

## **Estudio comparativo de dos medios de cultivo HTF e ISM-1: implicaciones en el fenotipo embrionario y resultados clínicos**

*Comparative study of two different embryo culture media HTF and ISM-1: re-  
percussion on both embryo phenotype and reproductive outcome*

Gimeno L, López MA, Meseguer M, de los Santos JM, Pellicer A, Remohí J, de los Santos MJ.

Instituto Universitario IVI Valencia. Laboratorio de Embriología Clínica, Valencia, España

### **Resumen**

**Objetivo:** *El objetivo del presente trabajo es comparar dos medios de cultivo embrionario: uno simple, el HTF, y otro más complejo, el ISM-1, a nivel de desarrollo embrionario hasta blastocisto y resultados clínicos de implantación y recién nacido vivo.*

**Diseño:** *Estudio prospectivo randomizado.*

**Ámbito de desarrollo:** *Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Valencia. España.*

**Características de la población:** *Un total de 118 pacientes del programa de donación de ovocitos fueron asignados aleatoriamente a los medios de cultivo ISM-1/ISM-2 o HTF/CCM. Del total de 630 embriones, 355 fueron cultivados en ISM-1 y 275 en HTF. Cuando la transferencia embrionaria se realizaba en estadio de blastocisto, los embriones eran trasplantados a ISM-2 o CCM en día 3 respectivamente. Las variables analizadas fueron tasa de fecundación y score pronuclear, evaluación del fenotipo embrionario en estadios de desarrollo temprano y tardío, tasa de implantación, gestación, tasa de aborto y recién nacido vivo.*

**Intervenciones realizadas:** *Donación de ovocitos, FIV o inyección intracitoplasmática de espermatozoides, cultivo embrionario, transferencia en día 3 o día 5/6.*

**Variables de valoración:** *Fecundación, fenotipo embrionario, implantación, gestación, aborto y recién nacido vivo.*

**Resultados:** *Tras el cultivo de los embriones en ISM-1 se apreció un aumento significativo del número de embriones con blastómeras multinucleadas (0,03 versus 0,07 respectivamente), así como un incremento en el número de embriones con citoplasma granulado y/o vesiculado (18% versus 67% respectivamente), comparado con el medio HTF. Un total de 57,4% de embriones que se cultivaron en el grupo HTF/CCM llegaron a estadio de blastocisto, mientras que sólo lo hicieron el 37% de los embriones del grupo ISM-1/ISM-2, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a*

---

Correspondencia: Dra. M<sup>a</sup> José de los Santos Molina  
Plaza Policía Local, 3  
46015 Valencia, España  
mjdelossantos@ivi.es

las tasas de gestación, implantación y recién nacido vivo, no se observaron diferencias significativas cuando las transferencias embrionarias se realizaron en día 3 entre los embriones cultivados en HTF versus ISM-1 respectivamente (52,27%, 36,1%, 60,9% versus 44,68%, 27,3% y 45%), mientras que cuando se transfirieron embriones en estadio de blastocisto se observó una disminución significativa en la tasa de gestación e implantación y recién nacido vivo en los embriones cultivados con ISM-1/ISM-2 comparado con el grupo de HTF/CCM (66,7%, 56,7%, 92% versus 46,7%, 33,3% y 40%).

Conclusiones: La secuencia de cultivo embrionario ISM-1/ISM-2 proporcionó embriones de peor calidad fenotípica que aunque no se reflejó en el resultado reproductivo cuando las transferencias embrionarias se realizaron en día 3, si dió lugar a un deterioro en la habilidad de dichos embriones a llegar a blastocisto in vitro con la consiguiente disminución de la tasa de implantación, embarazo en curso y recién nacido vivo.

**Palabras clave:** ISM-1. HTF. Calidad embrionaria.

### **Summary**

Objective: *The aim of the present work was to compare two different embryo culture media, one simple HTF versus another more complex ISM-1, at both embryo quality and IVF outcome.*

Design: *Prospective randomized study.*

Setting: *Instituto Universitario IVI Valencia. España.*

Patient(s): *A total of 118 patients of the ovum donation programme were randomly allocated to either HTF/CCM or ISM-1/ISM-2.*

Intervention(s): *Oocyte donation, IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI), embryo culture till day 3 or blastocyst stage.*

Main outcome measures: *Fertilization, embryo phenotype, implantation, ongoing pregnancy and take home baby rate.*

Results: *Culture of embryos in ISM-1 induced a significant increase on both multinucleation rate (0,03 vs 0,07) and granularity of cytoplasm (18% vs 67%) compared to HTF medium. A total of 57,4% of the embryos cultured on HTF/CCM achieved blastocyst stage compared to 37% from embryos grown in ISM-1/ISM-2 ( $p < 0.05$ ). Regarding pregnancy, implantation and take home baby rates, no differences were observed on day 3 embryo transfers (52,27%, 36,1%, 60,9% versus 44,68%, 27,3% and 45% respectively), however, when blastocyst transfers were performed, a significant decrease on pregnancy, implantation and take home baby rate were seen after ISM-1/ISM-2 embryo culture (66,7%, 56,7%, 92% versus 46,7%, 33,3% y 40%).*

