

Fertilización in vitro de la especie humana en Costa Rica: Primeros nacimientos reportados

Gerardo Escalante, Delia Ribas, Lilliam Escalante, José Rodríguez, Eliane Jiménez,
Luis Sánchez, Jorge A. Fernández

Resumen

Se aceptaron 50 parejas con infertilidad dentro el programa de fertilización in vitro del Instituto Costarricense de Infertilidad para tratamiento desde setiembre de 1994 a agosto de 1996. La edad de las mujeres comprendió un rango de 26 a 45 años, con una media de 35 años. Treinta y nueve presentaban una obstrucción tubárica bilateral, 10 tenían un factor masculino subóptimo en asociación con factor pélvico tuboperitoneal y una pareja tenía infertilidad no explicada. Un total de 23 parejas presentaban factor masculino subóptimo. Setenta y dos ciclos fueron iniciados y se efectuaron sesenta y nueve aspiraciones. Se obtuvieron nueve embarazos, tres bioquímicos y seis clínicos, de los cuales tres nacieron y uno está por nacer. (AMC, 1997;39 (2):33-37)

Descriptores: Fertilización in vitro, reproducción asistida, transferencia embrionaria.

Introducción

Infertilidad como problema de salud que impide la reproducción del ser humano, se estima que afecta de 10 % a 15% de las parejas en los Estados Unidos¹ y en otras regiones geográficas este problema alcanza cifras tan altas como el 54.1 %, en el área rural de Nigeria.² En nuestro país, sin tener datos objetivos y confiables sobre la prevalencia de esta entidad, es de suponer que no es despreciable. El estudio y manejo de estas parejas con un protocolo convencional y correcto, logrará que la mayoría de ellas superen su problema. Sin embargo, quedará un porcentaje significativo que requerirá de técnicas de reproducción asistida (TRA) para conseguirlo.

Será entonces considerada como la indicación clásica para el empleo de TRA la incapacidad biológica de una pareja para lograr la fertilización del oocito humano "in vivo", esto es, en las trompas de Falopio y como consecuencia de un contacto sexual natural. Si bien es cierto que la ausencia o la

impermeabilidad tubárica representa el ejemplo fisiopatológico clásico para esa limitación, y por lo tanto, la primera indicación para estas técnicas, a través del tiempo se han ido sumando otras indicaciones como infertilidad de causa desconocida y parejas en las que la aplicación correcta de un protocolo de manejo para un factor adverso conocido, no ha dado resultado al aplicarlo repetidamente³.

Producto de la investigación y adelanto tecnológico, las TRA engloban hoy día una variedad de diferentes procedimientos que no son más que variantes al modelo clásico de fertilización in vitro y transferencia embrionaria (FIVTE): transferencia intratubárica de embriones (ZIFT), aspiración microquirúrgica de espermatozoides del epidídimo (MESA), inserción espermática bajo la zona pelúcida (SUZI) e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), son algunos ejemplos de ellos.

Para los efectos del presente trabajo, se usan indistintamente los términos de embrión y preembrión, dado que suele ser lo acostumbrado en la literatura. Sin embargo se aclara que consideramos preembrión al óvulo fertilizado y su evolución hasta el día 14 y embrión al producto de la concepción con una edad comprendida entre los 15 y los 56 días, a partir de los cuales inicia el período fetal⁴.

Desde el 25 de julio de 1978, fecha en que nació en Inglaterra Louise Brown, producto de la primera fertilización in vitro en la especie humana⁵, han sido los países tecnológicamente más desarrollados los que han llevado adelante el progreso científico en este campo. No fue sino hasta el año de 1984, en que Escalante publica su primera experiencia al conseguir los primeros 8 embarazos por medio del monitoreo sonográfico de la ovulación en las pacientes⁶, que en Costa Rica se inicia la era del empleo de tecnología moderna en beneficio del manejo de la infertilidad.

Hoy, 12 años después, consideramos cerrado el ciclo de nuestra investigación, al presentar los primeros 3 nacimientos en nuestro país, producto de fertilización extracorpórea del óvulo y su posterior transferencia al útero materno.

