

Cultivo embrionario en microgotas recubiertas por aceite mineral. Comparación de resultados de dos tipos de aceites

Microdrops embryo culture cover by mineral oil. Comparison of two types of mineral oil

Pedrero S¹, Gutiérrez-Corchado L¹, Guarnizo M. C¹, Bachiller J¹, Estrade A¹, Gasca L¹, Salido E¹, Bebek H².

¹Unidad de Reproducción Asistida. Policlínica San Mauricio. Jerez de la Frontera. (Cádiz). España. ²Hospital General Universitario. (Valencia). España

Resumen

Objetivo: valorar la influencia en las tasas de gestación e implantación embrionaria de la utilización de aceite mineral como protector de las microgotas de cultivo embrionario y comparación de dos tipos de aceites.

Ámbito: Centro privado de diagnóstico y tratamiento de la esterilidad.

Sujetos del estudio: han sido estudiadas 32 pacientes que se sometieron a un ciclo de fecundación in vitro con transferencia embrionaria. No se tuvo en cuenta el factor de infertilidad de las pacientes.

Resultados: del total de las 32 punciones, el grupo que obtuvo mejores tasas de gestación e implantación embrionaria fue el de la parafina de Medicult, 58,33% y 29,03%, respectivamente. En ningún caso se apreciaron diferencias significativas.

Conclusión: la elección de un determinado aceite mineral para recubrir las microgotas de cultivo embrionario no afecta a los resultados de un programa de Fecundación in Vitro / Transferencia Embrionaria (FIV/TE).

Palabras claves: cultivo secuencial. Aceite mineral. Tasa gestación e implantación embrionaria.

Summary

Objective: to determine the influence on pregnancy and embryo implantation rates using paraffin oil as protector of embryo microdrops, and comparison of two types of mineral oil.

Group: 32 patients who underwent to a cycle of in vitro fertilization with embryo transfer were studied.

Results: from of the 32 cycles, paraffin oil of Medicult got the best results on pregnancy and embryo

Correspondencia: Dr. Sergio Pedrero Santos
Policlínica San Mauricio
Unidad de Reproducción Asistida
Avda. Los Álamos, 2
11407 Jerez de la Frontera (Cádiz)
sergiopedrero@hotmail.com

implantation rates with 58,33% and 29, 03%, respectively. None of the cases there were significant differences.

Conclusion: the choice of a different types of paraffin oil to cover microdrops of embryo culture does not affect to the IVF program results.

Key words: Media culture. Mineral oil. Pregnancy and implantation rates.

INTRODUCCIÓN

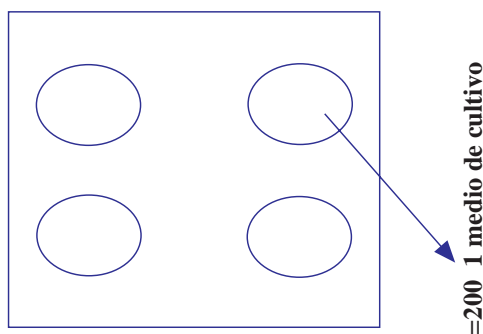
El objetivo de las técnicas de fecundación in vitro y el cultivo embrionario es conseguir embriones viables (de buena calidad) que sean capaces de desarrollarse hasta blastocisto (in vivo o in vitro), implantar y dar lugar a niños nacidos sanos.

Uno de los aspectos que más tenemos en cuenta en el laboratorio de fecundación in vitro son los cultivos embrionarios (1) y todo lo relacionado con ellos. El embrión requiere diferentes componentes nutricionales a medida que avanza a lo largo de las trompas falopio hacia el útero (2, 3). Los medios de cultivo intentan asemejar su composición a la que se encuentran los embriones durante este viaje, y es por esto que normalmente se utilicen diferentes medios de cultivo dependiendo del día de desarrollo embrionario donde se encuentre el embrión.

