

Embriología

Evaluación de la eficacia de diferentes sistemas comerciales de cultivo embrionario

Evaluation of the efficiency of different commercial systems of embryo culture

Patricia Torres, Irene Peinado, Marina De la Orden, Ana Monzó, Jose María Rubio, Antonio Pellicer.

Unidad de Reproducción Humana, Servicio de Ginecología, Hospital Universitario La Fe, Valencia, España.

Resumen

Objetivo: Comparar dos medios complejos de fecundación in Vitro y cultivo embrionario de diferente composición, valorando la calidad y morfometría embrionaria, tasa de gestación, implantación, aborto y recién nacido vivo.

Material y Métodos: Estudio prospectivo que incluye 70 ciclos de FIV/ICSI realizados en el hospital la Fe entre Octubre y Noviembre del año 2008 distribuidos en dos grupos de estudio: Medio 1 y Medio 2. Los parámetros analizados fueron: fenotipo de las pacientes, parámetros básicos de la estimulación, calidad embrionaria y resultado de los ciclos.

Resultados: No existen diferencias significativas en cuanto a tasa de fecundación (73% en ambos grupos), gestación (Medio 1=47%; Medio 2=54%), implantación (Medio 1=26%; Medio 2=39%), aborto (Medio 1=20%; Medio 2=19%) y recién nacido vivo (34% en ambos grupos). Por el contrario, si se observó diferencias estadísticamente significativas en las características morfológicas y la calidad embrionaria, obteniendo embriones con mayor radio de la Zona Pelúcida ($p=0.001$) y menor número de fragmentos ($p=0.017$) en el grupo del Medio 2.

Conclusión: Los resultados muestran una mejor calidad embrionaria en los embriones cultivados en Medio 2. No obstante, en este estudio, las diferencias observadas no se reflejan en mayores tasas de implantación, gestación, aborto y recién nacido vivo.

Palabras clave: Medio de cultivo. Calidad embrionaria. Parámetros morfológicos. Tasa de embarazo.

Correspondencia: Dra. Patricia Torres
Unidad Reproducción Humana (Serv. Ginecología)
Hospital Universitario La Fe
Avda. Campanar, 21
46009 VALENCIA

Summary

Objective: *To compare two commercial available in vitro fertilization and embryo culture media systems. Embryo quality, morphometric embryo measures, pregnancy rate, implantation rate, miscarriage rate and live birth delivery was evaluated.*

Material and Methods: *Prospective study with 70 FIV/ICSI cycles in Hospital Universitario La Fe of Valencia between October to November 2008 were classified in two groups: Medium 1 and Medium 2. Parameters in this study were: women physical features, stimulation protocol, embryo quality and success of the technique.*

Results: *No significant differences were obtained in fertilization rate (both 73%), pregnancy rate (Medium 1=47%; Medium 2=54%), implantation rate (Medium 1=26%; Medium 2=39%), miscarriage rate (Medium 1=20%; Medium 2=19%) and live birth delivery (both 34%). However, significant differences were obtained in morphometric embryo features and embryo quality, with greater radius of the zona pellucida ($p= 0.001$) and less number of fragments ($p= 0.017$) in Medium 2 group.*

Conclusions: *Embryo quality seemed to be enhanced when embryos were cultured in Medium 2, but not cause any effect in pregnancy, implantation, miscarriage or live birth delivery rate.*

Key words: Culture media. Embryo quality. Morphometric measures. Pregnancy rate.

INTRODUCCIÓN

El medio de cultivo de gametos y embriones es uno de los factores clave en el éxito de la técnica de reproducción asistida (TRA). Se ha investigado mucho acerca de la formulación ideal de dichos medios con el objetivo de aumentar la calidad y supervivencia embrionaria y por tanto, las tasas de gestación.

En la práctica clínica de fecundación in vitro (FIV) los medios de cultivo utilizados se dividen en simples y complejos. Los primeros son soluciones equilibradas con sales asociadas a una fuente de energía de carbohidratos como el piruvato, lactato o la glucosa (HTF medium). Los complejos contienen además aminoácidos, precursores de ácidos nucleicos, vitaminas y por lo general están complementados con suero (1,2).