Instituto Costarricense de Infertilidad
San José, Costa Rica

Abreviatura: TRA, Técnicas de Reproducción asistida; FIVTE, Fertilización in vitro y transferencia embrionaria; HGC, Gonadotrofina coriónica humana; HTF, human tubal fluid.

TABLA 1
Criterios de inclusión

1. Parejas conyugales mayores de edad
2. Edades límites: Mujeres 18-45 años con función ovárica demostrada
3. Infertilidad idiopática ≥ 3 años de evolución*
4. Factor tuboperitoneal alterado **
5. Factor masculino normal o subóptimo***
6. Ausencia de enfermedades de transmisión sexual

* No resueltas con esquemas convencionales de manejo

** Demostrado por histerosalpingografía, laparoscopia o laparotomía anterior

*** $\geq 10^6$ sperm/ml, $\geq 30\%$ motil, $\geq 40\%$ formas normales en 2 muestras en los últimos 6 meses

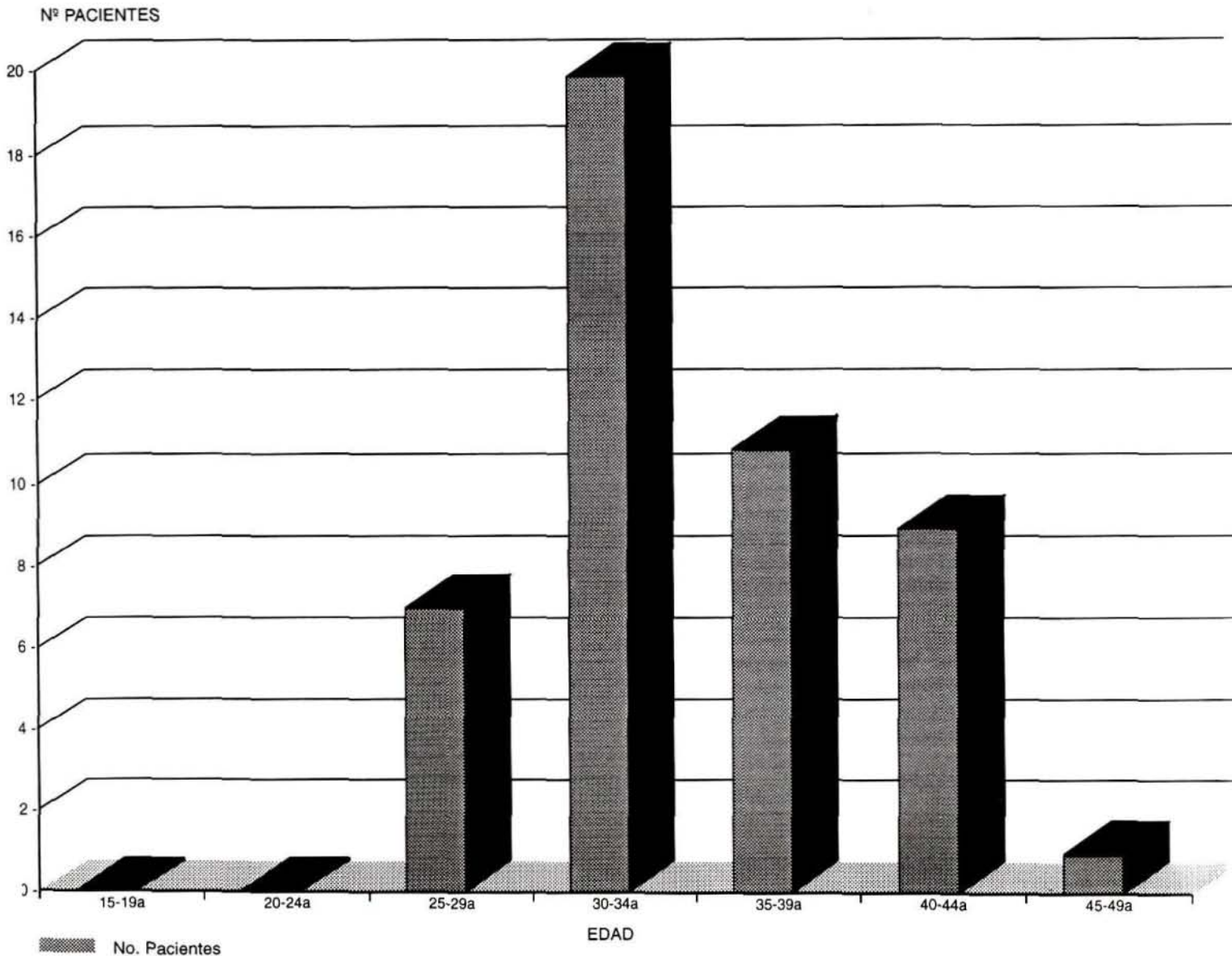
Materiales y Métodos

Descripción de Pacientes

En el período comprendido entre setiembre 1994 y agosto 1996, 50 parejas portadoras de infertilidad conyugal reunieron los criterios de inclusión requeridos para ingresar al programa de FIVTE (Tabla 1), lo que hicieron previa aceptación de la fórmula de consentimiento informado.

La población de mujeres que ingresaron al programa comprendía edades entre los 26 y 45 años. (Figura 1). En cuanto a la etiología de la infertilidad, 39 pacientes eran portadoras de obstrucción tubárica bilateral, 10 de factor pélvico tuboperitoneal y factor masculino subóptimo y un caso de infertilidad ideopática.

FIGURA 1
Fivte en Costa Rica 1994-96
Distribución de Pacientes por Edad



No hubo límite superior de edad para ingreso al programa de los cónyuges de las mismas, siendo el análisis de semen el criterio utilizado para su admisión (recuento no inferior a 10 millones/ml, motilidad >30%, movimiento direccional y morfología > 40% de formas normales). Basándonos en los criterios emitidos por la Organización Mundial de la