

Comparación de un medio de cultivo secuencial y uno continuo para el desarrollo in vitro de embriones humanos

Comparison of a sequential and a continuous culture media for the in vitro development of human embryos

Lucio Dunogent, Estefanía Martínez, Antonio Cattaneo, Diego Gnocchi, Marcela Irigoyen, Lautaro Tessari, A. Gustavo Martínez

Filiación institucional de todos los autores: Medicina Reproductiva Fertilis - Av. Fondo de la Legua 277 - San Isidro - Buenos Aires - Argentina

RESUMEN

Pregunta del estudio: ¿Hay diferencias en los resultados de fecundación in vitro al emplear un medio de cultivo secuencial y uno continuo?

Respuesta: Se observó una mejora en la calidad de los embriones obtenidos en Día 5 en medio continuo.

Lo que ya se sabe: Los medios de cultivo secuenciales ofrecen al embrión los nutrientes específicos para cada estadio. Los medios continuos ofrecen todos los nutrientes a la vez permitiendo que el embrión seleccione los que necesita.

Diseño del estudio: Prospectivo. Se analizaron 189 embriones de 23 tratamientos de FIV. El estudio se realizó entre octubre y diciembre de 2019.

Materiales y métodos: Se utilizaron medios Vitrolife.

Primera evaluación: se analizaron embriones de 12 tratamientos. Los ovocitos fertilizados de cada paciente fueron separados en dos grupos: Un grupo fue colocado en G1 plus desde el Día 1 al 3 de cultivo para luego cambiarlos a G2 plus hasta el

ABSTRACT

Study question: Are there differences in the results of in vitro fertilization when using a sequential and continuous culture media?

Summary answer: An improvement in the quality of embryos obtained on Day 5 was observed in continuous media.

What is known already: Sequential culture media offer the embryo the specific nutrients for each stage. Continuous media offer all the nutrients at the same time allowing the embryo to select the ones it needs.

Study design: Prospective. One hundred and eighty-nine embryos from 23 IVF treatments were analyzed. The study was conducted between October and December 2019.

Materials & Methods: Vitrolife media were used. First evaluation: embryos from 12 treatments were analyzed, separated into two groups. A group was placed in G1 plus from Day 1 to 3 of culture, and then embryos were changed to G2 plus until Day 5; the other was pla-

Día 5; el otro fue colocado en medio TL plus desde el Día 1 al 3 de cultivo, renovando el medio en el Día 3 y cultivándolos hasta el Día 5. Segunda evaluación: se analizaron embriones de 11 pacientes. En este caso, el grupo cultivado en TL plus no se recibió recambio.

Se registraron las tasas de fecundación, de embriones evolutivos, de llegada al estadio de blastocisto y de llegada al estadio de blastocisto expandido, y calidad embrionaria.

El análisis estadístico se realizó empleando el test exacto de Fisher o el test de Mann-Whitney según correspondiera; valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados: En la primera evaluación no se encontraron diferencias significativas entre los dos medios. En la segunda se observó un aumento significativo en la calidad embrionaria de día 5 en favor del cultivo continuo.

Limitaciones del estudio: La evaluación no incluyó la tasa de nacimientos.

Implicancia de los hallazgos: Una mejora en la calidad de los embriones podría correlacionarse con un aumento de las tasas de embarazo y nacimiento.

Palabras clave: Cultivo – Secuencial – Continuo – One step

ced in TL plus medium from Day 1 to 3 of culture, renewing the medium in the Day 3 and cultivating them until Day 5. Second evaluation: embryos from 11 patients were used. In this case, the group grown in TL plus did not receive replacement.

Fertilization rates, embryo development, blastocyst stage, expanded blastocyst stage, and embryonic quality were recorded.

Statistical analysis was performed using Fisher test or Mann-Whitney test; p values < 0.05 were considered significant.

Main results: In the first evaluation, no significant differences were found between media. In the second evaluation, a significant increase in embryonic quality in Day 5 was observed in favour of continuous culture.

Limitations: The evaluation did not include the birth rate.

Wider implication of the finding: An improvement in the quality of embryos could be correlated with an increase in pregnancy and birth rates.