Conclusion(s): *Culture of human embryos on ISM-1/ISM-2 yielded embryos with worse quality although the IVF outcome was not affected when day 3 embryo transfers were performed, however extended embryo culture on this media resulted in lower blastocyst formation rate, lower pregnancy and implantation rates as well as lesser take home baby rate.*

**Key words:** ISM-1. HTF. Embryo quality.

## **INTRODUCCIÓN**

La finalidad de las técnicas de fecundación in vitro y el cultivo embrionario es conseguir embriones de buena calidad capaces de desarrollarse de forma adecuada, implantar y dar lugar a recién nacidos sanos. Indudablemente, el medio de cultivo empleado va a ejercer un efecto sobre el embrión de forma que se considera de vital importancia el disponer de un medio de cultivo que sustente con la mayor idoneidad

posible el desarrollo de los embriones hasta su transferencia. Aunque algunas estrategias de cultivo embrionario están diseñadas para imitar el entorno fisiológico embrionario (1) ajustándose a los requisitos nutricionales del mismo durante su desarrollo, otros se basan en la autonomía del embrión para utilizar lo que necesita basándose en formulaciones más complejas capaces de sustentar todos los estadios embrionarios previos a la implantación (2).

En la actualidad, los tipos de medios que se utili-

zan en la práctica clínica se clasifican en simples o complejos: los simples, como el HTF (3), consisten en una solución salina balanceada a la que se añaden fuentes de energía como el piruvato, lactato y glucosa y un suplemento proteico, principalmente albúmina, mientras que los más complejos, como el ISM-1, además contienen aminoácidos, algunas vitaminas, precursores de ácidos nucleicos, EDTA y colesterol.

Los avances en la adecuación ambiental y tecnológica de los laboratorios de fecundación In Vitro (4, 5) junto con criterios de evaluación embrionaria más refinados (6, 7) y las mejoras en los protocolos de estimulación ovárica (8-11) están consiguiendo incrementar de forma significativa los resultados de implantación y gestación. Ni que decir tiene que la elección del medio de cultivo es una variable más a tener en cuenta para ayudar a mejorar de forma sensible los resultados clínicos de un laboratorio de FIV. De hecho, hay muchos estudios comparativos de medios de cultivo mostrando diferencias en los embriones durante su crecimiento ex vivo hasta blastocisto, así como diferencias en las tasas de gestación e implantación conseguidas con éstos.

El objetivo del presente estudio es comparar dos medios de cultivo embrionario: uno simple, como el HTF, y otro más complejo, el ISM-1, a nivel de desarrollo embrionario hasta blastocisto, prestando especial atención a cambios en los fenotipos embrionarios clásicos, así como a resultados de gestación, implantación y tasa de recién nacido vivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes y protocolos de estimulación ovárica y terapia hormonal sustitutiva

Un total de 118 pacientes que acudieron a nuestro programa de donación de ovocitos por diferentes causas fueron incluidas en este estudio. Las parejas fueron asignadas de forma aleatoria a cada uno de los medios de cultivo, de forma que un total de 56 fueron asignados al medio de cultivo HTF y 62 al medio de cultivo ISM-1. La edad de las receptoras en el grupo de HTF y en el grupo ISM-1 fue 38,9 + 4,7 y 39,6 + 4,8 respectivamente.

Para la estimulación ovárica en las donantes se utilizaron de forma indistinta, tanto protocolos con agonistas, como con antagonistas de la GnRH. En el caso de los primeros, se empleó un protocolo largo en el que los pacientes empezaban con la administración de 0,1 mg de acetato de Leuprolide (Procrin; Abbott S.A., Spain) o Triptorelina (Decapeptyl; Ipsen Pharma, Spain) en la fase lútea de un ciclo previo

hasta que se determinaba la quiescencia ovárica mediante ultrasonido vaginal. En ese momento la dosis del análogo de GnRH se disminuía hasta 0,05 mg hasta el día de la administración de hCG (12). Los antagonistas de la GnRH se administraron siguiendo un protocolo de bajas dosis diarias (13); en estos casos, la estimulación comenzaba el día 6 con 0,25 mg de Cetrotide (Cetrorelix; Serono S.A., Spain) y su administración continuaba diariamente hasta el día de la administración de la hCG. La estimulación ovárica se realizó mediante aplicación de FSH recombinante (Gonal-F; Serono S.A. Spain; o Puregon; Organon Española, Spain) y hMG (Lepori; Pharma Laboratorios, Spain; o Menopur; Ferring, Spain). La hCG (Profasis 10000UI; Serono S.A., Spain) se administraba cuando tres o más folículos alcanzaban 18 mm de diámetro y la captación ovocitaria se programaba 36 horas después.

