

Diferencia de embarazo entre embriones Euploides biopsiados en día 5 vs biopsiados en día 6

Differences in Pregnancy Outcomes Between Euploid Embryos Biopsied on Day 5 Versus Day 6

Carbonaro M¹, Filocco L¹, Perez M¹, Calvo K¹, Brignardello C¹, Percivalle G¹, Mackey ME¹, Miechi H¹, Tozzini R¹, Morente C¹.

¹ Centro Médico PROAR- Rosario. Santa Fé - Argentina.

RESUMEN

Pregunta de estudio: ¿Influye el día de la biopsia embrionaria en los resultados reproductivos, independientemente de la euploidía?

Respuesta resumida: Los pacientes que transfirieron blastocistos euploides biopsiados en día 5 presentaron un 80 % más de embarazo clínico que aquellos con blastocistos euploides biopsiados en día 6.

Lo que ya se sabe: Las tasas de embarazo en transferencias de ciclos en fresco son significativamente más altas cuando se transfirieron blastocistos expandidos de día 5 comparados con los de desarrollo más lento de día 6.

En transferencias de embriones descongelados, algunos autores reportaron mayores tasas de embarazo con blastocistos Día 5 comparados con Día 6, mientras que otros autores no encontraron diferencias. No todos los embriones euploides implantarían de igual manera con la misma evolución.

Diseño del estudio: estudio analítico de cohorte retrospectivo.

Materiales y Métodos: se analizaron 125 ciclos de transferencias de embriones

ABSTRACT

Study question: Does embryo expansion time influence reproductive outcomes of euploid embryos?

Summary answer: Patients who transferred euploid blastocysts biopsied on day 5 had an 80% higher clinical pregnancy rate than those with euploid blastocysts biopsied on day 6.

What is already known: Pregnancy rates in fresh cycle transfers were significantly higher when day 5 expanded blastocysts were transferred compared to slower developing day 6 blastocysts. In thawed embryo transfers, some authors reported higher pregnancy rates with Day 5 blastocysts compared to Day 6, while other authors found no difference. Not all euploid embryos would implant equally with the same development.

Study design: Retrospective analytical cohort study.

Materials and Methods: We analyzed 125 cycles of euploid embryo transfers performed between May 2018 and April 2023, ordering them according to the day of biopsy. The biopsy day was selected based

euploides realizados entre mayo de 2018 y abril de 2023, y fueron divididos según el día en que se realizó la biopsia. La elección del día de la biopsia fue condicionada por el grado de expansión embrionaria. Los embriones expandidos fueron biopsiados en día 5, mientras que en los que tenían un grado de expansión menor se esperó hasta día 6 para realizar la biopsia. Todos los endometrios fueron preparados de la misma forma para la transferencia, independientemente del día de la biopsia. Se realizaron 84 transferencias de embriones biopsiados en día 5 (TEB5) y 41 transferencias de embriones biopsiados en día 6 (TEB6).

Resultados: Los pacientes que transfirieron blastocistos euploides biopsiados en día 5 presentaron una tasa de embarazo clínico mayor que aquellos con blastocistos euploides biopsiados en día 6 (47.6% vs. 26.8%), resultando esta diferencia estadísticamente significativa RR 1,78 (1,02-3,08). La tasa de aborto no mostró diferencias significativas.

Limitaciones del estudio: para hacer más robusto nuestro estudio, sería relevante incrementar la cantidad de casos y – además de la velocidad de desarrollo embrionario– evaluar otros parámetros embrionarios.

Implicancias de los hallazgos: nuestro trabajo coincide con la literatura e incentiva la toma de decisiones al elegir entre dos o más embriones euploides.

Palabras clave: Embriología, Blastocisto, Euploide, Grado de expansión, Velocidad de desarrollo, Reproducción.

on the degree of embryonic expansion. The expanded embryos were biopsied on day 5, while those with a lower expansion degree were expected until day 6 to perform the biopsy. Regardless of the biopsy day, all endometrial preparation was performed in the same way for embryos trans-fer. Embryo biopsy transfers (EBT) were divided into two groups according to the day of biopsy: day 5 (EBT5) (n=84) and day 6 (EBT6) (n=41).