La industria farmacéutica facilita medios comerciales de fácil utilización, estandarizados, y sometidos a controles de calidad. Tienen en cuenta los cambios que se dan en el entorno in vivo del embrión antes de la implantación y se ajustan a los requerimientos metabólicos de cada etapa (3).

En la etapa previa a la fecundación, los medios de recuperación, mantenimiento y lavado de gametos deben mantener la homeostasis y reducir el impacto de estrés en el cultivo in vitro. Posteriormente, la inseminación se optimiza en un medio rico en glucosa que favorece el metabolismo del complejo cúmulo-corona-ovocito y del espermatozoide (4), metabolito

que es sustituido por piruvato en el momento en que el ovocito es liberado de las células de la granulosa (5). La alta concentración de piruvato fomenta la división temprana y viabilidad del embrión hasta la activación genómica en estadio de 6-8 células, trazo clave en el inicio de transcripción de enzimas implicadas en las diferentes rutas metabólicas incluida la glucólisis (6). Es a partir de la fase de compactación cuando la capacidad biosintética y la actividad respiratoria aumenta de forma que los requerimientos energéticos varían. Además, paralelamente a los cambios en la concentración de carbohidratos, los aminoácidos que se encuentran en bajas concentraciones en el periodo previo a 8 células, son necesarios (esenciales y no esenciales) para el proceso de cavitación del blastocisto, relacionándose con un efecto activador de la cavitación y la formación de la masa celular interna (7). Por todo ello, la aproximación al ambiente bioquímico in vivo varía en composición y concentración en los diferentes medios de cultivo comerciales, acorde con el desarrollo del futuro embrión. La elección de éstos influirá en la eficacia del programa de FIV de los laboratorios por lo que es importante evaluar los resultados obtenidos con los medios que ofrecen las diferentes opciones disponibles.

El presente trabajo tiene como objetivo comparar dos medios complejos de cultivo embrionarios de diferente composición, valorando sus resultados mediante la calidad y morfometría embrionaria, tasa de gestación, implantación, aborto y nacido vivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Estudio prospectivo que incluye 70 pacientes consecutivas a las que se les realizó un ciclo FIV/ICSI del 22 de Octubre al 5 de Noviembre del año 2008 en el Hospital Universitario La Fe de Valencia. La estimulación se llevó a cabo mediante la administración de gonadotropinas (8). En todos los casos seleccionados se comprobó el desarrollo de al menos 3 folículos de diámetro medio mayor o igual a 16 mm de diámetro y niveles de estradiol de alrededor de 200 pg/ml por folículo del tamaño citado. El control del desarrollo folicular se realizó mediante ecografía vaginal y determinación del nivel circulante de estradiol. La maduración final del ovocito se indujo mediante la administración de hCG 35-36h antes de la punción folicular.

La asignación de las pacientes a cada grupo de estudio estuvo condicionada por la disponibilidad de los medios de cultivo utilizados en el trabajo, así se asignó 6 días consecutivos para la utilización de los medios del grupo experimental Cook(®) Limerick, Ireland (Follicle Flushing buffer, Gamete buffer, Fertilization Medium y Cleavage Medium) en adelante Medio 2 (n=32) y 4/3 días antero-posteriores para el grupo control Medicult(®) Jyllinge, Denmark (Flushing Medium, Universal IVF Medium e ISM1), en adelante Medio 1 (n=38).

Selección espermatozoides

El mismo día de la recuperación ovocitaria, se llevó a cabo la técnica de selección de espermatozoides (swim up o resuspensión) con el semen aportado por la pareja.

Recuperación y cultivo de ovocitos, FIV e ICSI

Los cúmulo-corona-ovocito (CCO) se recuperaron bajo un estereoscopio binocular y fueron lavados en una placa (Falcon(®) 35- 1008 NJ, USA) con medio de lavado (Flushing Medium de Medicult(®); Follicle Flushing buffer de Cook(®). A continuación, los cúmulos se pasaron a una placa "de equilibrio" con macrogotas de medio de cultivo (Universal IVF Medium Medicult(®); Fertilization Medium Cook(®) bajo aceite mineral (Ovoiltm) Vitrolife(®) Guthenburg, Sweden; Culture Oil Cook(®) donde se mantuvieron durante 2-3 horas en el incubador (5%CO₂, 37°C y 85% humedad cuando se utilizaba Medicult(®), y 6%

CO₂, 37°C y 85% humedad en los casos del grupo Cook(®).