Salud en 1992⁷, 28 varones (56%) se consideraron normospermicos y 22 (44%) con semen subóptimo. De las 50 mujeres; 32 eran portadoras de infertilidad primaria y 18 de infertilidad secundaria, siendo en promedio en duración en años de las mismas 10.2 ±4.21DS y 7.7±2.47DS, respectivamente.

Inducción de Ovulación

Las pacientes fueron ingresadas al programa de FIVTE bajo el siguiente protocolo de manejo: bloqueo de gonadotropinas hipofisarias con acetato de leuprolide (Lupron; TAP Pharmaceuticals, USA) en dosis de 0.5 mg/día subcutáneo, iniciando el día 21 del ciclo menstrual y continuado hasta 44 horas anteriores a la aspiración. Con el sangrado menstrual subsecuente, se determinó el nivel basal de estradiol (RIA, DPC, USA) para comprobar el bloqueo deseado. Niveles inferiores a 35 pg/ml en conjunto con ultrasonido vaginal negativo por patología ovárica que contraindicara el procedimiento o presencia de folículos, fueron los requisitos para iniciar la inducción de ovulación con menotropinas humanas (Pergonal, Serono, Suiza) (Metrodinclon, Serono, México), en dosis de 3 ampollas por día inicialmente, adecuando la misma a los valores de estradiol y características sonográficas del ovario, los que se determinaron en forma diaria a partir del cuarto día de estimulación. Fue criterio de suspensión de la inducción de ovulación la respuesta ovárica deficiente evidenciada por menos de 3 folículos de tamaño semejante, o bien la respuesta excesiva con más de 15 cámaras foliculares en cada ovario, acompañado por niveles de estradiol superiores a 3500 pg/ml previo a la aplicación de gonadotropina coriónica humana. Peso y diuresis diarias fueron registrados de manera simultánea. Ante folículos de 18 mm o más, se administró gonadotropina coriónica humana (HGC) 10,000 UI intramuscular (Profasi, Serono, México). Una última medición de estradiol fue tomada al día siguiente de su aplicación.