Main results: *Patients who transferred euploid day 5 blastocysts showed a higher clinical pregnancy rate compared with euploid day 6 blastocysts (47.6% vs. 26.8%), this difference was statistically significant with an RR of 1.78 (1.02-3.08). The miscarriage rate did not show significant differences.*

Limitations: *In order to make our study more robust, it would be relevant to increase the number of cases and, in addition to embryonic development stages, evaluate other embryonic parameters.*

Wider implications of the findings: *Our work is consistent with literature and encourages informed decision when choosing between two or more euploid embryos.*

Key words: *Embryology, Blastocyst, Euploid, Expansion grade, Development rate, Reproduction.*

INTRODUCCIÓN

Las transferencias de embriones euploides aceleran los tiempos en lograr el embarazo debido a la disminución de transferencias innecesarias con embriones aneuploides. Sin embargo, no todas las transferencias de embriones euploides resultan en embarazos, es de notar que el 30-40 % de los embriones euploides no llegan a nacidos vivos. Causas de estas fallas incluyen patologías de la cavidad endometrial, hidrosalpinx, desincronización embrión-endometrio, trombofilia o posibles factores inmunológicos⁽¹⁾.

La velocidad del desarrollo embrionario del blastocisto también influiría en los resultados reproductivos. Shapiroy coll⁽²⁾ encontraron mayores tasas de embarazo clínico e implantación con embriones transferidos en fresco de día 5 que los de día 6, y Barrenetea y col⁽³⁾ informaron resultados similares. Estos hallazgos reflejan la mayor viabilidad de los embriones de desarrollo rápido, quizá porque la ventana de implantación es más temprana, sobre todo en ciclos estimulados respecto al ciclo natural^(4,5,6). Shapiro y col también consideran la posibilidad que los embriones de día 5 y 6 tengan similar capacidad de implantación pero que la sincronía del endometrio sea subóptima en el día 6. Sin embargo, distintos trabajos^(7,8,9,10,11) mostraron la superioridad en la implantación de los embriones en día 5 con ciclos de transferencias de embriones descongelados. También se menciona que los embriones de día 6 tienen una tasa de aneuploidía más alta⁽¹²⁻¹³⁾. En otros trabajos se sugiere que acciones metabólicas y epigenéticas del embrión interfieren en la velocidad de desarrollo del mismo. Factores relacionados directamente con la competencia embrionaria, además del status de ploidía, pueden jugar un rol crítico de

implantación. El grado morfológico y la velocidad en el desarrollo del blastocisto pueden reflejar la salud metabólica del embrión influyendo en su potencial de implantación⁽¹⁴⁾.

Debido a que no todos los embriones euploides implantan de igual manera, además del PGT-A debería considerarse la velocidad de evolución para mejorar la capacidad de selección embrionaria, con el objetivo primordial de lograr un nacido vivo luego de la primer transferencia electiva de un blastocisto.

Se planteó en nuestro laboratorio evaluar si las transferencias de embriones descongelados euploides tenían los mismos resultados reproductivos según el día en que se realizara la biopsia embrionaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio analítico de cohorte retrospectivo. Se analizaron 125 ciclos de transferencias de embriones euploides realizados desde mayo de 2018 a abril de 2023, y se dividieron según el día de la biopsia embrionaria. Se excluyeron los embriones traídos de otro centro de reproducción. El día de la biopsia fue condicionado por el grado de expansión embrionaria. Los embriones expandidos y eclosionados fueron biopsiados en día 5, mientras que los que tenían un grado de expansión menor o no estaban eclosionados fueron esperados hasta día 6 para ser biopsiados. Los embriones fueron incubados en gotas de 30ul de medio de cultivo continuo (CSC Irvine) de a 1 o 2 embriones por gota. Se utilizaron incubadoras tri gas K-systems (G185 y G210), a 37 °C, con 5% O₂ y 6% CO₂. Todos los endometrios fueron preparados para la transferencia de la misma forma independientemente del día de la biopsia, se utilizó ciclo de preparación endometrial artificial con valerato de estradiol hasta

lograr desarrollo endometrial => a 7 mm, y se comenzó con progesterona micronizada 800 mg/ día durante 5 días previos a la transferencia. Se realizaron 84 transferencias de embriones biopsiados en día 5 y 41 transferencias de embriones biopsiados en día 6. Se utilizó el Test de Fisher para la comparación de la tasa de embarazo, considerando significativo $p < 0.05$, y se calculó el Riesgo Relativo y su intervalo de confianza (IC 95%).