En cuanto a las pacientes receptoras de ovocitos, la preparación endometrial se realizó mediante la utilización de terapia hormonal sustitutiva con valeriano de estradiol en dosis crecientes iniciándose con 2 mg/día entre los días 1 y 8 del ciclo, aumentando a 4mg/día durante los días 9 y 11, y a 6 mg/día a partir del día 12 del ciclo. El día de la donación de ovocitos se añadía progesterona micronizada a una dosis de 800mg/día por vía vaginal (14, 15). En el caso de que las receptoras tuvieran función ovárica se introducía en el protocolo la utilización de análogos de la GnRH (14, 15).

### Embriones y condiciones de cultivo

Los ovocitos recuperados fueron inseminados usando tanto procedimientos convencionales de FIV como técnicas de micromanipulación ICSI, dependiendo de la calidad seminal el día de la donación ovocitaria. La distribución de ambos tipos de técnicas de inseminación fue similar en ambos grupos estudiados.

Un total de 1022 ovocitos y 630 embriones fueron incluidos en el estudio. En el grupo HTF (56 pacientes, 455 ovocitos y 275 embriones) se utilizó medio HTF suplementado con 10% de HSA (Vitrolife, Sweden AB, Kungsbacka, Sweden) como medio de maduración ovocitaria, inseminación y desarrollo embrionario hasta día 3. Tras la evaluación de la fecundación, los cigotos fueron trasvasados a medio fresco gaseado de HTF hasta el día 3 de desarrollo. Los embriones que necesitaban llegar hasta blastocisto fueron transferidos a CCM (Vitrolife, Sweden AB, Kungsbacka, Sweden).

En el grupo ISM-1 (62 pacientes, 567 ovocitos y

354 embriones) se utilizó medio HTF como medio de maduración y medio ISM-1 de Medicult (Jyllinge, Denmark) desde la fecundación hasta el día 3 de desarrollo. En día 3 de desarrollo se utilizó medio ISM-2 en aquellos casos en los que se necesitó llevar los embriones hasta estadio de blastocisto.

Los embriones fueron transferidos en la cavidad uterina bien en día 3 ó en estadio de blastocisto. La distribución de ambos tipos de transferencia fue similar en ambos grupos de estudio. La consideración de embarazo fue confirmada con la existencia de saco gestacional con latido cardiaco fetal.

### **Evaluación de la fecundación**

La evaluación de la fecundación y la morfología pronuclear del cigoto se observó a 40 aumentos bajo un microscopio invertido como describe Gámiz y col.(16). Brevemente, los cigotos se clasificaban en dos grupos en función del tamaño de los pronúcleos: aquellos de igual o similar tamaño (grupo A) y aquellos de diferentes tamaños (grupo B). En cada grupo, los cigotos eran subdivididos en cuatro categorías de acuerdo con el número, la distribución y la sincronía de los cuerpos precursores de los nucleolos (NPB): subgrupo 1, pronúcleo con  $3\pm 4$  NPB polarizados; subgrupo 2,  $7\pm 3$  NPB sincrónicos y polarizados o  $7\pm 3$  NPB distribuidos al azar por todo el pronúcleo; subgrupo 3, 1 ó 2 NPB en uno de los pronúcleos; y subgrupo 4, todos aquellos con morfología distinta a la de los grupos 1, 2 ó 3 (NPB polarizados asincrónicos, alineamiento de más de 10 NPB en el punto de contacto de los dos pronúcleos, una diferencia de más de 3 NPB entre pronúcleos, menos de 4 NPB distribuidos aleatoriamente en ambos pronúcleos).

### **Evaluación de la morfología embrionaria**

Los fenotipos de división embrionaria fueron evaluados los días 2 y 3 teniéndose en cuenta para ello el número, simetría y granulosidad de las blastómeras, tipo y porcentaje de la fragmentación, presencia de blastómeras multinucleadas y grado de compactación (17).

Los blastocistos fueron evaluados además en día 5 y 6 en función de la expansión de la cavidad del blastocele y el número e integridad tanto de las células del trofoectodermo (T) como las de la masa celular interna (ICM), previamente descrita (16). Dentro del estadio de blastocisto, se diferenciaron cinco tipos: blastocisto temprano (BT) en el que comienza a formarse la cavidad y empieza la diferenciación celular, blastocisto cavitado (BC) en el que el blastocele ocupa aproximadamente el 50% del volumen del em-

brión, blastocisto expandido (BE) en el que se observa el blastocele rodeado por una monocapa celular o trofoectodermo y una masa celular interna y una zona pelúcida afinada, blastocisto eclosionando o hatching (BHi) en el que el blastocisto comienza a salir a través de la zona pelúcida y blastocisto eclosionado o hatched (BH) donde el blastocisto está completamente fuera de la zona pelúcida (18).