Recuperación de Oocitos

Treinta y seis horas posterior a la administración de la HGC se aspiraron los folículos por punción vaginal sonodirigida bajo sedación empleando para ello equipo de punción folicular que incluía: agujas 17G x 25" (Cook, USA), bomba de succión folicular (Rocket, USA), tubos de poliestireno de 15ml (Falcon, USA). El empleo de ultrasonido dotado de doppler color (Toshiba, Japón) se consideró fundamental para reconocer los vasos sanguíneos de la pelvis y evitar su perforación accidental durante el procedimiento, el que se realizó en sala de operaciones especialmente diseñada para el mismo y bajo las condiciones de asepsia quirúrgica obligatorias. El líquido folicular aspirado fue trasladado en forma inmediata al laboratorio de fertilización in vitro para su clasificación, selección y procesamiento posterior. Concluida esta fase se administró antibioticoterapia profiláctica (Ceftriaxona, 1g, IV) previo al traslado de la paciente a sala de

recuperación donde permaneció un mínimo de 3 horas.

Laboratorio de Fertilización In Vitro

Los medios de crecimiento y capacitación se prepararon 24 horas antes de la aspiración folicular. Como medio de capacitación y crecimiento embrionario se utilizó Human Tubal Fluid (HTF, Irvine Scientific, USA), suplementado con 15% de suero materno inactivado. En casos con semen subóptimo se prepararon gradientes de Percoll (Sigma, USA) diluidos al 80 y 40% con el mismo HTF sin suero materno. Todos los medios de cultivo fueron expuestos a CO₂ al 5% por 24 horas previo a su utilización y se revisó osmolaridad y pH previo a su utilización. La muestra de semen obtenida por masturbación máximo 1 hora antes de su recepción, se examinó posterior a su período de licuefacción y previo a la recuperación de óvulos. Sus características en cuanto a concentración y movilidad fueron determinadas y se procedió a la capacitación de la misma con la técnica de "swim-up" simple, si fue considerada normal, o mediante gradientes de Percoll si fue subóptima⁸. Se desea una concentración final de 100,000 espermatozoides/ml para la inseminación de los óvulos.

Una vez recibidos los líquidos foliculares obtenidos de la aspiración folicular se revisó en la cámara de flujo laminar bajo el esteroscopio. Al ser identificados los óvulos se evaluaron con el microscopio invertido para clasificarlos como maduros, inmaduros o posmaduros según los criterios de Veeck⁹.

Si se obtenía un número mayor, se seleccionaron, 6 óvulos maduros para inseminación, la cual se llevó a cabo con volúmenes de 10-30 ml según la motilidad del semen. Los óvulos y espermatozoides fueron depositados en tubos de poliestireno de 5cc (Falcon, USA) con el medio anteriormente descrito y permanecieron dentro de la incubador con concentración de 5% CO₂ y a 37°C por 14 horas. Transcurrido este tiempo se revisaron bajo el microscopio invertido para determinar la presencia del estadio pronuclear del óvulo fecundado. Aquellos sin fecundar se reinseminaron y fueron nuevamente evaluados 8 horas posterior a su reinseminación. Aquellos con fertilización comprobada permanecieron en incubación por 24 horas momento en el cual fueron evaluados por última vez para determinar su calidad antes de ser transferidos a la cavidad uterina de la paciente. En este momento se evaluó la división celular del preembrión (simétrica o no), coloración, fragmentación y el estado de la zona pelúcida.

Requisito fundamental de nuestro protocolo fue no intentar fertilizar más de 6 óvulos por paciente para no obtener más de 6 preembriones y verse por ello obligados a desechar alguno o transferirlos todos, con riesgo de embarazo múltiple por esa razón, al no disponer de bancos para la criopreservación de preembriones. Este recurso tecnológico tampoco se contempla en nuestro protocolo de trabajo actual o futuro, dada la experiencia, considerada inconveniente por nosotros, que se ha suscitado en otros centros internacionales⁹.