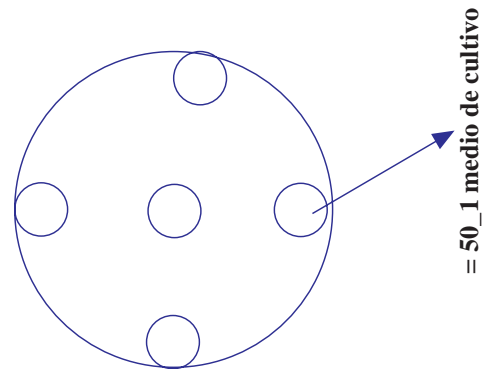
Sólo nos hemos centrado en los cultivos secuenciales (1, 4) ya que son éstos los que utilizamos a menudo en la clínica diaria, y no hemos tenido en cuenta los co-cultivos (5) en este estudio.

Dos de los métodos de cultivo secuencial más usados en los distintos laboratorios son:

- * En placas de cuatro pocillos (Nunc, Dinamarca), donde se trabaja sin recubrir el medio de cultivo con aceite mineral



- * En microgotas de cultivo recubiertas de aceite mineral



Nos vamos a limitar a comentar ésta última, y sobretodo vamos a hacer hincapié en el aceite mineral que recubre las microgotas de cultivo. La función principal del aceite mineral es proteger a los ovocitos o embriones frente a posibles contaminaciones (6); también es un medio protector frente a cambios de pH y temperatura (6). Por el contrario, existen autores que consideran perjudicial la utilización del aceite mineral en los cultivos embrionarios ya que las tasas de desarrollo embrionario hasta blastocisto son mejores en cultivos embrionarios sin aceite mineral (7-10).

En este estudio nos planteamos como objetivo saber si la utilización de aceite mineral, y en concreto de un determinado aceite, como protector de las microgotas de cultivo podía o no influir en las tasas de gestación e implantación embrionaria.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo consiste en un estudio prospectivo en el que no se tuvo en cuenta ni el factor de infertilidad ni tampoco la edad de las pacientes a la hora de elegir aquellas que entraban a formar parte del estudio, aunque si que se hizo un estudio estadístico de la variable cuantitativa edad. Un total de 32 punciones componen el estudio, las cuáles se dividieron en dos grupos:

- * Grupo A. Se utilizó como aceite mineral el Ovoil (Vitrolife, Goteborg, Suecia)

* Grupo B. El aceite utilizado fue la parafina líquida de Medicult (Medicult, Dinamarca)

En el estudio se incluyeron todas las pacientes, independientemente del número de embriones transferidos o de la calidad de los mismos. La técnica que se empleó para la fecundación fue la microinyección intracitoplasmática (ICSI). Todas las transferencias que se realizaron fueron intrauterinas, bajo control ecográfico y en día +3 (72 horas post punción ovárica).

Preparación de los medios

Tanto los medios de cultivo como el aceite mineral se prepararon el día anterior a la punción ovárica y se colocaron en un incubador a 37 °C y un 5% de CO₂.

Preparamos IVF (Vitrolife, Goteborg, Suecia) como medio de cultivo y Flushing Medium (Medicult, Dinamarca) como medio tamponado donde colocábamos los ovocitos que íbamos recuperando del líquido folicular. El aceite mineral no hizo falta suplementarlo con nutrientes puesto que ya viene suplementado; en un tubo de 50 mL (Falcon, Estados Unidos) colocamos 40 mL de aceite por punción. En los dos casos, una vez preparados se incubaron hasta el día de la punción (24 horas después, aproximadamente).

El mismo día de la punción, volvimos a preparar aceite mineral de la misma forma, pero ahora como medio de cultivo preparamos G1.2 (Vitrolife, Goteborg, Suecia) (1). Al día siguiente se siguió la misma rutina que el día anterior.

El día +2, 48 post punción ovárica, preparamos como medio de cultivo G2.2 (Vitrolife, Goteborg, Suecia) (1), al igual que también preparamos G2.2 para utilizarlo como medio de transferencia al día siguiente.

