 podía ser muy conveniente para ambos, equipo clínico y pacientes, ya que aumenta la flexibilidad para la elección del día de transferencia sin que suponga un detrimento en los resultados.

La realidad es que es una práctica poco utilizada en la rutina clínica diaria en los ciclos de FIV. La subjetividad y la dificultad que entraña la valoración morfológica del embrión compactado (número, simetría, fragmentación y multinucleación de las blastómeras) hace que se haya relegado a una opción menos usada que la TE en estadio de células y en estadio de blastocisto.

El cultivo largo embrionario está asociado a una mayor tasa de implantación, posiblemente por la ventaja que supone una adecuada selección embrionaria, aun así, es más controvertido cuando el número de embriones fecundados es bajo, ya que no sería posible realizar una selección de los mismos y habría que tener en consideración que los pocos estudios que comparan el coste-eficiencia de transferir en estadio de células frente a estadio de blastocisto concluyen que transferir en día 3 es más eficiente en términos económicos (39)(40) (46) (66).

Habría que explorar otras opciones para realizar la selección embrionaria, como es disponer de un adecuado score estandarizado en cada uno de los días de vida

embrionaria (3). Un estudio publicado recientemente por Cheng-En Hsieh et al. (88) relaciona la blastulación precoz del embrión en día 4 de cultivo embrionario con mejores resultados reproductivos. Consideran las horas posinseminación ovocitaria hasta el comienzo de la blastulación, y si éstas son inferiores a 92,2 horas parece estar disminuido el riesgo de aneuploidías. De esta manera obtuvieron mejor tasa de implantación, de embarazo clínico y de gestación evolutiva cuando se guiaban por este parámetro para realizar la selección embrionaria en TE de embrión único realizada en fresco.

Otro estudio de Fabozzi et al. (89) estudia la situación contraria, embriones lentos en su desarrollo que presentan la compactación en día 5 de cultivo. Se observa, que este tipo de mórulas, aunque con una evolución más lenta, si consiguen demostrar la presencia de actividad mitótica tienen buenas tasas de blastulación (3).

Por lo general, cuando hablamos de cultivo largo nos estamos refiriendo a transferir en estadio de blastocisto, pero también está la opción de transferir en día 4, que presentaría las ventajas del cultivo largo, y no así las desventajas específicamente relacionadas con la transferencia de blastocistos (como por ejemplo, el mayor coste económico relacionado con los medios de cultivo, incubadoras con oxígeno, control requerido por el embriólogo, etc.) (90).

La literatura disponible que estudia las transferencias de día 4 describe ventajas con respecto al día 2 o 3, sobre todo, en lo que se refiere a la selección embrionaria una vez que la activación del genoma ha tenido lugar (15).

Además de razones organizativas hay otras razones por las que sería beneficioso transferir en día 4:

- En día 4 los embriones son transferidos a la cavidad uterina en un momento más fisiológico y de menor contractilidad uterina que en estadios previos (25).
- Un intervalo de tiempo más corto in vitro también puede reducir el riesgo de alteraciones genéticas/epigenéticas, malformaciones fetales, gemelos monocigóticos y recién nacido pretérmino, desventajas todas ellas asociadas a la TE de blastocistos (42) (9).
- La selección embrionaria en estadio de mórula predice mucho mejor el proceso de blastulación que los embriones en estadio de células (89).

No obstante, el presente estudio no pretende afirmar que la TE en día 4 es la mejor de todas las opciones posibles de transferencia, pero sí, que es una alternativa válida a tener en cuenta.

6.2 Discusión de Resultados Reproductivos

La literatura que compara específicamente resultados reproductivos de TE en día 4 frente a día 3 o frente a día 5 es escasa, por lo que en ese sentido nuestro estudio aporta una cohorte de tamaño considerable para profundizar en este aspecto. Son mucho más prolíficos los estudios y metaanálisis que comparan día 3 de cultivo con día 5.

De hecho, aunque la tendencia actualmente es transferir en estadio de blastocisto, la bibliografía publicada al respecto, no concluye categóricamente cuál es el mejor momento en el que realizar la transferencia embrionaria.

Una revisión sistemática y metaanálisis publicada por Glujovsky et al. (42) que incluye 13 ensayos clínicos controlados y aleatorizados, constata que la tasa de gestación clínica fue superior en día 5 vs. día 3 (OR: 1,27, $p=0,02$) y no se encontraron diferencias en la tasa de embarazo múltiple (OR: 0,86, $p=0,46$). En nuestro estudio sin embargo, la tasa de embarazo clínico no demostró ser superior en día 4 con respecto a día 3, pero sí se objetivó una tendencia favorable al grupo de día 4 (RR: 1,16, $p=0,19$). En cuanto a la tasa de embarazo múltiple, al igual que ocurre en el estudio de Glujovsky, no se encontraron diferencias entre día 3 y día 4 (RR: 0,94, $p=1,14$).

En esta misma línea, otro metaanálisis publicado por el grupo de Wang et al. (41) en el que se incluyeron 7 estudios controlados y aleatorizados, se muestra también más favorable a la TE en día 5. Comparaban TE realizadas con el mismo número de embriones transferidos, siendo éste de un máximo de 2. Este metaanálisis incluyó tanto ciclos de FIV-ICSI con ovocito propio como ciclos de ovodonación. Sus resultados en cuanto a tasa de embarazo clínico (OR: 1,43, $p=0,001$) y tasa de implantación (OR: 1,38, $p=0,007$) fueron superiores transfiriendo en día 5 en comparación con día 3. En este sentido, nosotros no encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a tasa de implantación, pero sí objetivamos unos resultados más favorables al día 4 (RR: 1,18, $p=0,16$).

Por su parte, el metaanálisis publicado por Martins et al. (91) muestra unas conclusiones mucho más partidarias a transferir en estadio de células. Sostiene que no hay evidencia científica suficiente para recomendar de forma sistemática la TE en día 5. La realización de este trabajo fue propuesta por la OMS para estandarizar una actitud en cuanto al mejor momento en el que transferir. Se incluyeron 12 ensayos clínicos y 2418 pacientes y en sus resultados se observó una tasa de gestación clínica que no demostró superioridad del estadio de blastocisto frente a día 3 (RR: 1,10, 95% IC, 0,93–1,31). Como ya se ha comentado, en nuestro trabajo tampoco se observó superioridad en la tasa de gestación clínica en día 4 de cultivo frente a día 3.

En el trabajo de Green et al. (81) se comparan resultados reproductivos de transferencias en día 3 y día 5 de cultivo embrionario basándose en el perfil pronóstico de la paciente. En el caso de pacientes de buen pronóstico, que serían aquellas menores de 35 años y con al menos 4 embriones de buena calidad en día 3 de cultivo, se concluye que estaría completamente justificado el cultivo largo y la transferencia en estadio de blastocisto. Las tasas de implantación (40,16 % vs. 11,43 %, $p=0,00$) y de gestación clínica (62 % vs. 29,8 %, $p=0,00$) fueron significativamente mayores en día 5 en comparación con día 3. En el caso contrario, cuando tenemos pacientes que tan sólo cuentan con 1-3 embriones fecundados, hay trabajos que sostienen que la tasa de embarazo clínico parece ser mayor en día 3 de cultivo que en día 5-6 (28 % vs. 21 %, $p<0,01$) (92). En nuestro grupo, si bien no se llegaron a obtener diferencias significativas entre el día 3 y el día 4 en cuanto a tasas de implantación y de gestación clínica, sí que se observó una tendencia favorable prolongando el cultivo 1 día más. Las tasas de implantación y de gestación clínica fueron respectivamente un 18% y un 16% superiores en día 4 con respecto a día 3.