Transferencia Embrionaria

Aproximadamente 48 horas posterior a su inseminación, todos los preembriones resultantes fueron transferidos a la cavidad uterina de la paciente por medio del catéter estéril de Craft para

TABLA 2
División Celular de Preembriones
(44 horas posfertilización)

Nº Blastómeras	Nº Preembriones
2	50
3	12
4	34
5	3
6	15
8	5

Media + Desviación estandar = 3.5 ± 1.65

transferencia embrionaria (Rocket, Londres, Inglaterra). Posteriormente el catéter fue revisado para asegurar que todos los preembriones fueron transferidos.

Etapa Postransferencia y de Soporte Hormonal de la Fase Lútea

Efectuada la transferencia, la paciente se mantuvo en sala de recuperación en reposo absoluto por 3 horas, posteriormente fue egresada a su domicilio y se mantuvo en reposo relativo por 16 días más. Se administró progesterona en aceite (Alcames, Costa Rica) 50 mg/día IM a partir del día siguiente a la aspiración. Determinaciones de progesterona se realizaron a las 24 horas de la aspiración folicular, a los 7 y 14 días del mismo. Valores sobre 15ng/ml se consideraron aceptables. Durante esta etapa, controles de ultrasonido frecuentes señalaron las características ováricas de la paciente.

Diagnóstico de Embarazo

Niveles cuantificados de HGC plasmáticas se determinaron al día 16 postransferencia. Valores superiores a 10 mUI/ml fueron considerados positivos por embarazo. Ante resultados negativos, se suspendió la administración de progesterona y se esperó el sangrado menstrual. De confirmarse el embarazo, el saco gestacional se buscó sonográficamente el día 9 postransferencia y se continuó el uso de progesterona hasta la novena semana de gestación.

Resultados

En las 50 parejas ingresadas al protocolo de FIVTE, se iniciaron 72 ciclos de inducción de ovulación. En 3 de ellos no hubo respuesta adecuada (< 3 folículos) y se suspendieron. En los restantes 69 se recuperaron óvulos en todos menos uno, correspondiendo este caso al de una paciente de 45 años con

pobre respuesta estrogénica (< 750 pg/ml) y sonográfica (4 folículos apenas aceptables). La cantidad total de óvulos obtenidos fue de 680, con un promedio por paciente de 9.8 (valores extremos 0-26). Se seleccionaron 271 óvulos para intento de fertilización, con resultado positivo en 119 (43.91%). Esto representa $1.72 (\pm 1.28 \text{ DS})$ preembriones conseguidos por aspiración.

En 10 de los 68 ciclos no se consiguió fertilización. En los 58 ciclos restantes, la mayoría de los pre-embriónes eran de 2 y 4 blastómeras 44 h postfertilización, con una media de blastómeras por preembrión $3.5 \pm 1.65 \text{ DS}$ (Tabla 2).

La implantación ocurrió en 9 de las 50 (18%) parejas correspondiendo este valor al 12.5% de embarazos por ciclo iniciado (9 de 72)

Estratificando la población tratada según edad de la paciente y factor masculino correspondiente, se evidencia que el 66% de los embarazos (6 casos) se lograron en el grupo etario inferior a 35 años con factor masculino normal; el 22% en el grupo mayor de 35 años con factor masculino normal (2 casos) y el 11% (1 caso) en el de mayores de 35 años con factor masculino subóptimo. La misma tendencia se observó cuando se consideraron las variedades de embarazo clínico y bioquímico en estas pacientes. De los nacimientos ocurridos hasta el momento de este escrito, 2 correspondieron a pacientes menores 35 años con factor masculino normal y uno al grupo de más de 35 años con factor masculino normal. Un embarazo gemelar actual de 27 semanas, corresponde a la categoría de pacientes menores de 35 años con factor masculino normal (Tabla 3)

De los 9 embarazos conseguidos, 3 evolucionaron como reabsorción gestacional precoz (aborto subclínico), 2 presentaron títulos de HGC > 10 mUI/ml, pero no evidenciaron saco gestacional reconocible por ultrasonido y tuvieron sangrado vaginal entre los días 16 y 26 postransferencia. De los 6 embarazos clínicos (saco gestacional visible por ultrasonido vaginal), 2 evolucionaron hacia aborto retenido de 8 semanas. 1 embarazo actual de 27 semanas y 3 nacimientos de productos sanos.