Cultivo embrionario

Una vez que los ovocitos metafases II fueron microinyectados, se colocaron en una placa de cultivo (Falcon, Estados Unidos) compuesta por cinco microgotas periféricas de medio de cultivo (IVF-20, Vitrolife, Goteborg, Suecia) y una microgota central también de IVF. De las cinco microgotas periféricas, cuatro de 40 µl donde se colocan los ovocitos microinyectados, y una quinta gota de 50 µl que se utiliza como lavado. El número de ovocitos que se colocaron por microgota fue de tres como máximo; en el caso de tener más de doce ovocitos microinyectados se utilizó una segunda caja de cultivo.

Pasadas 16-20 horas post microinyección se procedió a observar cuantos ovocitos habían fecundados.

Aquellos que presentaban dos pronúcleos fueron colocados en una nueva caja de cultivo, similar a la anterior, pero con la diferencia que el medio de cultivo era el G1.2 (Vitrolife, Goteborg, Suecia). El número de cigotos por microgota no fue nunca superior a tres.

El día +2, 48 horas post punción ovárica, los embriones fueron valorados morfológicamente y cambiados a una nueva caja de cultivo cuyas microgotas también eran de G1.2.

Todas las transferencias embrionarias se realizaron 72 horas después de la punción ovárica, día +3. El número de embriones a transferir dependió de, primero y principal de la opinión de la pareja, y posteriormente se tuvieron en cuenta otros factores como la información de posibles ciclos anteriores, la edad de la paciente y la calidad embrionaria.

Los embriones elegidos para ser transferidos fueron colocados en una caja de pocillo central (Falcon, Estados Unidos) con medio G2.2 (Vitrolife, Goteborg, Suecia). Aquellos embriones que no se transfirieron fueron colocados en cajas de cultivo secuencial, también con medio de cultivo G2.2, pero ya sin aceite mineral que recubriera el medio de cultivo. Los embriones que alcanzaron el estadio de blastocistos fueron criopreservados (Freeze-kit 2, Vitrolife, Goteborg, Suecia).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para las variables paramétricas se utilizó la prueba independiente de la t de Student, considerándose diferencias significativas aquellas cuya $p < 0,05$. Las variables no paramétricas fueron comparadas con la prueba de la Chi Cuadrado, considerándose también diferencias significativas aquellas con una $p < 0,05$. se utilizó el programa informático SPSS v.10 para la realización de todos los cálculos estadísticos.

RESULTADOS

El estudio se compone de 32 punciones ováricas, 20 al grupo A (Ovoil) y 12 al aceite de Medicult, grupo B.

En cuanto a las características de las pacientes (tabla 1) no hubo diferencias significativas en ninguna de las variables cuantitativas estudiadas. La edad de los dos grupos fue muy pareja; $32,6 \pm 4,54$ del grupo A frente a $33,42 \pm 4,19$ para el grupo B.

En el diagrama de caja (figura 1) tampoco se observan diferencias importantes y vemos como en los

Tabla 1
Variables paramétricas

| | Grupo A | Grupo B |
|-------------------------------------|--------------|--------------|
| n ciclos | 20 | 12 |
| Edad | 32,6 ± 4,54 | 33,42 ± 4,19 |
| n ovocitos | 12,15 ± 4,93 | 9,08 ± 6,24 |
| n cigotos | 6,70 ± 2,75 | 5,75 ± 3,65 |
| n embriones transferidos | 3,05 ± 0,39 | 2,58 ± 0,99 |
| Embriones transferidos grado I y II | 2,35 ± 1,04 | 1,58 ± 1,08 |

Valores expresados como media ± error estándar de la media

dos grupos la mayoría de los datos (edades) pertenecen al mismo rango de valores.

Del resto de variables paramétricas que se han tenido en cuenta tampoco se observan diferencias importantes. El grupo B, aceite Medicult, es el que presenta valores más bajos tanto en el número de ovocitos obtenidos tras la punción ovárica, 9,08 ± 6,24, como en el número de cigotos obtenidos, 5,75 ± 3,65 (tabla 1). Pese a haber diferencias, cuando se realizó el estudio estadístico no se observaron que estas fueran significativas entre los dos grupos del estudio (tabla 2).