En resumen, el momento idóneo para llevar a cabo la transferencia embrionaria es un tema controvertido en el que se implican múltiples factores, pero prácticamente todas las publicaciones coinciden en la tendencia a encontrar mejores resultados reproductivos cuando realizamos cultivo prolongado (40) (41) (93).

Los estudios que muestran resultados reproductivos derivados de comparar transferencias embrionarias en día 3 frente a día 4 de cultivo, aunque escasos en la

literatura científica, son los que más nos interesan ya que supone el tema principal sobre el que versa esta tesis doctoral.

En 1994 Huisman et al. (11) compararon en un estudio retrospectivo la transferencia de embriones en día 2, 3 y 4 de cultivo. La tasa de embarazo evolutiva fue la misma pero la tasa de implantación fue claramente mayor en el grupo de día 4. Nuestra tasa de implantación también ha sido superior en el grupo de día 4 pero sin alcanzar la significación estadística (0,22 vs. 0,19, $p=0,16$).

Ese mismo año Goto et al. (10) publicaron un trabajo también retrospectivo donde comparaban los resultados reproductivos de día 2 a día 5 de cultivo. Encontraban tasas similares de embarazo clínico en los grupos de días 2, 3 y 4 de cultivo, e inferiores en el grupo de día 5; (día 2, 29.6%; día 3, 32.9%; día 4, 30.4%; día 5, 10.7%). Son resultados en la misma línea que los obtenidos en nuestro estudio, ya que en los grupos de día 3 y 4, no se objetivó una diferencia significativa en cuanto a tasa de embarazo clínico se refiere.

En el año 2000 Huisman et al. (14) publicaron los resultados de un estudio prospectivo en el que se incluían pacientes con TE en día 3, 4 y 5, transfiriendo un máximo de 2 embriones por transferencia. Las tasas de implantación fueron similares en los tres grupos (14,4 %, 14,7 % y 15,5 % respectivamente), resultados que estarían en consonancia con los nuestros, con tasas de implantación similares en los dos grupos de estudio.

Posteriormente, se publicó un estudio retrospectivo (6) que incluía 242 TE en día 4 y 97 en día 3 y concluyó que las tasas de implantación fueron significativamente mayores en el grupo de día 4 en los casos de transferencia de embriones de “buena calidad”, según una categorización embrionaria para estadio de mórulas que los autores del estudio proponían (día 4: 46,4 % vs. día 3: 21,4 %, $p=0,01$). Sus resultados, además, concluyen que el número necesario de embriones a transferir es claramente menor en día 4 que en día 3, debido a la mejor selección embrionaria de las mórulas en base a sus criterios morfológicos. En nuestro caso las tasas de implantación entre ambos grupos de estudio son similares, así como también lo fue la media de embriones transferidos por transferencia (1,68 en día 4 y 1,69 en día 3, $p=0,58$).

Kiltz et al publican (94) los resultados de un estudio retrospectivo que incluía 272 TE en día 3, 44 TE en día 4 y 38 TE en día 5. El porcentaje de embarazo clínico fue mayor en día 4, pero sin alcanzar la significación estadística, comparándola con la de día 3 (59,1 % vs. 40,1 %) y menor, pero tampoco estadísticamente significativa, que la de día 5 (59,1 % vs. 68.4 %). Este resultado sería equiparable al obtenido por nuestro grupo, en el que la tasa de gestación clínica es mayor en día 4 con respecto a día 3, pero no lo suficiente como para obtener diferencias significativas (0,37 vs. 0,32, $p=0,19$).

Simultáneamente Margreiter et al. (15) publicaron un estudio prospectivo, aleatorizado y multicéntrico que analizaba las tasas de embarazo en función de en qué momento de vida embrionaria se realizase la transferencia. Establecen 2 grupos en sus resultados (estadio de células que serían los días 2 y 3 y cultivo largo días 4 y 5 de vida embrionaria). Concluye con una diferencia estadísticamente significativa que la tasa de embarazo clínico es mayor en el grupo de TE en días 4 y 5 (30,4 % vs. 50 %). Como ya hemos comentado en nuestro estudio la tasa de embarazo clínico se puede considerar similar entre los dos grupos de estudio, si bien es cierto, que en el estudio de Margreiter el grupo que obtiene la tasa de embarazo clínico significativamente mayor es el que incluye a las TE de blastocistos, ya que consideran cultivo largo tanto al día 4 como al día 5.

El grupo de Saadat et al. (17) publicaron los resultados de un trabajo retrospectivo que incluía 239 pacientes que se transfirieron en día 4 y 286 que lo hicieron en día 3. La tasa de embarazo clínico fue similar entre los dos grupos (46 % y 42 %, respectivamente) pero los autores hacen énfasis en una tendencia a obtener mejores resultados en la TE en día 4 en las mujeres jóvenes de su serie (menores de 34 años). En nuestro trabajo las tasas calculadas han sido ajustadas por categorías de edad (menores de 34 años, entre 34 y 38 años y mayores o iguales de 38 años) y concretamente en la categoría a la que se hace referencia en el estudio de Saadat (menores de 34 años) el porcentaje de pacientes transferidas ha sido estadísticamente más bajo en el grupo de día 4 con respecto a día 3 (26,7 % vs. 37,2 %), lo que nos lleva a pensar, que incluso transfiriendo a pacientes de mayor edad en el grupo de día 4, la tasa de embarazo clínico es un 16 % mayor, aunque el resultado no alcance la significación estadística.

En 2006 Montag et al. (16) publicaron un estudio prospectivo y aleatorizado que incluía 79 TE en día 3, 76 en día 4 y 79 en día 5. En estas pacientes se permitía el cultivo de un máximo tres cigotos. Los resultados en el grupo de día 4 fueron comparables con los de días 3 y 5, con la excepción de la tasa de implantación, que fue significativamente más baja en día 4 comparada con la de día 3 (27,6 % vs. 41,8 %, $p < 0,05$). La tasa de implantación en nuestro estudio es un 18 % superior en día 4 con respecto a día 3, por lo que distaría del resultado obtenido por el grupo de Montag.

El grupo de Pantos et al. (13) compararon de forma prospectiva la TE en día 4 con la de día 3 en 352 ciclos de FIV. Se incluyeron 176 pacientes en cada grupo y se concluyó que las tasas de implantación (22,05 % vs. 21,33 %), embarazo clínico (49,7 % vs. 45,3 %), y gestación múltiple (15,2 % vs. 15,3 %) fueron favorables al día 4 frente a día 3, pero sin alcanzar la significación estadística. Resultados, que estarían en la misma línea que los obtenidos en el presente estudio.

Transferir en fase de mórula significa transferir en un momento fisiológicamente coherente en relación a la receptividad endometrial, si bien es cierto que la mórula forma parte de un estadio embrionario intermedio entre el estadio de células y el estadio de blastocisto, y la selección de los embriones compactados todavía supone un reto desde el punto de vista de la embriología clínica. En nuestro país, ASEBIR sí que ha realizado una clasificación de los embriones en estadio de mórula que se muestra en el apartado de introducción.