El factor masculino se consideró adecuado en el 89% de los casos que lograron implantación y en el 11% de los que no la lograron. (Tabla 3).

Tres casos presentaron sobreestimulación ovárica con repercusiones clínicas, 2 de ellos con antecedentes claros de poliquistosis ovárica. El cuadro consistió en ovarios con diámetros >6 cm, aumento de peso mayor o igual a 2 kilos por día, dolor pélvico y oliguria. En un caso se consignó ascitis moderada. Las tres pacientes evolucionaron favorablemente hasta la fase de aspiración, previo manejo en base a reposo, dieta

TABLA 3
Relación Edad de la Paciente, Factor Masculino y Embarazo

Características	< 35 años; Semen nl*	< 35 años; Semen anl*	< 35 años; Semen nl*	< 35 años; Semen anl*	Total
Nº Parejas	18	11	9	12	50
Nº Emb. Clínico	5	-	1	-	6
Nº Emb. Bioq.	1	-	1	1	3
Nº Nacimientos	2	-	1	-	1

* nl= normal; anl= anormal

TABLA 4
Relación Ciclos con y sin embarazo
y Nivel de Estradiol. 69 ciclos

Estradiol (pg/ml)	Ciclos con Embarazo (+)		Ciclos con Embarazo (-)	
	Nº	%	Nº	%
≥ 3000	1	1.44	48	69.56
≤ 3000	8	11.59	12	17.39
TOTAL	9	13.05	60	86.95

hiperproteica, suspensión de menotropinas y reducción a la mitad de la dosis de gonadotropina coriónica.

Los niveles de estradiol circulante fueron menores de 3000 pg/ml en 8 de los 9 embarazos conseguidos (88.8%), mientras que en los ciclos que no lograron embarazo, solo el 20% mostraba valores inferiores a 3000 pg/ml (Tabla 4).

Discusión

De los 69 ciclos iniciados en las 50 pacientes, se consiguió un 12.5% de embarazo por aspiración realizada. Esta cifra resulta inferior a las de series publicadas internacionalmente¹⁰. Esto puede deberse a que en nuestros criterios de inclusión no se pusieron condicionantes de edad inferior a 35 años, paridad anterior, semen óptimo en la totalidad de los casos, inseminación heteróloga por fallas del factor masculino ni transferencia embrionaria a úteros de terceras personas. De igual manera, no se intentó la fertilización de más de 6 oocitos por caso. Estas características, usuales en otros centros de reproducción asistida, condicionan mejores resultados estadísticos. El porcentaje de embarazo en la población tratada fue de 18% (9/50).

La paridad anterior como condicionante de buen pronóstico en las pacientes que lograron gestación no se corroboró en nuestro estudio, (3 de las 9 gestaciones logradas). Se observó que a menor edad mejor pronóstico: de los 9 embarazos conseguidos, 6 ocurrieron en pacientes menores de 35 años (promedio = 29 años) y 3 mayores al mismo, de las que solo 1 caso (37 años) alcanzó el término de la gestación, microabortando las otras 2 (41 y 45 años). La característica espermática fue el segundo factor determinante para el éxito del FIVTE luego de la edad de la paciente.