Key words: Culture – Sequential – Continuous – One step

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de mejorar los sistemas de desarrollo embrionario en el proceso de fecundación *in-vitro*, los medios de cultivo han evolucionado desde soluciones básicas conteniendo algunas sales y proteínas hasta la formulación de soluciones complejas muy semejantes al medio en el que el embrión se desarrolla en el aparato reproductor femenino (1). De esta forma se desarrollaron los “medios secuenciales”, los cuales tratan de darle al embrión la concentración de nutrientes adecuada para cada estadio de desarrollo (2). El uso de este tipo de medios implica colocar en el Día 1 de cultivo los óvulos fecundados en una primera solución con baja concentración de glucosa y alta concentración de piruvato como sustrato energético (3), en la que se incubarán hasta el Día 3 de cultivo, momento en el cual serán transferidos a una segunda solución con alta concentración de glucosa como fuente de energía, permaneciendo allí hasta el Día 5 de cultivo, para luego ser transferidos o criopreservados (3).

Recientemente han sido desarrollados los medios continuos (*one-step*), basados en la filosofía de darle todos los nutrientes al embrión y que este seleccione cuál incorporar (4). Esto ha cambiado el paradigma del cultivo secuencial, en el cual, como se mencionó anteriormente, la oferta de nutrientes estaba relacionada con el estadio de desarrollo embrionario.

El uso de medios continuos permite cultivar los ovocitos fecundados desde el Día 1 hasta el Día 5 de cultivo sin la necesidad de mover los embriones de la incubadora (5).

El objetivo del presente estudio fue evaluar los resultados obtenidos comparando un sistema de cultivo con medios secuenciales y uno con un medio continuo, cultivando los embriones hasta el Día 5.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio prospectivo fue llevado a cabo en el laboratorio de reproducción asis-

tida de Medicina Reproductiva Fertilis, San Isidro, Argentina, entre los meses de octubre y diciembre de 2019. La edad promedio de las pacientes fue 34.4 ± 3.6 años (rango 30 a 37 años de edad).

Todas las pacientes fueron estimuladas con FSH recombinante (Gonal-F, Merck-Serono, Alemania) combinada con HMG (Menopur, Ferring, Suecia). Se administró una dosis inicial de 150 a 300 IU de gonadotrofinas durante 5 días, ajustándola de acuerdo a la respuesta ovárica. Al alcanzar un diámetro folicular promedio de 14 mm o niveles de estrógenos de 300 pg/ml se administró una dosis diaria de antagonista de GnRh (Cetrorrelis, Cetrotide NR, Merck-Serono, Alemania) hasta el momento de la descarga, para la cual se administró una dosis simple de 10.000 IU de HCG (Gonacor 5000, Ferring Pharmaceuticals, Suiza) 34-36 hs antes de la aspiración folicular.

Luego de realizar la fecundación *in vitro*, el cultivo se llevó a cabo en incubadoras de mini volumen ESCO Miri, a 37°C, en ambiente con 5% de oxígeno y 6% de dióxido de carbono. Todas las transferencias se realizaron el Día 5 de cultivo, transfiriendo 1 embrión por paciente, empleando para ello un catéter Rocket-EchoCath (Rocket Medical, England) y criopreservando los embriones restantes.

Se registraron la tasa de fecundación, la tasa de embriones evolutivos (embriones de Día 3 con al menos 5 células), la calidad embrionaria, la tasa de llegada al estadio de blastocisto, y la tasa de llegada al estadio de blastocisto expandido.

Se realizaron dos evaluaciones consecutivas.

En la primera evaluación se analizaron embriones de 12 tratamientos. Los ovocitos fecundados de cada paciente fueron separados en dos grupos para ser colocados en medios de cultivos diferentes. Un grupo fue colocado en medio G1 plus (Vitrolife, Suecia) desde el Día 1 al 3 de cultivo para luego cambiar los embriones a medio G2 plus (Vi-

trolife, Suecia) desde el Día 3 al 5, mientras que el otro grupo fue colocado en medio TL plus (Vitrolife, Suecia) desde el Día 1 al 3 de cultivo, renovando el medio en el Día 3 y cultivándolos hasta el Día 5.

En la segunda evaluación se emplearon embriones de 11 tratamientos. Los ovocitos de cada paciente fueron separados en dos grupos. Un grupo fue colocado en medio G1 plus desde el Día 1 al 3 de cultivo para luego cambiar los embriones a medio G2 plus desde el Día 3 al 5, mientras que el otro grupo fue colocado en medio TL plus desde el Día 1 al 5 de cultivo sin renovación.