En marzo de 2019 M. Simopoulo et al. (18) publicaron el mayor y más reciente metaanálisis que se ha publicado con respecto a la transferencia de embriones en día 4 de cultivo. El análisis incluye 15 estudios (9 retrospectivos y 6 prospectivos) y presenta resultados reproductivos y perinatales resultantes de comparar la transferencia de día 4 con día 2, día 3 y día 5 respectivamente. Las transferencias embrionarias incluidas fueron de un máximo de 2 embriones por transferencia.

Los resultados muestran que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la tasa de embarazo clínico y la tasa de aborto clínico en ninguna de las comparaciones realizadas. El principal sesgo del metaanálisis es el carácter retrospectivo de 9 de los estudios. El estudio concluye que la TE en día 4 es una opción a tener en cuenta en todo el abanico de posibilidades de transferencia embrionaria en ciclos de FIV, ya que oferta unos resultados al menos iguales a los obtenidos tanto en

las TE en estadio de células como en estadio de blastocisto. Los resultados del metaanálisis de Simopaulo estarían en consonancia con los del presente estudio, ya que tampoco objetivamos diferencias en ambos grupos de estudio en lo referente a las tasas de embarazo clínico y de aborto del primer trimestre.

En nuestros resultados comparando la TE en día 3 frente a día 4, observamos que la tasa de implantación, gestación, gestación clínica, supervivencia embrionaria y gestación múltiple fueron equiparables entre ambos grupos de estudio. Es cierto que los resultados en todas las tasas calculadas fueron discretamente superiores en día 4 con respecto a día 3, pero sin alcanzar la significación estadística, por lo que consideramos a ambos grupos homogéneos aunque con una tendencia a encontrar resultados favorables en día 4.

Son, por tanto, datos coherentes con la mayor parte de lo expuesto previamente en la literatura. Podemos afirmar que la transferencia embrionaria en día 4 es una opción totalmente válida que se puede incorporar a nuestra práctica clínica diaria sin temor a que suponga un detrimento en los resultados reproductivos de nuestros pacientes, sino todo lo contrario, sus resultados son al menos iguales a los obtenidos en día 3 de vida embrionaria.

La comparación de las transferencias en día 4 de cultivo frente a día 5 no ha sido objeto del presente estudio, pero puede ser de interés la discusión de los resultados reproductivos al respecto, ya que transferir en día 5 es considerado actualmente la tendencia a seguir en la práctica clínica habitual.

Kang et al. publicaron un estudio (95) que compara resultados reproductivos entre transferencias de mórulas y blastocistos en mujeres menores de 37 años que estaban siendo sometidas a la primera o segunda TE en fresco. La tasa de gestación clínica y la de implantación fueron completamente equiparables en los dos grupos, por lo que concluyen igualmente que la TE en día 4 es una opción totalmente aplicable en la práctica clínica. En consonancia con el estudio de Kang et al., encontramos el estudio de Lee et al. (95) que comparaba los resultados reproductivos entre día 4 y día 5 de cultivo y entre sus principales resultados encontraron que la tasa de implantación fue superior en el grupo de día 5, que la tasa de gestación clínica y la tasa de gestación múltiple no difirieron entre ambos grupos de estudio, por lo que, el artículo concluye que transferir en día 4 es una opción factible que aporta mayor flexibilidad y que no afecta negativamente a los resultados obtenidos.

Holsbach et al. (96) comparan resultados reproductivos tras TE en día 4 frente a día 5, usando un sistema de time-lapse para la selección embrionaria, y demuestra que tanto la tasa de implantación como la de gestación clínica son equiparables, y no hay entre ellas diferencias estadísticamente significativas, por lo que propone la realización de cultivo largo indistintamente en día 4 o 5 de vida embrionaria en función de la disponibilidad del clínico, del laboratorio de embriología y del paciente. En esta misma línea, encontramos el estudio del grupo de Feil et al. (3) que observa una tasa de gestación clínica totalmente comparable entre TE realizadas en día 4 y día 5 de cultivo. Concluye por tanto, que transferir en día 4 de cultivo es una opción que no presenta desventajas en comparación con el día 5 y que dota de una mayor flexibilidad a nivel logístico.

El estudio retrospectivo publicado por R-S Li et al. en 2018 (2) compara transferencias embrionarias de mórulas con blastocistos y muestra los siguientes resultados: en la tasa de embarazo clínico y en la tasa de implantación no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. Este estudio postula que la TE de día 4 presenta una ventaja importante sobre el día 5 en lo referente a que el embrión es transferido a la cavidad uterina un día antes, por lo que se maximiza el tiempo de exposición al ambiente uterino materno (considerado el “más fisiológico”) y minimiza el tiempo in vitro por lo que reduciría las anomalías epigenéticas.

Conociendo que la tendencia actual es la de transferir en estadio de blastocisto, el hecho de que la literatura que compara las transferencias en día 4 y día 5 de cultivo no muestre diferencias importantes en lo referente a los resultados reproductivos, avala que la transferencia en estadio de mórula deba ser considerada como una buena opción a tener en cuenta en la práctica clínica diaria.

6.3 Discusión de resultados obstétricos y perinatales

En cuanto a nuestro objetivo secundario que ha sido analizar los resultados obstétricos y perinatales obtenidos en las gestaciones y partos procedentes de transferir en día 3 o en día 4 de vida embrionaria, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, por lo que el hecho de mantener en cultivo un día

más a los embriones no ha modificado el curso de los embarazos ni la finalización de los mismos.

Si comparamos los resultados obstétricos y perinatales que se obtienen tras técnicas de reproducción asistida frente a los obtenidos tras gestaciones espontáneas, la alta incidencia de gestación múltiple es en gran parte la responsable de la obtención de resultados menos favorables tras realización de TRA.

Otro punto relevante es la mayor edad de las mujeres que se someten a TRA, que cada día se eleva, pero también podrían influir los eventos asociados a la técnica de reproducción en sí misma (medicación hormonal administrada, manipulación de gametos en el laboratorio, medios de cultivo embrionarios empleados, congelación y descongelación de embriones).

Aun así, a nivel mundial se han observado diferencias de prevalencia llamativas, siendo Europa y Norte América los continentes con menor presencia de estos peores resultados obstétricos y perinatales, por lo que los factores de riqueza socioeconómica del país y sus recursos sanitarios parecen, como es lógico, estar influyendo (97).

Si revisamos la literatura y bibliografía que compara los resultados obstétricos y perinatales de gestaciones conseguidas tras TE de blastocistos y tras TE de embriones en estadio de células comprobamos que hay numerosos estudios. Sin embargo, no ocurre así en TE en día 4 de cultivo, donde comprobamos que son muy escasas las publicaciones que exponen los resultados obstétricos y perinatales (98).

Los estudios que publican resultados perinatales de gestaciones conseguidas tras transferencias de día 4, en general incluyen a este día junto a los días 2 y 3 y los comparan con los obtenidos en días 5 y 6. De hecho la mayoría de los artículos encuentra una mayor tasa de parto prematuro (por debajo de la semana 37) en el estadio de blastocisto (días 5 y 6) en comparación con el estadio de células al que añaden al día 4 (19)(20)(21)(18).