Cuando la técnica elegida fue FIV clásica los cúmulos se pasaron a la placa "de fecundación" que mantenía las características de la placa "de equilibrio", exceptuando que previamente habían sido inseminadas cada una de sus gotas con una alícuota de la selección de espermatozoides para alcanzar una concentración final de 2 x 10⁵ espermatozoides/ml. En dichas condiciones se cultivaron los gametos durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se decumularon los CCO mediante acción mecánica de pipetas Pasteur estiradas a la llama y se valoró la fecundación.

En los casos que se llevó a cabo **microinyección intracitoplasmática (ICSI)** los CCO se denudaron (2-3 horas post-recuperación ovocitaria) con ayuda de la enzima hialuronidasa (SynVITRO Hydase; Medicult(®); IVF Hyaluronidase Cook(®) y pipetas pasteur estiradas a la llama con diferente calibre. Tras valorar el estado madurativo nuclear de los ovocitos, los Metafase II se depositaron en las gotas de la placa "de ICSI" (FM de Medicult(®) y Gamete buffer Cook(®) y en gotas adyacentes se depositaron los espermatozoides seleccionados en gotas con medio PVP (Medicult(®); Cook(®) para facilitar la inmovilización y su posterior microinyección. Una vez realizada la microinyección (ICSI) los ovocitos se incuban (18horas en microgotas de ISM1 (Medicult (®) o Cleavage Médium (Cook(®).

Valoración embrionaria

En día + 1, los cigotos de fecundación normal: 2 pronúcleos y 2 corpúsculos (2PN y 2CP) se trasladaron a la "placa de crecimiento" con microgotas de medio ISM1 Medicult(®) o Cleavage Medium Cook(®). A las 48 horas post-recuperación se valoraron los embriones según 2 criterios de clasificación: la recomendada por la Asociación para el estudio de la Biología de la Reproducción (ASEBIR) (9) y una modificada de L.Veeck (10), las cuales catalogan el embrión según el potencial implantatorio esperado. Así, la clasificación que propone ASEBIR se divide en 4 categorías (A, B, C y D) y la modificada de L.Veeck cataloga el embrión otorgándole 2 números (nº células y grado). Con el fin de analizar los datos obtenidos se suplanta cada una de las categorías descritas en cada clasificación por un número (III, II, I y 0), de forma que los embriones de buena calidad (A y 4cg1 ó 4cg2) obtienen la máxima puntuación (III) y así sucesivamente. Los embriones con mayor potencial implantatorio se seleccionaron para la transferencia y se fotografiaron.

Parámetros evaluados

Los parámetros analizados en el estudio fueron: **fenotipo de las pacientes** (diagnóstico de esterilidad de cada uno de los miembros de la pareja, índice de masa corporal y edad de las mujeres, recuento de espermatozoides móviles (REM) tras selección de espermatozoides), **parámetros básicos de la estimulación** (días de estimulación, grosor del endometrio y estradiol el día de hCG, número de ovocitos recuperados, número de Metafases II y porcentaje de fecundación), **características de los embriones transferidos** (técnica empleada (FIV/ICSI), calidad según baremación en las dos clasificaciones utilizadas) y **resultado de los ciclos** (gestación, implantación, aborto y nacido vivo). La **valoración morfométrica** de los embriones (número, área y perímetro del embrión, de las blastómeras, de la zona pelúcida (ZP) y de los fragmentos) se efectuó con el programa de análisis de imagen CRONUS 3.1.1.

Estudio estadístico

Se llevó a cabo el análisis estadístico de los datos con el programa informático SPSS 15.0. Todas las variables estudiadas se ajustan a una distribución normal. Las variables cuantitativas fueron comparadas mediante el Test X^2 y las cualitativas mediante el Test T de student. Se consideró significación estadística para valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los descriptivos (características físicas y paráme-

tros básicos de estimulación) que definen cada uno de los grupos estudiados no muestran diferencias significativas entre ambos tras realizar una T de student (Tabla 1).