RESULTADOS

Los pacientes que transfirieron blastocistos euploides biopsiados en día 5 presentaron una tasa de embarazo clínico mayor que aquellos con blastocistos euploides biopsiados en día 6 (47.6% vs 26.8%). Esta diferencia fue

estadísticamente significativamente, en el grupo de TBED5 versus TBED6 $RR=1,78$ IC 95% (1,02-3,08), $p=0,03$. La tasa de aborto no mostró diferencias significativas. (Tabla 1, Figura 1)

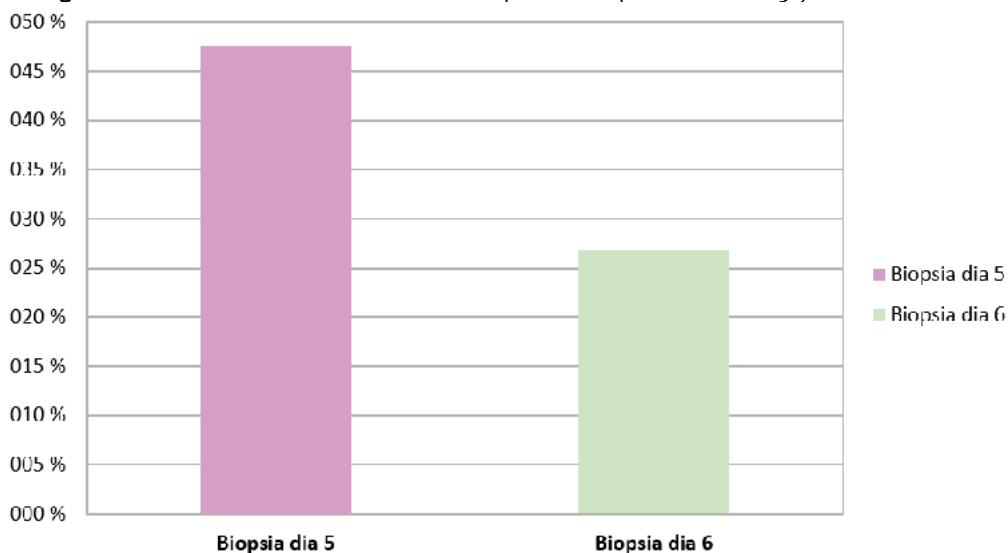
DISCUSIÓN

Este estudio evalúa el rol que cumple el día de desarrollo en embriones euploides en la tasa de embarazo. Nuestros hallazgos establecen que lo embriones euploides que tienen un grado de expansión satisfactorio al 5to día de desarrollo presentan mejores tasas de embarazo que aquellos que logran expansión al 6to día. Al ser todos embriones euploides en ambos grupos se podría afirmar que la condición de euploidía no sería el único factor importante para determinar la implantación de un embrión.

Tabla 1. Tabla de resultados. Porcentaje de embarazo y aborto con transferencias de Embriones.

	Emb. / transf.	% Embarazo	RR (IC 95%) p	Abortos n	Abortos % (IC)	RR (IC 95%) p
Biopsia día 5	40 / 84	47,6 % (36,9-58,3)	1,78 (1,02-,08) p 0,03	4	10% (0,7-19,3)	0,65 (0,14-3,07) p 0,60
Biopsia día 6	11 / 41	26,8 % (13,3-40,4)		2	18,2% (0 - 40,9)	

Figura 1. Tasa de embarazo de embriones euploides biopsiados en día 5 y 6 de evolución.