La revisión sistemática y metaanálisis publicada en 2014 por S. Dar et al. (19) estudia los resultados obstétricos y perinatales derivados de gestaciones únicas conseguidas tras transferencias embrionarias en estadio de células (días 2, 3 y 4) frente a estadio de blastocisto (días 5 y 6). Encuentran diferencias significativas en cuanto a mayor tasa de parto prematuro (menor de 37 semanas), OR: 1,32, $p= 0,00001$ y de malformaciones congénitas OR: 1,29, $p= 0,003$ en el grupo de niños nacidos tras transferencia en

estadio de blastocisto (días 5 y 6). En nuestro estudio sin embargo la incidencia de parto pretérmino fue 13,5 % en el grupo de TE en día 3 y de 17,1 % en el grupo de día 4 sin objetivarse diferencias significativas entre ambos grupos (RR= 0,94, p= 0,38). En el caso de las malformaciones congénitas estructurales se presentaron en un 2 y 3 % de las gestaciones conseguidas tras día 3 y día 4 de cultivo (RR= 1,42, p= 0,69) sin que el evento de transferir en uno u otro día parezca influir en su aparición. Debemos tener en cuenta que en el metaanálisis de Dar incluyen al día 4 con el grupo de embriones que se encuentran en estadio de células. Nosotros nos inclinamos por considerar al día 4 como una opción dentro del cultivo largo en la que técnicamente no se pueden diferenciar las células que componen la mórula, por lo que no se podría considerar estadio celular propiamente dicho, pero es la comunidad científica, la que debería estandarizar a que grupo de vida embrionaria pertenecen las mórulas o embriones compactados.

Un metaanálisis publicado en 2017 (20) por Wang et al. que incluye 12 estudios controlados y aleatorizados, concluye, que existe mayor incidencia de parto pretérmino (menor de 37 semanas) en las transferencias realizadas en blastocisto (día 5 y 6) en comparación con las TE en estadio de células (día 2, 3 y 4) (RR= 1,11). En este mismo trabajo el riesgo relativo de recién nacido con bajo peso al nacer (menor de 2500 g) fue inferior en las TE de blastocistos (RR= 0,83). En consonancia con estos resultados, encontramos el metaanálisis de Maheshwari et al. (21) que publica una revisión sistemática y metaanálisis que incluía 8 estudios controlados y aleatorizados y comparaba los resultados obstétricos y perinatales ocurridos en gestaciones únicas conseguidas en ciclos de FIV tras TE de blastocistos (día 5) frente a embriones en estadio de células (días 2 y 3). La tasa de prematuridad por debajo de la semana 37 (RR= 1,27) y de semana 32 (RR= 1,22) es mayor en TE de día 5 y la tasa de recién nacido con bajo peso al nacer es también inferior en TE de blastocistos (RR= 0,82).

En nuestro grupo, no encontramos diferencias significativas en cuanto al peso de los recién nacidos y su relación con el día de la transferencia. La incidencia de recién nacido con bajo peso al nacer (menor de 2500 gramos) fue de 18,3% y 12,2 % en día 3 y día 4 respectivamente (RR= 0,64, p= 0,23).

Se observa la tendencia en los trabajos comentados a encontrar mayor incidencia de parto prematuro y menor de recién nacido con bajo peso al nacer, en los casos de TE de blastocistos en comparación con día 3. Pues bien, esa tendencia no parece extrapolarse a

la comparativa establecida en nuestro estudio que es la de embriones transferidos en día 4 frente a día 3 de cultivo, ya que la prematuridad y el bajo peso al nacer por debajo de los 2500 g fueron similares en ambos grupos estudiados.

Todas las revisiones comentadas incluyen estudios que contemplan TE tanto de embriones frescos como de embriones criopreservados.

No hay apenas resultados obstétricos y perinatales publicados de gestaciones conseguidas tras TE de día 4 y que se comparen con los de día 3.

El reciente metaanálisis de Simopoulou (18) compara específicamente el día 4 con el día 2, 3 y 5, y objetiva una reducción relativa del riesgo de parto prematuro (RR: 0.19, $p=0,01$) en la transferencia embrionaria en día 4 en comparación con día 5 en uno de los nueve estudios de los que está compuesto el metaanálisis, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Nuestro estudio, comparando el día 4 con respecto al 3, encuentra una reducción relativa del riesgo de parto pretérmino (por debajo de 37semanas) del 6% en día 4 frente a día 3, pero en nuestro caso la reducción no fue estadísticamente significativa (RR: 0,94, $p=0,38$).

En el estudio previamente citado de Kang et al. (94), la tasa de recién nacido pretérmino fue más baja en el grupo de TE en mórula que en día 5 (0 % vs. 6.4 %, $p=0,07$), este dato estaría en consonancia con lo que afirma el estudio de R-S Li et al. (2) y es que la tasa de recién nacido a término fue significativamente superior en el grupo de día 4 frente a día 5 (95.7 % vs. 79.5 %, $p=0,006$). En nuestro caso, no hemos objetivado una correlación entre el aumento de la prematuridad y el día de 4 de cultivo, es decir por el hecho de dejar al embrión 1 día adicional de cultivo este evento no presenta mayor prevalencia.

Nuestro trabajo en cuanto a patología obstétrica se refiere no encuentra diferencias entre los dos grupos de estudio: determinadas variables como la colestasis intrahepática o la preeclampsia presentan aparentemente mayor asociación con la TE en día 4, pero esta lectura del análisis debe ser extremadamente prudente ya que la incidencia de casos ha sido muy baja en nuestra población de estudio.

Además, se observó una reducción relativa del riesgo de padecer diabetes gestacional en día 4 con respecto a día 3 del 27 % (RR= 0,73, $p=0,17$), lo que muestra una cierta

tendencia clínica a la disminución de este evento tras TE de mórulas, pero estrictamente el dato no es significativo desde el punto de vista estadístico.

Con respecto a los datos de patología fetal, quizás puede llamar más la atención la reducción relativa del riesgo de feto pequeño para edad gestacional (PEG) del 69 % (RR= 0,31, p= 0,15), en día 4 con respecto a día 3. La baja incidencia de este evento (feto PEG) en nuestra población de estudio hace que este resultado no se pueda interpretar literalmente como una reducción real del riesgo.

En cuanto al resto de resultados perinatales, tan solo comentar la reducción relativa del riesgo de embarazo múltiple del 9%, de cesárea del 10% y de recién nacido con bajo peso al nacer (por debajo de 2500 g) del 36 % en día 4 frente a día 3, lo que muestra al menos en nuestro estudio, una cierta tendencia clínica a la disminución de la asociación de estos eventos con la TE de mórulas. Quizás, este último punto de observar menor prevalencia de fetos con bajo peso al nacer (por debajo de 2500 g) en el grupo de transferencia embrionaria en día 4 está en consonancia con lo que mayoritariamente se ha encontrado en la literatura científica al respecto; el hecho de que realizando cultivo largo los fetos presentan menor asociación con este diagnóstico.

6.4 Limitaciones

Los resultados de este estudio pueden ser útiles y valiosos en el ejercicio de nuestra práctica clínica habitual, pero cabe reseñar ciertas limitaciones del diseño del mismo.

Es un estudio retrospectivo que muestra cual ha sido nuestra experiencia durante 5 años, pero cuenta con las limitaciones propias de este tipo de diseño, esto es, que al no involucrar la secuencia de tiempo no demuestra causalidad.

El diseño del estudio no se ha planteado como un estudio de no inferioridad del día 4 con respecto al día 3, aunque hubiera sido una idea interesante, ya que el tamaño muestral requerido para que la potencia no mermara distaba mucho del tamaño con el que contábamos en nuestra unidad.