En cuanto al número de embriones transferidos y la calidad de los mismos (grado I y II) si que se apre-

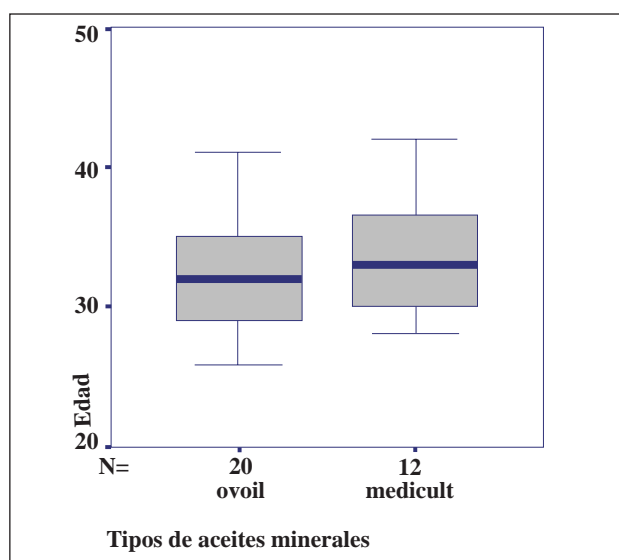


Figura 1
Diagrama de caja de la variable edad

Tabla 2
Estudio estadístico de las variables paramétricas

| | p-valor ovoil vs medicult |
|-------------------------------------|------------------------------|
| Edad | 0,616 |
| n ovocitos | 0,134 |
| n cigotos | 0,410 |
| n embriones transferidos | 0,070 |
| Embriones transferidos grado I y II | 0,056 |

Ds (diferencia significativa) p<0.05

cian diferencias que están muy próximas de ser significativas (p=0,070 y p=0,056, respectivamente) aún cuando el aceite Medicult es el que presenta valores más bajos para la variable número de embriones transferidos, 2,58 ± 0,99 frente a 3,05 ± 0,39 del grupo A. La calidad de los embriones también favoreció al grupo A frente al del aceite Medicult: 2,35 ± 1,04 para el grupo A y 1,58 ± 1,08 para el grupo B, (tabla 2).

Las tasas de gestación que a continuación se van a mostrar corresponden a tasas por transferencia embrionaria. La tasa de gestación general de las 32 punciones fue de 56,25% y la de implantación embrionaria de 29,35%. Tanto la tasa de gestación como la de implantación embrionaria fueron similares en los grupos A y B; aún así, en ninguno de los casos hubo diferencias significativas (tabla 3). De todas formas habría que hacer hincapié en el hecho que sólo hicimos 12 transferencias con embriones cultivados bajo aceite Medicult y que este grupo era el que presentaba valores más bajos en el número de ovocitos, cigotos, embriones transferidos y calidad de los mismos.

Tabla 3
Tasas de gestación e implantación embrionaria

| | Grupo A Ovoil | Grupo B Medicult | p-valores |
|-------------------|-------------------|---------------------|-----------|
| n ciclos | 20 | 12 | — |
| Tasa gestación | 11/20 (55%) | 7/12 (58.33%) | NS |
| Tasa implantación | 18/61 (29.51%) | 9/31 (29.03%) | NS |

NS. Diferencia no significativa

DISCUSIÓN

Según Shimada et al (8) la utilización de aceite mineral como protector de las microgotas de cultivo disminuye la tasa de desarrollo embrionario hasta blastocisto de los ovocitos de cerdos madurados con aceite frente a los ovocitos madurados en un medio sin aceite mineral. Nosotros no podemos ni estar de acuerdo ni en desacuerdo, ya que todos los cultivos embrionarios, a partir del tercer día post-punción ovárica, los realizamos en cajas de doble pocillo sin aceite mineral, y además son embriones humanos.