La causa de esterilidad de las parejas estudiadas también está distribuida de forma homogénea dentro de los grupos estudiados, no encontrándose diferencias entre ellos mediante el Test X^2 (Tabla 2 y 3). Tampoco se encuentra significación ($p=0,145$) comparando la procedencia del semen utilizado (eyaculado de la pareja, donante, testículo o epidídimo) con ambos medios.

No existen diferencias significativas en cuanto a la técnica (FIV, ICSI, FIV/ICSI) realizada en ambos grupos ($p=0,245$).

Se transfieren un total de 135 embriones entre los grupos estudiados: 1.88(0.34 embriones transferidos/ciclo en el grupo Medio 2 vs 1.97(0.37 embriones transferidos/ciclo en el grupo Medio 1, no encontrándose diferencias significativas en dicho parámetro mediante T de student ($p=0.367$). El análisis realizado para determinar la calidad de los mismos se realiza mediante 2 vías: 1º.- Análisis de la baremación otorgada a cada embrión mediante 2 tipos de clasificación embrionaria y 2º.- Estudio morfométrico de los embriones transferidos mediante el programa CRONUS 3.1.1.

1º.- Análisis de calidad embrionaria según baremación.

Tras el análisis individual de cada uno de los grados utilizando ambas clasificaciones (ASEBIR y L.Veeck) se obtuvo mayor número de embriones de óptima calidad (tipo III) utilizando el medio 2, así como un aumento de los embriones con menor categoría

Tabla 1

Comparativa de los parámetros descriptivos más representativos entre los grupos estudiados (Medio 2 vs Medio 1). REM: recuento de espermatozoides móviles; NS: No significativo

	Medio 2 (n=32)	Medio 1 (n=38)	p-valor
Índice Masa Corporal	24.10±4.05	24.55±4.72	NS
Edad	33.97±3.02	34.13 ± 3.31	NS
REM (espermatozoides a+b/ml)	18.58±23.35	27.79±46.34	NS
Días Estimulación	9.64±1.85	8.83±1.49	NS
Grosor endometrial (mm)	12.07±2.32	11.42±2.12	NS
E2 día de hCG (pg/ml)	1755.33±643.18	1707.60±741.11	NS
Nº ovocitos recuperados	11.18±5.22	10.83±5.82	NS
Nº Ovocitos Metafase II	10.34±16.67	7.03±4.05	NS
Nº embriones transferidos	1.88±0.34	1.97±0.37	NS

(tipo I) cuando se cultivaron en el medio 1 (Tabla 4). No se encontraron diferencias significativas al comparar cada uno de los grados entre los grupos estudiados (Medio 1 vs Medio 2).

Tabla 2

Porcentaje de los diagnósticos de esterilidad femenina más comunes dentro de cada grupo estudiado (Medio 2 vs Medio 1). En "Lesión tubárica" se incluye obstructivas y no obstructivas. En "Otras": Fase Lútea Inadecuada, Salpinguectomía Bilateral, Endometriosis, Fallo Ovárico Precoz

		Medio 2 (n=32)	Medio 1 (n=38)	p-valor
Femenino	Normoreponedoras	54,8% (17/31)	52,8% (19/36)	NS
	Anovulación	16,1% (5/31)	16,7% (6/36)	
	Lesión tubárica	16,1% (5/31)	11,1% (4/36)	
	Otras	12,9% (4/31)	19,4% (7/36)	

Tabla 3

Porcentaje de los diagnósticos de esterilidad masculina dentro de cada grupo (Medio 2 vs Medio 1). "OA": muestras OligoAstenozoospermias moderadas o severas; "Otras": muestras criptozoospermias y azoospermias (epididimarias o testiculares)

		Medio 2 (n=32)	Medio 1 (n=38)	p-valor
Masculino	Normozoospermia	0% (0/27)	5,3% (2/38)	NS
	Astenozoospermia	66,7% (18/27)	52,6% (20/38)	
	OA	25,9% (7/27)	18,4% (7/38)	
	Otras	7,4% (2/27)	23,7% (9/38)	

Tras obtener la media de baremación de cada clasificación en ambos grupos, se realizó el análisis estadístico de los datos mediante T de student (Tabla 5). Dado que los embriones de mejor pronóstico se calificaron con la máxima puntuación (Tipo III), el promedio más elevado informó de la mayor calidad embrionaria, que con independencia de la clasificación utilizada correspondió a los embriones obtenidos tras

Tabla 4

Número y porcentaje de embriones de cada grado (1 al 3) según clasificación (ASEBIR vs L. Veeck) por grupo (Medio 2 vs Medio 1).