El tamaño muestral con el que hemos trabajado, si bien no es bajo (850 transferencias embrionarias), puede considerarse discreto en relación con el gran número de variables estudiadas, lo cual incrementa la dificultad del análisis. Ha habido datos perdidos a lo largo del estudio en lo que se refiere a los resultados obstétricos y perinatales, en la mayor parte de casos se debe a pacientes que han realizado la TRA en nuestro centro por considerarse de referencia para dicha práctica pero posteriormente tanto el

seguimiento del embarazo, como el parto han tenido lugar en sus hospitales de referencia o en centros privados de la Comunidad de Madrid. A pesar de ello, la información se ha logrado recuperar por medio del portal HORUS de la red de hospitales públicos de la Comunidad de Madrid y a través de contacto telefónico.

Por último, otro punto a tener en cuenta, es que no todas las pacientes han sido sometidas a transferencia de embrión único en este estudio. La transferencia de embrión único aporta información individualizada relativa a cada embrión transferido. Los ciclos en los que se transfiere más de un embrión aportan información más compleja de analizar, ya que no se puede determinar con certeza el potencial de implantación de cada embrión.

6.5 Fortalezas

El presente estudio muestra nuestra experiencia y resultados transfiriendo embriones en día 4 de cultivo. La transferencia en estadio de mórula no es una práctica habitual en los ciclos de fecundación in vitro, motivo que justifica la escasez de literatura científica publicada al respecto. Este estudio supone una aportación en esta línea y lo consideramos por tanto una fortaleza.

Otra de las más importantes fortalezas de este trabajo es que es uno de los pocos trabajos que publica resultados perinatales de gestaciones conseguidas tras TE en día 4 de cultivo embrionario y los compara con día 3. Si bien es cierto que hacen falta más estudios bien diseñados que avalen los resultados obtenidos en esta tesis. Trabajos como este son el principio para comenzar a arrojar luz en cuanto a la transferencia en día 4 se refiere. También es necesario estandarizar una clasificación embrionaria en día 4, publicar series de casos de TE realizadas en día 4 (tanto en fresco como en ciclos de embriones congelados), realizar estudios que comparen el día 4 con el día 3 y 5 y obtener conclusiones con evidencia científica al respecto.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. Los resultados reproductivos obtenidos en el presente estudio no encuentran diferencias estadísticamente significativas en los dos grupos de estudio, criotransferencia embrionaria en día 3 y en día 4 de cultivo. Las tasas de implantación y embarazo clínico obtenidas en el grupo de transferencia embrionaria en día 4 muestran una tendencia favorable con respecto al día 3.
2. La tasa de aborto clínico es similar en los dos grupos de estudio, aunque existe una tendencia favorable en lo referente a este evento en el grupo de transferencia embrionaria en día 3.
3. No se encuentran diferencias significativas entre ambos grupos de estudio en cuanto a tasa de embarazo múltiple.
4. Los resultados obtenidos en cuanto a prevalencia de patología obstétrica han sido similares entre ambos grupos de estudio.
5. No se encuentran diferencias en lo referente a la prevalencia de patología fetal entre ambos grupos de estudio.
6. Los resultados perinatales obtenidos son equiparables en los dos grupos de estudio. La frecuencia con la que se finalizó la gestación mediante cesárea fue mayor en día 3 en comparación con día 4, pero sin alcanzar significación estadística.
7. La transferencia embrionaria en día 4 de cultivo es una buena opción aplicable a la rutina clínica diaria, con resultados al menos iguales a los obtenidos en día 3.

8. Es necesaria la realización de estudios prospectivos que profundicen en la transferencia embrionaria de mórulas tanto en fresco como en ciclos de embriones congelados, que avalen estos resultados y que permitan la sistematización de la transferencia embrionaria en día 4 en la práctica clínica habitual.

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Medicina M. Revista Iberoamericana de Fertilidad :: Ventajas e inconvenientes de la transferencia embrionaria en + 3 y en blastocisto Número actual Números anteriores Editorial Buscador Autores Cartas al editor Comité editorial Contactar Ventajas e inconvenientes de . 2016;(6):1–6.
2. Li RS, Hwu YM, Lee RKK, Li SH, Lin MH. Day 4 good morula embryo transfer provided compatible live birth rate with day 5 blastocyst embryo in fresh IVF/ET cycles. Taiwan J Obstet Gynecol [Internet]. 2018;57(1):52–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.12.008>
3. Feil D, Henshaw RC, Lane M. Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. Hum Reprod. 2008;23(7):1505–10.
4. Coticchio G, Lagalla C, Sturmey R, Pennetta F, Borini A. The enigmatic morula: mechanisms of development, cell fate determination, self-correction and implications for ART. Hum Reprod Update [Internet]. 2019 Jul 1;25(4):422–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30855681>
5. Kiltz RJ, Woodhouse DJ, Miller DB, Sciera M, Corona JT, Fertility CNY. S126

Abstracts. 2003;80(12):2003.

6. Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R. The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod*. 2002;17(6):1513–8.
7. Mateizel I, Santos-Ribeiro S, Done E, Van Landuyt L, Van De Velde H, Tournaye H, et al. Do ARTs affect the incidence of monozygotic twinning? *Hum Reprod*. 2016;31(11):2435–41.
8. Sullivan-Pyke CS, Senapati S, Mainigi MA, Barnhart KT. In Vitro fertilization and adverse obstetric and perinatal outcomes. *Semin Perinatol* [Internet]. 2017;41(6):345–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.semperi.2017.07.001>
9. Marconi N, Raja EA, Bhattacharya S, Maheshwari A. Perinatal outcomes in singleton live births after fresh blastocyst-stage embryo transfer: a retrospective analysis of 67 147 IVF/ICSI cycles. *Hum Reprod* [Internet]. 2019 Sep 29;34(9):1716–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31418775>
10. Goto Y, Kanzaki H, Nakayama T, Takabatake K, Himeno T, Mori T, et al. Huisman 2000. *J Assist Reprod Genet* [Internet]. 1994 Sep;11(8):401–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7606152>
11. Huisman GJ, Alberda AT, Leerentveld RA, Verhoeff A, Zeilmaker GH. A comparison of in vitro fertilization results after embryo transfer after 2, 3, and 4 days of embryo culture. *Fertil Steril* [Internet]. 1994 May;61(5):970–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8174739>
12. Fabozzi G, Alteri A, Rega E, Starita MF, Piscitelli C, Giannini P, et al. Morphological assessment on day 4 and its prognostic power in selecting viable embryos for transfer. *Zygote*. 2016;24(4):477–84.
13. Pantos K, Makrakis E, Chronopoulou M, Biba M, Perdikaris A, Dafereras A. Day 4 versus day 3 embryo transfer: a prospective study of clinical outcomes. *Fertil Steril*. 2008;89(3):573–7.
14. Huisman GJ, Fauser BC, Eijkemans MJ, Pieters MH. Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril* [Internet]. 2000 Jan;73(1):117–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10632424>
15. Margreiter M, Weghofer A, Kogosowski A, Mahmoud KZ, Feichtinger W. A