Para Erbach et al. (9) el zinc es un posible agente tóxico contaminante en los cultivos embrionarios recubiertos por aceite mineral. En este mismo sentido, Miller et al (10, 11) también postulan que cubrir las microgotas de cultivo con aceite mineral provoca la liberación de sustancias embriotóxicas.

A nosotros nos parece imprescindible la utilización del aceite mineral durante la denudación y fecundación de los ovocitos, porque es el momento de máxima manipulación de los mismos. Es en este momento cuando se producen las máximas variaciones de pH y de temperatura. En cambio, a partir del día +1 (24 horas post-punción ovárica) la utilización del aceite mineral no es tan importante, ya que los tiempos de trabajo fuera del incubador son mínimos, a no ser que tengamos que realizar el diagnóstico genético preimplantacional de los embriones.

En cuanto a la comparación de los dos tipos de aceites, ovoil y medicult, no se han observado diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas, ni en las paramétricas ni en las no paramétricas. Habría que comentar que el grupo B (aceite medicult) fue el que obtuvo mejores tasas de gestación y de implantación embrionaria; en cambio, fue el grupo donde el número y la calidad de los embriones transferidos fue menor y más baja, respectivamente, en comparación con el otro grupo en estudio. También fue el grupo en que la media de los ovocitos y el número de cigotos fue más bajo (tabla 1). Esto nos hace sospechar que cuando tengamos series más amplias de datos las diferencias serán más importantes aunque dudamos que lleguen a ser significativas.

BIBLIOGRAFIA

1. **Anne Van Langendonck Ph. D, Dominique Demylle Ph. D, Christine Wyns M. D, Michelle Nisolle M.D, Jacques Donnez Ph. D.:** Comparison of G1.1/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertile Steril*, 2001 Nov; 76 (5): 1023-31
2. **Rousseau JP, Menezo YJR.:** Role of the female genital tract in the transport and survival of gametes and the fertilized egg. In reproduction in Mammals and ManCh. Thibault, MC Levasseur and RHF Hunter (ed). Ellipses, 1993; 369-86
3. **Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ.:** Effects of pyruvate and glucose on the development of human implantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil*, 1993; 99: 87-95
4. **B. Behr, T. B. Pool, A. A. Milki, D. Moore, J. Gebhardt, Dasig D.:** Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod*, 1999; 14 (2): 454-57
5. **Janny L, Vye P, Pouly J. L, Hazout A, Dumont M, Nicollet B, Menezo Y.:** Cocultures: diagnostic and therapeutic value. *Fertilite Contraception Sexualite*, 1993 May; 21(5):391-4
6. **Zhu J, Tsigotis M, Pelekanos M, Craft I.:** In-vitro maturation of human testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, 1996 Jan; 11(1):231-2
7. **Van SoomA, Mahmoudzadeh AR, Cristophe A, YsebaerMT, Kruijff A.:** Silicone oil used in microdrop culture can affect bovine embryonic development and freezability. *Reprod Domest Anim*, 2001; 36: 169-76
8. **Shimada M, Kawano N, Terada T.:** Delay of nuclear maturation and reduction in developmental competence of pig oocytes after mineral oil overlay of in vitro maturation media. *Reproduction*, 2002; 124: 557-64
9. **Erbach GT, Bhatnagar P, Baltz JM, Biggers JD.:** Zinc is a possible contaminant of silicone oil in microdrop cultures of preimplantation mouse embryos. *Hum Reprod*, 1995 Dec; 10(12): 3248-54
10. **Miller KF, Goldberg JM, Collins RL.:** Covering embryo cultures with mineral oil alters embryo growth by acting as a sink for an embryotoxic substance. *J Assist Reprod Gen*, 1994 Aug ; 11(7): 342-5
11. **Miller KF, Pursel VG.:** Absorption of compounds in medium by the oil covering microdrop cultures. *Gamete Res*, 1987 May; 17(1):57-61