Por lo tanto nuestro trabajo, al igual que otros en la literatura⁽¹⁴⁻¹⁵⁾, evidencia el efecto negativo del retraso del desarrollo embrionario en los resultados de las transferencias de embriones descongelados euploides. Mohamed Irani y col⁽¹⁴⁾ sostienen que los blastosistos euploides en día 5 tienen tasas de implantación y nacido vivo más alta que los blastocitos del día 6. Gordon y col⁽¹⁵⁾, también observaron que la tasa de nacidos vivos es mayor en embriones euploides biopsiados en día 5 versus día 6, lo interesante es que cuando se estratificó por calidad embrionaria y el día de biopsia la tasa fue más alta en los embriones de buena calidad de día 5 vs día 6. Estos trabajos avalarían la teoría que además de la euploidía existen otros factores inherentes al embrión que determinan su implantación.

Abdala y col⁽¹⁶⁾, evaluaron la transferencia de blastocito euploide único y si bien observaron que los resultados fueron significativamente mejores en D5 la tasa de embarazo difiere al evaluar según grosor endometrial, edad de la paciente, índice de masa corporal o grado del macizo celular interno. Nuevamente podemos ver cómo, en congruencia con nuestros resultados, la euploidia es un dato más a tener en cuenta al momento de la elección del embrión pero no el único para asegurar el embarazo.

Sardana y col⁽¹⁷⁾ evaluaron la tasa de nacido vivo luego de transferencia de embriones euploides descongelados de día 5 vs día 6 y hallaron resultados comparables en ambos días de desarrollo; en cambio al evaluar la tasa de embarazo clínico esta fue mayor en el grupo de embriones euploides de día 5, similar a nuestra experiencia.

Sin embargo otros autores no encontraron diferencias. Wu y col⁽¹⁸⁾, evaluaron transferencias de descongelados de

embriones euploides o mosaicos de buena calidad, y no presentaron diferencias significativas ni en tasas de embarazos ni en nacido vivos. Tong y col⁽¹⁹⁾, observaron que en las transferencias de embrión único euploide los resultados clínicos entre día 5 o 6 fueron similares. No obstante pudo observar que en su población los blastocitos de día 6 eran en general de mujeres de mayor edad, con reserva ovárica medida por antimulleriana más baja y edad paterna más alta. Nuevamente estos datos podrían acompañar la teoría que hay factores que ayudan a determinar la capacidad de implantación de esos embriones y no sólo su euploidia.

Si bien el análisis genético preimplantacional es una herramienta útil para conocer la viabilidad de los embriones y evitar transferencias innecesarias, creemos que no es el único parámetro a tener en cuenta al momento de seleccionar el embrión ideal para transferir. Consideramos que pueden existir otros parámetros que no se evalúan en este estudio, representando esto una limitación del mismo. Creemos que los resultados obtenidos son importantes para la toma de decisiones al momento de elegir el embrión a transferir en caso de contar con embriones euploides en ambos días de desarrollo, pero sería interesante contar con más datos en un futuro estudio que abarque otras variables a tener en cuenta.

CONCLUSIÓN

Los pacientes que transfirieron embriones euploides biopsiados en día 5 presentaron un 80% más de embarazo clínico que aquellos con embriones euploides biopsiados en día 6. Cabe destacar que los embriones biopsiados en día 6 son embriones con crecimiento más lento que aquellos biopsiados en día 5 y esto podría señalar otras diferencias intrínsecas. Para

responder este interrogante se necesitarían más estudios fuera del alcance de este trabajo. El grado de desarrollo tendría influencia en los resultados independientemente de la euploidia.

Agradecimientos

Los autores agradecen al equipo médico de PROAR por brindar soporte técnico y sugerencias valiosas para realizar este estudio.