- prospective randomized multicenter study to evaluate the best day for embryo transfer: Does the outcome justify prolonged embryo culture? *J Assist Reprod Genet.* 2003;20(2):91–4.
16. Montag M, Ven K Van Der, Dorn C, Ven H Van Der. Extended embryo culture reduces the implantation rate on day 4 and day 5 when only a maximum of three embryos are cultured beyond the pronuclear stage. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;124(1):65–9.
 17. Day 3 versus Day 4 Embryo Transfer: Does One Day Make a Difference? P. Saadat, H. Yang, R. Salem. Pacific Reproductive Center. ASRM 2004. Abstracts of the 60th Annual Meeting of the American Society for Reproductive Medicine. October 16-20, 2004, Philadel. *Fertil Steril* [Internet]. 2004 Sep;82 Suppl 2:S1-383. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15484390>
 18. Simopoulou M, Sfakianoudis K, Tsioulou P, Rapani A, Maziotis E, Giannelou P, et al. Should the flexibility enabled by performing a day-4 embryo transfer remain as a valid option in the IVF laboratory? A systematic review and network meta-analysis. *J Assist Reprod Genet.* 2019;14–6.
 19. Dar S, Lazer T, Shah PS, Librach CL. Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2014;20(3):439–48.
 20. Wang X, Du M, Guan Y, Wang B, Zhang J, Liu Z. Comparative neonatal outcomes in singleton births from blastocyst transfers or cleavage-stage embryo transfers: A systematic review and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol.* 2017;15(1):1–12.
 21. Maheshwari A, Kalampokas T, Davidson J, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of blastocyst-stage versus cleavage-stage embryos generated through in vitro fertilization treatment: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013;100(6).
 22. No Title Sociedad Española de Fertilidad (SEF).
 23. Artley JK, Braude PR, Johnson MH. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 1992 Aug;7(7):1014–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1430119>
 24. Sabhnani T V, Elaimi A, Sultan H, Alduraim A, Serhal P, Harper JC. Increased incidence of mosaicism detected by FISH in murine blastocyst cultured

- in vitro. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2011 Jun;22(6):621–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530405>
25. Ruiz-Alonso M, Blesa D, Díaz-Gimeno P, Gómez E, Fernández-Sánchez M, Carranza F, et al. The endometrial receptivity array for diagnosis and personalized embryo transfer as a treatment for patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* [Internet]. 2013 Sep;100(3):818–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23756099>
 26. Woolcott R, Stanger J. Potentially important variables identified by transvaginal ultrasound-guided embryo transfer. *Hum Reprod* [Internet]. 1997 May;12(5):963–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9194648>
 27. Sallam HN, Sadek SS. Ultrasound-guided embryo transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril* [Internet]. 2003 Oct;80(4):1042–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556831>
 28. Botta G, Grudzinskas G. Is a prolonged bed rest following embryo transfer useful? *Hum Reprod* [Internet]. 1997 Nov;12(11):2489–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9436691>
 29. Amarin ZO, Obeidat BR. Bed rest versus free mobilisation following embryo transfer: a prospective randomised study. *BJOG* [Internet]. 2004 Nov;111(11):1273–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15521874>
 30. McDonald JA, Norman RJ. A randomized controlled trial of a soft double lumen embryo transfer catheter versus a firm single lumen catheter: significant improvements in pregnancy rates. *Hum Reprod* [Internet]. 2002 Jun;17(6):1502–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042268>
 31. Frankfurter D, Trimarchi JB, Silva CP, Keefe DL. Middle to lower uterine segment embryo transfer improves implantation and pregnancy rates compared with fundal embryo transfer. *Fertil Steril* [Internet]. 2004 May;81(5):1273–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15136089>
 32. Coroleu B, Carreras O, Veiga A, Martell A, Martinez F, Belil I, et al. Embryo transfer under ultrasound guidance improves pregnancy rates after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* [Internet]. 2000 Mar;15(3):616–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686207>
 33. Edwards RG. Physiological and molecular aspects of human implantation. *Hum*

- Reprod [Internet]. 1995 Dec;10 Suppl 2:1–13. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8745296>
34. Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. Hum Reprod [Internet]. 2000 Aug;15(8):1781–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920103>
 35. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, et al. Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. Hum Reprod [Internet]. 2004 Dec;19(12):2849–58. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471934>
 36. Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJG, Klein BM, et al. Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. Reprod Biomed Online [Internet]. 2013 Oct;27(4):353–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953585>
 37. Capalbo A, Treff NR, Cimadomo D, Tao X, Upham K, Ubaldi FM, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization and quantitative real-time PCR-based aneuploidy screening of blastocyst biopsies. Eur J Hum Genet [Internet]. 2015 Jul;23(7):901–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25351780>
 38. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. Fertil Steril [Internet]. 2011 Feb;95(2):520–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20537630>
 39. Herbemont C, Sarandi S, Boujenah J, Cedrin-Durnerin I, Sermondade N, Vivot A, et al. Should we consider day-2 and day-3 embryo morphology before day-5 transfer when blastocysts reach a similar good quality? Reprod Biomed Online [Internet]. 2017 Nov;35(5):521–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28887104>
 40. Yang L, Cai S, Zhang S, Kong X, Gu Y, Lu C, et al. Single embryo transfer by Day 3 time-lapse selection versus Day 5 conventional morphological selection: a randomized, open-label, non-inferiority trial. Hum Reprod [Internet].

- 2018;33(5):869–76. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29546361>
41. SS W, HX S. Blastocyst transfer ameliorates live birth rate compared with cleavage-stage embryos transfer in fresh in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection cycles: reviews and meta-analysis. *Yonsei Med J* [Internet]. 2014;55(3):815–25. Available from:
<http://www.epistemikos.org/documents/708457e5ee14e91990259234206dd3f753882cc5>
 42. Glujovsky D, Farquhar C. Cleavage-stage or blastocyst transfer: what are the benefits and harms? *Fertil Steril*. 2016;106(2):244–50.
 43. Kathiresan A, Wang ET, Greene N, Alexander CJ, Pisarska MD. Abnormal implantation in day 3 versus day 5 embryo transfers in fresh IVF cycles: an analysis from the society for assisted reproductive technology database. *Fertil Steril*. 2015;104(3):e99.
 44. Fang C, Huang R, Wei L-N, Jia L. Frozen-thawed day 5 blastocyst transfer is associated with a lower risk of ectopic pregnancy than day 3 transfer and fresh transfer. *Fertil Steril* [Internet]. 2015 Mar;103(3):655-61.e3. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25542820>
 45. Thomas MR, Sparks AE, Ryan GL, Van Voorhis BJ. Clinical predictors of human blastocyst formation and pregnancy after extended embryo culture and transfer. *Fertil Steril* [Internet]. 2010 Jul;94(2):543–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19409548>
 46. Singh R, Singh M. A prospective randomised controlled study comparing the cost effectiveness of IVF-ICSI treatment: cleavage stage (day 3) embryo transfer versus extended culture (day 5/6 blastocyst) transfer. *Fertil Steril*. 2013;100(3):S289.
 47. Maalouf WE, Mincheva MN, Campbell BK, Hardy ICW. Effects of assisted reproductive technologies on human sex ratio at birth. *Fertil Steril* [Internet]. 2014 May;101(5):1321–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602756>
 48. Gianaroli L, Magli MC, Munné S, Fortini D, Ferraretti AP. Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J Assist Reprod Genet*. 1999;16(4):170–5.
 49. Skorupski JC, Stein DE, Acholonu U, Field H, Keltz M. Successful pregnancy

- rates achieved with day 4 embryo transfers. *Fertil Steril* [Internet]. 2007 Apr;87(4):788–91. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224153>
50. Ebner T, Vanderzwalmen P, Shebl O, Urdl W, Moser M, Zech NH, et al. Morphology of vitrified/warmed day-5 embryos predicts rates of implantation, pregnancy and live birth. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2009 Jul;19(1):72–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19573294>
 51. Ivec M, Kovacic B, Vlaisavljevic V. Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil Steril* [Internet]. 2011 Dec;96(6):1473-1478.e2. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21982283>
 52. Buster JE. Embryo donation by uterine flushing and embryo transfer. *Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 1985 Dec;12(4):815–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3914384>
 53. Menezo Y, Testart J, Perrone D. Serum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo culture, and transfer. *Fertil Steril* [Internet]. 1984 Nov;42(5):750–5. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6489547>
 54. Gardner DK, Kelley RL. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. *J Dev Orig Health Dis* [Internet]. 2017 Aug;8(4):418–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28610639>
 55. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J, Meintjes M, Chantilis SJ, Molnar L, et al. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril* [Internet]. 2015 Dec;104(6):1452-9.e1-4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26409153>
 56. Youssef MMA, Mantikou E, van Wely M, Van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, et al. Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane database Syst Rev* [Internet]. 2015 Nov 20;(11):CD007876. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26585317>
 57. ASEBIR. Cuadernos de embriología clínica. Criterios ASEBIR de Valoración Morfológica de Oocitos, Embriones Tempranos y Blastocistos Humanos. 3^a

Edición, 2015. ISSN: 1888-8011.