	Medio 2	Medio 1	Total	p-valor
ASEBIR				
3	42(70%)	42(62%)	84	NS
2	12(20%)	12(18%)	24	NS
1	6(10%)	14(20%)	20	NS
Total	60	68	128	
L.VEECK				
3	40(65%)	38(53%)	79	NS
2	17(27%)	26(37%)	43	NS
1	5(8%)	7(10%)	12	NS
Total	62	71	133	

Tabla 5

Media y desviación estándar de la puntuación obtenida en cada clasificación por grupo (Medio 2 vs Medio 1)

	Medio 2	Medio 1	p-valor
ASEBIR	2.55±0.65	2.22±0.97	0.018
L.VEECK	2.53±0.60	2.31±0.67	NS

cultivo en medio 2. No obstante, los datos muestran diferencias significativas sólo al utilizar la clasificación de ASEBIR (2.55(0.65 Medio 2 > 2.22(0.97 Medio 1; p=0.018), no apreciándose con la clasificación modificada de L.Veeck (p = 0.29).

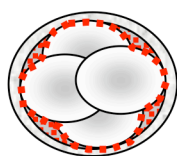
2º.- Evaluación morfométrica de los embriones transferidos.

El análisis estadístico de los datos morfométricos obtenidos mediante el CRONUS(®), no señaló diferencias significativas en el número, ni en el área de las blastómeras, obtenidas en ambos grupos. Tampoco existieron diferencias significativas en el área del espacio perivitelino, ni en el tamaño del embrión. Sin embargo, existen diferencias con respecto al tamaño de la ZP, siendo levemente mayor el radio en los embriones obtenidos tras cultivo con Medio 2 (19.18(2.98 vs 17.16(1.54; p=0.001). Se obtiene significación estadística si analizamos el número de fragmentos obtenidos tras cultivo con los medios evaluados, siendo mayor con Medio 1 (27.00(36.73 vs 17.93(16.35; p=0.017) (Tabla 6).

Los datos analizados para valorar la eficacia de los ciclos efectuados con cada uno de los medios son: gestación (54% Medio 2 vs 47% Medio 1), implantación (39% Medio 2 vs 26% Medio 1), aborto (19%

Tabla 6

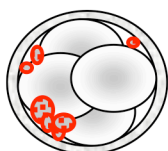
Media y desviación estándar de los parámetros morfométricos embrionarios obtenidos en cada grupo de estudio (Medio 2 vs Medio 1). Número Total de Blastómeras (NTB), Área Total Blastómeras (ATB), Área Espacio Perivitelino (AEP), Diámetro Externo Zona Pelúcida (DEZP), Diámetro Interno ZP (DIZP), Radio ZP (RZP), Área ZP (AZP), Número de Fragmentos (NFG), Área Total de los Fragmentos (ATFG), Perímetro Total de los Fragmentos (PTFG)



	Medio 2	Medio 1	p-valor
NºTB	3.88(0.53)	4.091(0.73)	NS
ATB	9247.80(737.48)	9355.65(994.38)	NS
AEP	2016.45(699.36)	2052.18(757.34)	NS



DEZP	159.48(6.91)	156.37(6.43)	NS
DIZP	121.07(4.23)	121.81(4.84)	NS
RZP	19.18(2.98)	17.16(1.54)	0.001
AZP	8688.98(1264.94)	7859.25(953.97)	NS



NFG	17.93(16.35)	27.00(36.73)	0.017
ATFG	3913.88(2971.77)	4058.54(3870.00)	NS
PTFG	473.79(528.39)	543.65(1008.73)	NS

Medio 2 vs 20% Medio 1) y RNV (34% Medio 2 y Medio 1). Los resultados no muestran diferencias significativas entre los grupos tras realizar Test X² y T de student (Tabla 7).