REFERENCIAS

1. Valdes CT, Schutt A, Simon C. Implantation failure of endometrial origin: it is not pathology, but our failure to synchronize the developing embryo with a receptive endometrium. *Fertil Steril* 2017;108:15-8.
2. Shapiro B, Daneshmand S, Garner F, Aguirre M, Ross R, Contrasting patterns in in vitro fertilization pregnancy rates among fresh autologous, fresh oocyte donor, and cryopreserved cycles with the use of day 5 or day 6 blastocysts may reflect differences in embryo-endometrium synchrony, *Fertil Steril* 2008; 89:20-26. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.092>.
3. Barrenetxea G., López de Larruzea A., Ganzabal T., Jiménez R., Carbonero K., Mandiola M., Blastocyst culture after repeated failure of cleavage-stage embryo transfers: A comparison of day 5 and day 6 transfers, *Fertil Steril* 2005;83:49-53. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.06.049>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0015028204026020>)
4. Khorram O., Shapiro S., Jones J, Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after in vitro fertilization, *Fertil Steril*, 2000;74:163-165. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(00\)00567-7](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00567-7).
5. Kolb BA, Paulson RJ. The luteal phase of cycles utilizing controlled ovarian hyperstimulation and the possible impact of this hyperstimulation on embryo implantation. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:1262-7.
6. Kolibianakis E, Bourgain C, Albano C, Osmanagaoglu K, Smitz J, van Steirteghem A. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril* 2002;78:1025-9.
7. Desai N, Ploskonka S, Goodman L., Attaran M, Delayed blastulation, multinucleation, and expansion grade are independently associated with live-birth rates in frozen blastocyst transfer cycles, *Fertil Steril*.2016; 106: 1370-1378. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1095>.
8. Haas, J., Meriano, J., Laskin, C. et al. Clinical pregnancy rate following frozen embryo transfer is higher with blastocysts vitrified on day 5 than on day 6. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:1553-1557. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0818-x>
9. Levens E, Whitcomb B, Hennessy S, James A, Yauger B, Larsen F, Blastocyst development rate impacts outcome in cryopreserved blastocyst transfer cycles, *Fertil Steril*.2007; 90:2138-2143 <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.10.029>.
10. Ferreux L, Bourdon M, Sallem A, Santulli P, Barraud-Lange V, le Foll N, et al. Live birth rate following frozen-thawed blastocyst transfer is higher with blastocysts expanded on day 5 than on day 6. *Hum Reprod* 2018; <https://doi.org/10.1093/humrep/dey004>
11. Wang X, Zhen J, Sun Z, Yu Q, Deng C, Zhou Y, et al. Effects of fifth day (D5) or sixth day (D6) frozen-thawed blastocysts on neonatal outcomes. *Zygote* 2016;24:684-91
12. Taylor TH, Patrick JL, Gitlin SA, Wilson JM, Crain JL, Griffin DK. Comparison of aneuploidy, pregnancy and live birth rates

- between day 5 and day 6 blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2014;29:305–10.
13. Kaing A, Kroener LL, Tassin R, Li M, Liu L, Buyalos R, et al. Earlier day of blastocyst development is predictive of embryonic euploidy across all ages: essential data for physician decision-making and counseling patients. *J Assist Reprod Genet* 2018;35:119–25.
 14. Irani M, O'Neill C, Palermo G, et al. Blastocyst development rate influences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts. *Fertil Steril* 2018; 100:95-102. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.03.032>
 15. Gordon C, Lanes A, Thomas A, Racowsky C. Day of trophectoderm biopsy and embryo quality are associated with outcomes following euploid embryo transfer. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022;39:2539-2546. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02613-x>
 16. Abdala A, Elkhatib I, Bayram A, Arnanz A, et al. Day 5 vs day 6 single euploid blastocyst frozen embryo transfers: which variables do have an impact on the clinical pregnancy rates? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022;39:379-388. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02380-1>
 17. Sardana P, Banker J, Gupta R, Kotdawala A, Lalitkumar PG, Banker Introduction M. The influence of delayed blastocyst development on the outcome of frozen-thawed transfer of euploid and untested embryos. *J Hum Reprod Sci* 2020;13:155-61. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_115_19
 18. Wu TF, Chen M, Lee M, et al. Comparison of clinical outcome between day 5 and day 6 single blastocyst transfers in cycles undergoing preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2023; 62:429-433. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2023.03.005>
 19. Tong J, Niu Y, Wan A, Zhang T. Comparison of day 5 blastocyst with day 6 blastocyst: Evidence from NGS-based PGT-A results. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (2022) 39:369–377. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02397-0>