58. ASEBIR G de I de E de, Marta Moragas (Hospital Quirón Barcelona, España), M^a José Torelló (Hospital Quirón Barcelona, España) FP (Hospital, Montepíncipe, Madrid, España), Victoria Hurtado de Mendoza (masvida Reproducción, Sevilla, España) MJ de los S (Instituto, Valenciano de Infertilidad, Valencia, España), Ana Busquets (Centro Médico Teknon, Barcelona, España) MJFF, Marbella, España), Amaia Mujica (IBILAB, Palma de Mallorca, España), Beatriz González (Hospital Rio Hortega, Valladolid, España) M, Ángel Vilches (Complejo Hospitalario Torrecárdenas, Almería, España), María Carme Pons (Centro Médico Teknon, Barcelona, España) G, et al. No TitleD+4, REVISIÓN MORFOLÓGICA Y CATEGORIZACIÓN EMBRIONARIA EN EMBRYOS, MORPHOLOGICAL REVIEW AND EMBRYO SCORING SYSTEM FOR DAY-4.
59. Goodman LR, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N. Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* [Internet]. 2016 Feb;105(2):275-85.e10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26522611>
60. Kieslinger DC, De Gheselle S, Lambalk CB, De Sutter P, Kosteljik EH, Twisk JWR, et al. Embryo selection using time-lapse analysis (Early Embryo Viability Assessment) in conjunction with standard morphology: a prospective two-center pilot study. *Hum Reprod* [Internet]. 2016;31(11):2450–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27619774>
61. Tannus S, Cohen Y, Henderson S, Son W-Y, Tulandi T. The Effect of Assisted Hatching on Live Birth Rate Following Fresh Embryo Transfer in Advanced Maternal Age. *Reprod Sci* [Internet]. 2019 Jun;26(6):806–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30213229>
62. Lu X, Liu Y, Cao X, Liu S-Y, Dong X. Laser-assisted hatching and clinical outcomes in frozen-thawed cleavage-embryo transfers of patients with previous repeated failure. *Lasers Med Sci* [Internet]. 2019 Aug;34(6):1137–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30627926>
63. Grifo JA, Giatras K, Tang YX, Krey LC. Successful outcome with day 4 embryo transfer after preimplantation diagnosis for genetically transmitted diseases. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 Jun;13(6):1656–9. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9688408>
64. Munné S, Cohen J. Advanced maternal age patients benefit from preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril* [Internet]. 2017;107(5):1145–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28390694>
 65. Scott R, Williams C, Ehrich K, Farsides B. Donation of “spare” fresh or frozen embryos to research: who decides that an embryo is “spare” and how can we enhance the quality and protect the validity of consent? *Med Law Rev* [Internet]. 2012;20(3):255–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22647978>
 66. Gleicher N, Metzger J, Croft G, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. A single trophectoderm biopsy at blastocyst stage is mathematically unable to determine embryo ploidy accurately enough for clinical use. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2017 Apr 27;15(1):33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28449669>
 67. Zakharova EE, Zaletova V V., Krivokharchenko AS. Biopsy of human morula-stage embryos: Outcome of 215 IVF/ICSI cycles with PGS. *PLoS One*. 2014;9(9).
 68. Mukaida T, Wada S, Takahashi K, Pedro PB, An TZ, Kasai M. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8-cell mouse embryos. *Hum Reprod* [Internet]. 1998 Oct;13(10):2874–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804248>
 69. Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche C, Standaert V, van Roosendaal E, Vandervorst M, et al. Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* [Internet]. 2002 Mar;17(3):744–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11870130>
 70. Ling XF, Zhang JQ, Cao SR, Chen J, Peng Y, Guo X, et al. Effect of cryotop vitrification on preimplantation developmental competence of murine morula and blastocyst stage embryos. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2009 Nov;19(5):708–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021719>
 71. Londra L, Moreau C, Strobino D, Garcia J, Zacur H, Zhao Y. Ectopic pregnancy after in vitro fertilization: differences between fresh and frozen-thawed cycles. *Fertil Steril* [Internet]. 2015 Jul;104(1):110–8. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25956363>
72. Shapiro BS, Daneshmand ST, De Leon L, Garner FC, Aguirre M, Hudson C. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* [Internet]. 2012 Dec;98(6):1490–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22925683>
 73. Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C, Thomas S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* [Internet]. 2011 Aug;96(2):344–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737072>
 74. Ubaldi FM, Cimadomo D, Capalbo A, Vaiarelli A, Buffo L, Trabucco E, et al. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy testing in women older than 44 years: a multicenter experience. *Fertil Steril* [Internet]. 2017;107(5):1173–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28433373>
 75. Chaouat G. Inflammation, NK cells and implantation: friend and foe (the good, the bad and the ugly?): replacing placental viviparity in an evolutionary perspective. *J Reprod Immunol* [Internet]. 2013 Mar;97(1):2–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347505>
 76. Horcajadas JA, Mínguez P, Dopazo J, Esteban FJ, Domínguez F, Giudice LC, et al. Controlled ovarian stimulation induces a functional genomic delay of the endometrium with potential clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2008 Nov;93(11):4500–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18697870>
 77. Lattes K, Checa MA, Vassena R, Brassesco M, Vernaev V. There is no evidence that the time from egg retrieval to embryo transfer affects live birth rates in a freeze-all strategy. *Hum Reprod* [Internet]. 2017;32(2):368–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27986819>
 78. Zeng MF, Su SQ, Li LM. Comparison of pregnancy outcomes after vitrification at the cleavage and blastocyst stage: a meta-analysis. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(1):127–34.
 79. Liao AW, Heath V, Kametas N, Spencer K, Nicolaides KH. First-trimester screening for trisomy 21 in singleton pregnancies achieved by assisted reproduction. *Hum Reprod* [Internet]. 2001 Jul;16(7):1501–4. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11425838>
80. Farhi J, Ben-Haroush A, Haroush A Ben, Andrawus N, Pinkas H, Sapir O, et al. High serum oestradiol concentrations in IVF cycles increase the risk of pregnancy complications related to abnormal placentation. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2010 Sep;21(3):331–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20688571>
 81. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016 Dec;215(6):684–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27717732>
 82. Labarta E, Mariani G, Holtmann N, Celada P, Remohí J, Bosch E. Low serum progesterone on the day of embryo transfer is associated with a diminished ongoing pregnancy rate in oocyte donation cycles after artificial endometrial preparation: a prospective study. *Hum Reprod* [Internet]. 2017 Dec 1;32(12):2437–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29040638>
 83. Gaggiotti-Marre S, Martinez F, Coll L, Garcia S, Álvarez M, Parriego M, et al. Low serum progesterone the day prior to frozen embryo transfer of euploid embryos is associated with significant reduction in live birth rates. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2019 May;35(5):439–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30585507>
 84. Casper RF, Yanushpolsky EH. Optimal endometrial preparation for frozen embryo transfer cycles: window of implantation and progesterone support. *Fertil Steril* [Internet]. 2016 Apr;105(4):867–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26820769>
 85. Kuijsters NPM, Methorst WG, Kortenhorst MSQ, Rabotti C, Mischi M, Schoot BC. Uterine peristalsis and fertility: current knowledge and future perspectives: a review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online* [Internet]. 2017 Jul;35(1):50–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28456372>
 86. No Title Estudio de la reserva funcional ovárica. Sociedad Española de Fertilidad. Enrique Pérez de la Blanca. Quirón. Málaga, España.
 87. No Title Protocolos de Neonatología, Sociedad Española de Neonatología. Asociación española de Pediatría.