Los embriones no fueron observados en el Día 2 de cultivo. En aquellos grupos en los que se realizó el cambio de medio de cultivo en Día 3 se registró el número de células y la calidad embrionaria, la cual fue considerada como:

- Excelente: fragmentación <5%, células simétricas, sin multinucleación.
- Buena: fragmentación 5-10%, la mayor parte de las células simétricas, sin evidencia de multinucleación.
- Regular: fragmentación 10-20%, varias células asimétricas, eventualmente con multinucleación.
- Mala: severa fragmentación (>25%), sin simetría celular, evidencia de multinucleación.

En los embriones de Día 5 se registró el estadio de desarrollo:

- Mórula compacta
- Blastocisto en expansión <50%
- Blastocisto en expansión >50%
- Blastocisto expandido
- Blastocisto eclosionando

Por otra parte se registró la calidad de la masa celular interna y del trofoblasto, de la siguiente manera:

Masa celular interna

- Buena (A): prominente, fácil de identificar, con muchas células compactas y

estrechamente adheridas entre sí.

- Regular (B): fácil de identificar, con muchas células que están libremente agrupadas.
- Mala (C): difícil de identificar, con pocas células.

Trofoblasto:

- Bueno (A): muchas células que forman un epitelio cohesivo.
- Regular (B): pocas células que forman un epitelio malo.
- Malo (C): muy pocas células

Para realizar la comparación cualitativa de los embriones de cada grupo se utilizó un score embrionario a partir del cálculo de dos fórmulas que combinaban el grado de desarrollo y la calidad embrionaria. Para los embriones de Día 3 dicha fórmula consistió en la multiplicación de la cantidad de células y un valor asignado a la calidad embrionaria (4: excelente, 3: buena; 2: regular; 1: mala); mientras que para los embriones de Día 5 se asignó un valor progresivo según el grado de desarrollo embrionario (1: mórula compacta; 2: blastocisto en expansión <50%; 3: blastocisto en expansión >50%; 4: blastocisto expandido; 5: blastocisto eclosionando) el cual fue multiplicado por el valor asignado a la calidad de la masa celular interna y la del trofoblasto (3: A – buena; 2: B – regular; 1: C – mala).

El análisis estadístico se realizó empleando el test de Fisher o el test de Mann-Whitney no pareado según correspondiera. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

RESULTADOS

En la primera evaluación se compararon los resultados obtenidos de 12 tratamientos de FIV/ICSI luego del uso de medios secuenciales y continuos con recambio de ambos medios en Día 3. Se recuperó un promedio de 9.4 ± 2.5 ovocitos totales y un promedio de 9.0 ± 2.2 ovocitos maduros por

paciente, mientras que la tasa de fecundación global fue de 92% (97 fecundados de 105 ovocitos maduros inseminados).

No se encontraron diferencias en cuanto a la tasa de embriones evolutivos, score embrionario de Día 3 y Día 5, y la tasa de llegada al estadio de blastocisto y blastocisto expandido (Tabla 1).

En la segunda evaluación se compararon los resultados obtenidos de 11 tratamientos de FIV/ICSI donde no se realizó el recambio de medio continuo en Día 3. Se recuperó un promedio de 10.3 ± 2.7 ovocitos totales y un promedio de 9.9 ± 2.5 ovocitos maduros por paciente, mientras que la tasa de fecundación global fue de 87% (95 fecundados de 109 ovocitos maduros inseminados).

En este caso se encontraron diferencias significativas a favor del medio continuo en el score de los embriones de Día 5 (Tabla 2).

DISCUSIÓN:

En la búsqueda de darle al embrión desarrollado *in-vitro* el mejor ambiente de cultivo para su crecimiento, se han planteado diferentes estrategias, que van desde el uso de medios simples, pasando por el empleo de co-cultivos con líneas celulares hasta el desarrollo de medios secuenciales, y recientemente los medios continuos (6,7). Se han producido grandes avances en la investigación en este campo, los cuales han llevado a contar con medios de cultivo muy simila-

res al medio que encuentra el embrión en la trompa y en el útero (8,9).