Los valores de estradiol circulantes el día previo a la aspiración de oocitos, evidenciaron mejor pronóstico para aquellos casos inferiores a 3000 pg/ml y sobre los 500 pg/ml. El 88% de los ciclos que lograron embarazo se encontraron dentro de este rango, mientras que sólo el 20% de los que no lo consiguieron mostraron valores de esa magnitud. Estos resultados podrían deberse al factor oocito-embriótico de niveles suprafisiológicos de estrógenos circulantes, descrito por Buyalos. El riesgo de síndrome de sobrestimulación se presentó en solo 3 de 69 casos. Esta baja frecuencia y severidad puede deberse al estricto control de estradiol circulante y al monitoreo sonográfico de ovulación. La aspiración de oocitos en estas pacientes no solo procura su recolección, si no que también descomprime el ovario, reduce su diámetro, el dolor pélvico y la posibilidad de torsión. Nuestros resultados indican que el perfil idóneo de un ciclo de FIVTE en nuestro medio con la técnica descrita es: ser realizado en una paciente joven, menor de 30 años, con un factor masculino normal, y en la que la inducción de ovulación no produzca niveles de estradiol superiores a 3000 pg/ml.

El empleo de tecnologías complementarias de uso frecuente en otros países, como la micromanipulación, el congelamiento embrionario, inseminación heteróloga y el empleo de úteros de terceras personas probablemente elevaría el porcentaje de éxito como lo evidencian resultados de otros centros. Sin embargo, nuestros valores éticos no están de acuerdo con la mayoría de ellas, prefiriendo depurar al máximo todos los pasos de nuestro protocolo, con la finalidad de obtener los mejores resultados posibles bajo el principio de respeto absoluto al concepto de inviolabilidad de la vida y la dignidad humana, que conceptuamos presente desde el momento mismo de la fecundación.

Abstract

Fifty infertile couples were accepted into the in vitro fertilization program of the Instituto Costarricense de Infertilidad for treatment from September 1994 through August 1996. The women's age comprised a range between 26 to 45 years with a mean of 35 years. Thirty-nine women presented with bilateral tubal obstruction, 10 had a suboptimum male factor in association with an altered tuboperitoneal milieu and one couple had unexplained infertility. In 23 couples male factor was diagnosed. Seventy-two cycles were initiated and sixty-nine aspirations were performed. Nine pregnancies were obtained. 3 biochemical and 6 clinical of which 3 live births and one ongoing gestation were achieved.

Reconocimientos

Nuestra eterna gratitud a las parejas participantes, en especial a Irina y Alexander, padres de Esteban, primer niño producto de fertilización in vitro y transferencia embrionaria realizada en nuestro país. Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración del Instituto Costarricense de Infertilidad (ICI), por su participación en la preparación científica de los profesionales participantes y al departamento de Biología de la Reproducción de Ultrasonografía S.A., por el aporte de instalaciones, equipo, materiales y reactivos necesarios en las diferentes etapas del procedimiento.

Referencias

1. Mosher WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertil Steril* 1991;56:192-193.
2. Ebomoyi E, Adetoro OO. Sociobiological factor influencing infertility in a rural Nigerian Community. *Int J Gynaecol Obstet* 1990;33:41-47.
3. Davis O, Rosenwaks Z. In vitro fertilization. In: Adashi E, Rock J, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers;1996:2320-2324.
4. Veeck LL. Cryopreservation of embryos/eggs. In: Adashi E, Rock J, Rosenwaks Z, eds. *Reproductive endocrinology, surgery and technology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers;1996:2355.
5. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after implantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366.
6. Escalante-López G. Ultrasonido folicular y embarazo: Reporte de los primeros 8 casos en nuestro medio. *Acta Med Cost* 1984;27:5-13.
7. World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
8. Veeck LL. The gamete laboratory: design, management and techniques. In: Keye WR, Chang RJ, Rebar RW, Soules MR, eds. *Infertility: evaluation and treatment*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1995:798-820.
9. Ethics Committee of the American Fertility Society. Ethical considerations of assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 1994;62(suppl 1) 56-59S.
10. Society for Assisted Reproductive Technology. Assisted reproductive technology in the United States and Canada: 1991 results from the Society for Assisted Reproductive Technology generated from the American Fertility Society Registry. *Fertil Steril* 1993;59:956.