88. Hsieh CE, Lee RKK, Sun FJ, Li RS, Lin SY, Lin MH, et al. Early blastulation (EB) of day 4 embryo is predictive of outcomes in single embryo transfer (SET) cycles. *Taiwan J Obstet Gynecol* [Internet]. 2018;57(5):705–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.08.016>
89. Fabozzi G, Alteri A, Rega E, Starita MF, Piscitelli C, Giannini P, et al. Morphological assessment on day 4 and its prognostic power in selecting viable embryos for transfer. *Zygote* [Internet]. 2016 Aug;24(4):477–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26350430>
90. Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MRW. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod* [Internet]. 2010 Dec;83(6):938–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20702853>
91. Martins WP, Nastri CO, Rienzi L, van der Poel SZ, Gracia C, Racowsky C. Blastocyst vs cleavage-stage embryo transfer: systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2017;49(5):583–91.
92. Green KA, Patounakis G, DeCherney A, Graham J, Tucker MJ, Widra EA, et al. Day 3 embryo transfer (ET) versus pushing to day 5 in patients with few embryos. *Fertil Steril* [Internet]. 2016;106(3):e165. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.487>
93. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod* [Internet]. 2008 Jan;23(1):91–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965420>
94. Robert J. Kiltz, Debra J. Woodhouse, Donna B. Miller, Ann Marie Sciera, Jennifer T. Corona. CNY Fertility Ctr, Syracuse, NY. ASRM 2003. Abstracts of the 59th annual meeting. *Fertil Steril* [Internet]. 2003 Sep;80 Suppl 3:S1-347. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14587500>
95. Lee SH, Lee HS, Lim CK, Park YS, Yang KM, Park DW. Comparison of the clinical outcomes of day 4 and 5 embryo transfer cycles. *Clin Exp Reprod Med*. 2013;40(3):122–5.
96. Holschbach V, Weigert J, Dietrich JE, Roesner S, Montag M, Strowitzki T, et al.

- Pregnancy rates of day 4 and day 5 embryos after culture in an integrated time-lapse incubator. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017;15(1):1–8.
97. Richard Paulson M, Professor and Vice-Chair D of O& G, Chief D of RE and I, California U of S, Medicine KS of. UpToDate Pregnancy outcome after assisted reproductive technology. 2019;
 98. Tao J, Ph D, Tamis R, Fink K. Pregnancies achieved after transferring frozen morula / compact stage embryos. 2001;75(3):1–3.
 99. Kang SM, Lee SW, Jeong HJ, Yoon SH, Koh MW, Lim JH, et al. Clinical outcomes of elective single morula embryo transfer versus elective single blastocyst embryo transfer in IVF-ET. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(5):423–8.

9. COMUNICACIONES, PONENCIAS EN CONGRESOS Y PUBLICACIONES

1. Comunicación oral en el congreso bianual de la sociedad española de fertilidad (SEF) celebrado en Madrid, en Mayo de 2018. Resultados obstétricos y perinatales obtenidos tras transferencia embrionaria en día 4 de cultivo con embriones criopreservados.
2. Ponencia oral en el II Simposium de Controversias en Medicina Reproductiva y Perinatal celebrado en el Hospital Clínico San Carlos de Madrid en Septiembre de 2018. Transferencia embrionaria, ¿en día 3, 5 o personalizamos?.
3. Artículo aceptado para publicación en la revista científica internacional (estadounidense): *Journal of reproductive medicine, gynecology and obstetrics*. Embryo cryotransfer on day 4 versus day 3. Reproductive, obstetric and perinatal outcomes. *MI. Calventus, M. Calvo, S. Rafael, S. Veganzones, I. Cristobal*.

Comunicación oral:

RESULTADOS OBSTÉTRICOS Y PERINATALES OBTENIDOS TRAS TRANSFERENCIA EMBRIONARIA EN DÍA 4 DE CULTIVO CON EMBRIONES CRIOPRESERVADOS. *MI. Calventus, M. Calvo, S. Rafael, T. Gastañaga, S. Veganzones. M Vidaurreta.*

Introducción: La transferencia embrionaria en estadio de mórula es una práctica común en nuestra rutina diaria pero son pocos los estudios que analizan sus resultados. El objetivo del presente estudio es analizar resultados obstétricos y perinatales procedentes de transferencias embrionarias realizadas en día 4 de cultivo en ciclos de embriones vitrificados que presentan un resultado de beta-hCG positivo.

Material y Métodos: Este es un estudio descriptivo, observacional y retrospectivo que analiza 146 criotransferencias embrionarias realizadas en día 4 de cultivo entre Enero de 2011 y Junio de 2016, en mujeres por debajo de 40 años, en una unidad de reproducción asistida de un centro hospitalario terciario.

Resultados: La tasa de implantación obtenida en esta serie fue del 66% y la tasa de supervivencia embrionaria del 97%. Se transfirieron un total de 256 embriones, un 25,3% de un único embrión, un 74% de dos y un 0,7% de tres. El porcentaje de abortos fue del 28,8% y el de gestación múltiple del 17,9% . La patología materna más prevalente fue el hipotiroidismo autoinmune presente en el 15,7% de los casos y a nivel

fetal se encontró un pH intraparto $<7,25$ en el 27,7% de los casos. El porcentaje de prematuridad fue del 17,3%. La finalización de la gestación fue mediante cesárea en un 49% de los casos.

Conclusiones: Concluimos que la criotransferencia en día 4 constituye una opción fácil, flexible y completamente aplicable a nuestra rutina diaria ya que nuestros resultados son equiparables a los publicados en la literatura científica ^(1,2). Además, este estudio es uno de los primeros en publicar datos obstétricos y perinatales de transferencias en estadio de mórula.

10. ANEXO

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 03/02/2016, acta 2.1/16 ha evaluado la propuesta del promotor/investigador referida al estudio:

Título: "Transferencia Embrionaria en día +4 frente a día +3 en ciclos de Fecundación in Vitro: resultados reproductivos obtenidos".

Que en este estudio:

- o Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- o Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- o La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- o El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- o Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto por la **Dra. María Isabel Calventus Periago** como investigadora principal del Instituto de la Salud de la Mujer (ISM). Hospital Clínico San Carlos.

Lo que firmo en Madrid, a 16 de febrero de 2016



Dra. Mar García Arenillas
Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