La aparición de los medios continuos ha planteado un cambio en el paradigma que postulan los medios secuenciales, donde el embrión debe recibir los nutrientes específicos dependiendo del estadio de desarrollo. El diseño de los medios de cultivo continuos implica el uso simultáneo de todos los nutrientes permitiendo que el propio embrión se adapte y utilice lo que requiera según su estadio de desarrollo (3,4). Esto permite no realizar el recambio de medio en el Día 3.

En el presente estudio hemos comparado el uso de medios de cultivo secuenciales y continuos, buscando posibles diferencias tanto en la tasa de desarrollo de los embriones como en la calidad de los mismos.

Nuestros resultados mostraron que cuando se realiza un recambio del medio continuo en Día 3, ambos medios (secuenciales y continuos) se comportan de manera similar, como se observa en la Tabla 1. Mientras que al utilizar el cultivo continuo (sin recambio en Día 3), pese a obtener resultados similares en general, el score embrionario en Día 5 de cultivo fue significativamente mayor para el medio continuo. Esto muestra una mejor calidad de los embriones obtenidos en Día 5 en medio continuo.

Es posible pensar que esta mejor calidad embrionaria abra la posibilidad de tener mejores resultados en cuanto a tasa de im-

Tabla 1. Resultados obtenidos en la comparación de medios secuencial y continuo con recambio en Día 3 de cultivo.

	Secuencial	Continuo
Ovocitos fecundados asignados	48	46
Promedio de ovocitos fecundados asignados	4.0 ± 1.0	3.8 ± 1.3
Embriones evolutivos	48/48 (100%)	45/46 (98%)
Score embrionario en Día 3	24.1 ± 10.3	25.8 ± 10.1
Tasa de llegada al estadio de blastocisto	23/48 (48%)	26/46 (57%)
Tasa de llegada al estadio de blastocisto expandido	6/48 (13%)	7/46 (15%)
Score embrionario en Día 5	21.4 ± 9.0	21.8 ± 11.5

plantación, de embarazo y de nacimiento. Esto sería beneficioso principalmente en las pacientes con baja respuesta las cuales tendrán pocos embriones, mientras que en las pacientes normorreproductoras la posibilidad de tener embriones de buena calidad es mayor. Pese a ello, el beneficio para este úl-

timo grupo de pacientes puede verse reflejado en un aumento de la tasa acumulativa de embarazo.

Actualmente nos encontramos abocados a la evaluación de dichas tasas luego del empleo de estos medios de cultivo.

Tabla 2. Resultados obtenidos en la comparación de medios secuencial y continuo, sin recambio del medio continuo en Día 3 de cultivo.

	Secuencial	Continuo
Ovocitos fecundados asignados	50	45
Promedio de ovocitos fecundados asignados	4.6±2.2	4.1±2.1
Embriones evolutivos	50/50 (100%)	45/45 (100%)
Tasa de llegada al estadio de blastocisto	25/50 (50%)	25/45 (56%)
Tasa de llegada al estadio de blastocisto expandido	15/50 (30%)	13/45 (29%)
Score embrionario en Día 5	21.8±11.5 *	30.6±6.4 *

(*) Difieren significativamente, $p < 0.05$

BIBLIOGRAFÍA

1. Chronopoulou E, Harper JC. IVF culture media: past, present and future. *Hum Reprod Update* 2015; 21: 39-55.
2. Sunde A, Brison D, Dumoulin J, Harper J, Lundin K, Magli MC, Van den Abbeel E, Veiga A. Time to take human embryo culture seriously. *Hum Reprod*. 2016; 31:2174-2182.
3. Biggers JD, Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod Bio-Med Online*. 2002; 5:133-140.
4. Biggers JD, Summers MC. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 2008; 90:473-483.
5. Sfontouris I, Kolibianakis EM, Lainas GT, Venetis CA, Petsas GK, Tarlatzis BC, Lainas TG. Blastocyst utilization rates after continuous culture in two commercial single-step media: a prospective randomized study with sibling oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34:1377-1383.
6. Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod*. 1998; 13(Suppl 3): 148-159.
7. Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update*. 2003; 9:557-582.
8. Diedrich K, Fauser B, Devroey P, Griesinger G. Evian annual reproduction (EVAR) workshop group. The role of the endometrium and embryo in human implantation. *Hum Reprod Update*. 2007; 13:365-377.
9. Morbeck DE, Krisher RL, Herrick JR, Baumann NA, Matern D, Moyer T. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril* 2014; 102:759-766.