DISCUSIÓN

Los sistemas de cultivo empleados en reproducción asistida proporcionan las necesidades metabólicas para la obtención de pre-embriones, añadiendo los requerimientos energéticos y aminoácidos que se ajustan a cada etapa del proceso fisiológico. Además, los medios comerciales cumplen con los controles de calidad indispensables como la esterilización y filtración, y pruebas como el Test de supervivencia espermática, test de embriones de ratón y test de endotoxinas.

Además de las condiciones de cultivo, el éxito en fecundación in Vitro viene condicionado por otros factores como la edad de las pacientes, días de estimulación, grosor del endometrio, estradiol el día de hCG, número de ovocitos recuperados, número de Metafases II y número de embriones transferidos, los cuales son homogéneos en nuestro estudio.

En este trabajo la tasa de fecundación no presenta diferencias entre ambos grupos, posiblemente debido a que ambos medios proporcionan un microambiente

Tabla 7

Porcentaje de las tasas de Gestación (TG), Implantación (TI), Aborto (TA) y Recién Nacido Vivo (TRNV), en cada uno de los grupos estudiados (Medio 2 vs Medio 1) al transferir 2 embriones en día 2

	TG	TI	TA	TRNV
Medio 2	53.6% (15/28)	39% (22/56)	20% (3/15)	34%
Medio 1	46.7% (14/30)	30% (18/60)	14% (2/14)	34%
p-valor	NS	NS	NS	NS

rico en glucosa en esta etapa. Ésto revalida la hipótesis de trabajos previos que confirman la importancia de la glucosa como sustrato energético en la fecundación humana, favoreciendo la capacitación espermática y el metabolismo de las células del cúmulo (4, 11). Además, el estudio del grosor de la ZP ha emergido en los últimos años como parámetro de selección embrionaria y varios trabajos han probado su correlación con la fecundación y la tasa de implantación (12-14). En nuestro estudio, los embriones cultivados en el Medio 2 tienen la ZP significativamente más gruesa que los del Medio 1. Las diferencias refieren a las medidas tomadas del Radio de los embriones, mientras que el Área de la ZP no alcanza significación estadística a pesar de que sus valores también presentan

variaciones. Aun así, en este trabajo no se puede relacionar el grosor de la ZP con el porcentaje de fecundación, ya que éste fue el mismo con ambos medios (73%). Cabe la posibilidad de que estas disimilitudes se manifiesten al aumentar el tamaño muestral de ambos grupos, o tal vez que no muestren diferencias en la tasa de fecundación porque el porcentaje de FIV realizada es menor que el de ICSI (13% vs 87%), y el mayor grosor de la ZP con respecto a la fecundación sólo tendría relevancia en los casos donde no forzamos el paso de dicha barrera glucoproteica (FIV).

Se ha reportado la relación directa entre velocidad de división embrionaria y el desarrollo in vitro hasta blastocisto (15), demostrando así que los embriones de 4 células tras 48 horas post inseminación tienen mayor potencial implantatorio que los de 2 células (16,17). En trabajos previos que también comparan medios secuenciales obtienen mayor proporción de embriones "retardados" al utilizar el Medio 2 frente a los cultivados en P1 (18) y Menezo B2 (19). Por el contrario, en nuestro trabajo no se observan diferencias en el número de células de los embriones en día +2, lo cual es consecuente con la no significación en los porcentajes de implantación y gestación de ambos grupos. No obstante, cabe resaltar que el Medio 2 utilizado en los dos estudios citados no es el mismo que se ha utilizado en este trabajo, ya que en Abril 2007 la empresa farmacéutica presentó una renovación de su producto cambiando tanto el envasado, como la formulación del medio. Un estudio multicéntrico realizado con el fin de valorar los cambios realizados en la formulación muestra un aumento tanto en el número de embriones con 8 células en D+3 (48% vs 53%), como en la tasa de gestación (35% vs 40%) (datos facilitados por la propia casa comercial). Los cambios más relevantes en el Medio 2 (Cleavage medium) hacen referencia al incremento de aminoácidos esenciales, vitamina B5, magnesio y glucosa y la disminución de fosfato y de lactato cálcico.

En cuanto a la calidad embrionaria, se observan diferencias significativas a favor del Medio 2 cuando la clasificación se realizó según criterios de ASEBIR, fundamentalmente por la subjetividad de criterios en la valoración del "grado" en el caso de L. Veeck. De hecho, esta diferencia coincide con los resultados obtenidos en el estudio morfométrico, ya que existe significación estadística en el número de fragmentos entre los grupos estudiados, encontrando mayor cantidad en los cultivados en el Medio 1 (ISM1). Es difícil atribuir esta variación en la calidad a las posibles diferencias en la composición de los medios, puesto que ambas marcas utilizan similares constituyentes en sus productos de cultivo embrionario. Así, éstos se basan fundamentalmente en una mayor proporción de

Piruvato respecto de Glucosa (la concentración exacta no es especificada generalmente por la empresa) e incorporan los 20 aminoácidos más el ácido orgánico taurina, sales fisiológicas, albúmina de suero humano (HSA) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), variando el tipo de antibiótico (penicilina y estreptomina en Medio 1, y gentamicina en Medio 2) y la presencia/ausencia de rojo fenol como indicador de pH (Medio 1/Medio 2). Además, el Medio 1 contiene colesterol e incluye como vitamina el ácido ascórbico (vitamina C), cuyas propiedades antioxidantes evitan el daño celular. Por otro lado, el Medio 2 aporta pantotenato cálcico (vitamina B5), precursor del coenzima A necesario en la síntesis de fosfolípidos requeridos para la formación de la membrana plasmática.

También existen diferencias en la formulación de ambos medios (básicamente de tampón bicarbonato y variantes) para mantener el rango de pH de 7.2 a 7.3 ± 0.1 (20) que determinan la concentración de CO₂ necesaria. Estudios de la propia empresa farmacéutica del Medio 2 revelan que sus medios secuenciales tardan menor tiempo en equilibrarse y llegar hasta el pH óptimo en un 6% CO₂ atmosférico, minimizando así el estrés producido por el propio embrión para mantener la homeostasis intracelular. Por otro lado, el protocolo del Medio 1 establece un rango más abierto (5-6% CO₂) dependiendo de la localización y condiciones del laboratorio donde se trabaja. En cualquier caso, en este estudio se siguieron las recomendaciones de ambas marcas, y se mantuvieron estrictamente estables.

Al igual que trabajos similares previos, no se encuentra significación estadística en la tasa de gestación utilizando ambos medios de cultivo, aunque los resultados publicados se inclinan a favor del Medio 1 (21), al contrario que en nuestro caso (46,7% Medio 1; 53,6% Medio 2). En este artículo también comparamos la tasa de recién nacido vivo, siendo igual en ambos casos (34%).

En conclusión, ambos medios tienen en cuenta los factores necesarios para la obtención de embriones in vitro capaces de implantar y dar lugar a nacidos vivos. Además, nuestros resultados son concordantes con los referidos en la bibliografía cuando se comparan varias marcas de sistemas de cultivo (22-25). No obstante, se debe seguir apostando por mejorar los medios secuenciales, intentando reproducir lo más preciso posible el entorno in vivo de gametos y embriones.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Quinn P, Kerin JF, Warnes GM.:** Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use

- of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*. 1985 Oct;44:493-8
2. **Paolo GA, Valeria V, Vito C, Francesca C, Alexandra V, Andrea RG.:** A randomized control comparison study of cultura media (HTF versus P1) for human in Vitro fertilization. *Obst. Gynec.* 2004, 2: 122-125.
 3. **Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J.:** Environment of the preimplantation human embryo in-vivo: Metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril*. 1996;65:349-353
 4. **Mahadevan MM, Miller MM, Moutos DM.:** Absence of glucose decreases human fertilization and sperm movement characteristics in vitro. *Hum Reprod*. 1997 Jan;12:119-23
 5. **Biggers JD.:** Pioneering mammalian preimplantation embryo. New York Plenum Press 1987: 1-22
 6. **Braude P, Bolton V, Moore S.:** Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988;31; 332:459-61
 7. **Lane, M. and D. Gardner.:** Differential regulation of mouse embryo developments and viability by amino acids. *J. Reprod. Fertil.*, 1997; 109: 153-164.
 8. **Romeu A, Monzó A, Peiró T, Díez E, Peinado JA, Quintero LA.:** Endogenous LH surge versus hCG as ovulation trigger after low-dose highly purified FSH in IUI: Comparison of 761 cycles. *J Assist Reprod Genet.*, 1997; 14: 439-445.
 9. **Ardoy M, Calderón G y cols.:** Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos. Cuadernos de embriología clínica. ASEBIR. 2008
 10. **Veek. L.:** Prembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. An atlas of human gametes and conceptuses. An illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group Inc.; 1999a p.46-51.
 11. **Quinn PJ.:** Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *Assist Reprod Genet*. 1995 Feb;12:97-105.
 12. **Mahutte NG, Arici A.:** Failed fertilization: is it predictable?. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2003 Jun; 15:211-8.
 13. **Gabrielsen A, Bhatnager PR, Petersen K.:** Influence of zona pellucida thickness of human embryos on clinical pregnancy outcome following in vitro fertilization treatment. *J Assist Reprod Genet*. 2000 Jul; 17:323-8
 14. **Sun YP, Xu Y, Cao T.:** Zona pellucida thickness and clinical pregnancy outcome following in Vitro fertilization. *Int J Gynaecol Obstet*. 2005 Jun;89: 258-62
 15. **Muggleton-Harris AL, Glazier AM, Wall M.:** A retrospective analysis of the in vitro development of "spare" human in-vitro fertilization preimplantation embryos using "in house" prepared medium and "Medi-Cult" commercial medium. *Hum Reprod* 1995; 10:2976-2984.
 16. **Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J, Roulier R.:** Embryo score to predict implantation after in-vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod*. 1995 Sep; 10: 2427-31.
 17. **Salumets A, Hydén-Granskog C, Mäkinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T.:** Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod*. 2003 Apr;18:821-5.
 18. **Ben-Yosef D, Amit A, Azem F, Schwartz T, Cohen T, Mei-Raz N, Carmon A, Lessing JB, Yaron Y.:** Prospective randomized comparison of two embryo culture systems: P1 medium by Irvine Scientific and the Cook IVF Medium. *J Assist Reprod Genet*. 2004 Aug;21:291-5.
 19. **DeClerck E, Janssens R, Joris H, Verheyen G, Van Steirteghem A.:** Prospective, controlled, randomized comparison of two embryo culture systems: Menezo B2 medium and Cook IVF. In ESHRE Annual meeting, Bologna, Italy. 2000: 801-900.
 20. **Quinn P.:** Media used in the assisted reproductive technologies laboratories. In: Patrizio P, Tucker MJ, Guelman V, eds. A color atlas for human assisted reproduction. Laboratory and clinical insights. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003:241-56.
 21. **Mendoza R, Expósito A, Corcóstegui B, Ramón O, Etxanojauregi A, Matorras R, Rodríguez-Escudero FJ.:** Comparación de los resultados en FIV/ICSI con tres medios de cultivo secuenciales: Vitrolife, Medi-Cult y Cook. *Revista Iberoamericana de fertilidad*. 2003; 20: 311-315.
 22. **Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Franco JG Jr.:** A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. *J Assist Reprod Genet*. 2001 Jul;18:378-81.
 23. **Van Langendonck A, Godin PA, Demille D, Béliard A, Wyns C, Donnez J.:** Pregnancy outcome following human embryo culture in G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media : a prospective randomized comparative study. *Human Reprod* 2000; 15 (Abstract Book 1): 141.
 24. **Staessen C, Van der Abbeel E, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC.:** Controlled comparison of Earle's balanced salt solution with Menezo B2 medium for human in-vitro fertilization performance. *Hum Reprod* 1994; 9:1915-9.
 25. **Zollner KP, Zollner U, Schneider M, Dietl J, Steck T.:** Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit* 2004; 10:1-7.