La selección de los embriones para transferencia se basó en el score morfológico del embrión así como en la evolución de los embriones durante el tiempo de crecimiento in vitro.

### **Análisis estadístico**

Para comparar entre grupos se empleó un test paramétrico (T-test) para el análisis de aquellos datos que presentaban una distribución normal. Se consideraron diferencias significativas los valores de  $p < 0,05$ . Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) y para múltiples comparaciones post hoc se usó el test de Scheffe. Para la comparación entre grupos con variables no paramétricas se realizó el test Chi-cuadrado.

El análisis estadístico se hizo utilizando el Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, IL) y MedCalc Software (Ghent, Belgium).

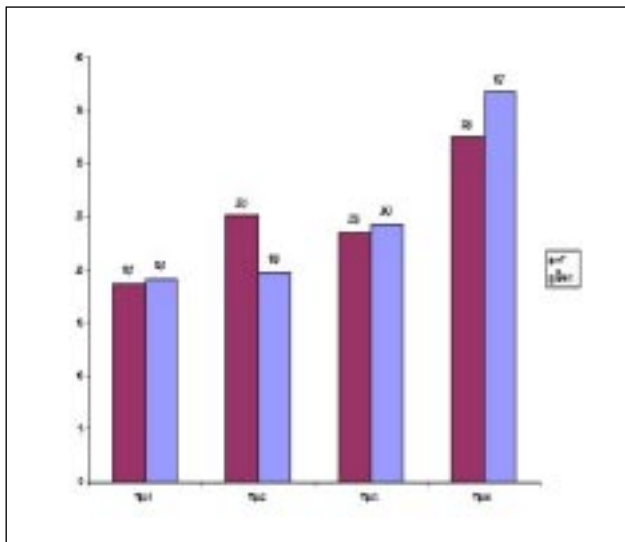
## **RESULTADOS**

### **Fecundación y evaluación de los cigotos**

Las tasas de fecundación obtenidas tras la utilización de HTF o ISM-1 fueron del 69,6% y del 72,5% respectivamente, no encontrándose diferencias significativas cuando se compararon. Tampoco se observaron diferencias significativas en la distribución de los patrones pronucleares en cuanto a la simetría de los pronúcleos. El porcentaje de cigotos con distinto score pronuclear para el tipo 1 fue de: 18,7% para los cultivados en medio HTF y de 19,1% para el medio ISM-1; para el tipo 2 fue de 25,1% para el medio HTF y 19,8% para el medio ISM-1; para el tipo 3 fue de 23,5% en HTF y 24,3% en ISM-1 y para el tipo 4 fue de 32,5% en el medio HTF y de 36,7% en el grupo de cigotos obtenidos en ISM-1 (figura 1), no siendo estas diferencias estadísticamente significativas.

### **Fenotipos embrionarios y desarrollo hasta blastocisto**

En lo que se refiere al desarrollo embrionario preimplantacional, éste fue comparable entre ambos tipos de medios de cultivo de forma que en día 2 el



**Figura 1**

Porcentaje de cigotos distribuidos en función de sus características pronucleares en HTG y CCM-1

número medio de blastómeras en HTF e ISM-1 fue de  $3,98 \pm 0,07$  y de  $4,03 \pm 0,14$  respectivamente. En cuanto a la velocidad de crecimiento en día 3 tampoco se apreciaron diferencias significativas siendo la media de blastómeras en HTF de  $7,32 \pm 0,11$  y en ISM-1 de  $7,22 \pm 0,09$ . De la misma forma, tampoco el porcentaje de fragmentación de los embriones se vio afectado por el cultivo en HTF comparado con ISM-1 en día 2 y día 3 siendo respectivamente de  $11,14 \pm 0,78$  y  $12,53 \pm 0,62$  en HTF y de  $11,19 \pm 0,65$  y  $11,83 \pm 0,54$  en ISM-1. Sin embargo, sí se apreciaron diferencias significativas en la media de blastómeras multinucleadas en día 3 siendo de  $0,03 \pm 0,01$  para los embriones cultivados en HTF y de  $0,07 \pm 0,01$  en ISM-1 ( $p = 0,026$ ) (tabla 1). También se vio un aumento significativo en el porcentaje de embriones con apariencia del citoplasma granulado y/o vesiculado siendo de 18% en el grupo de los embriones cultivados con HTF y de 67% en el grupo de ISM-1 en día 2, y de 14% en HTF y de 51% en ISM-1 en día 3 (tabla 1).

Un total de 27 pacientes tenían planificada la transferencia en estadio de blastocisto y, por lo tanto, los embriones se cultivaron durante 5 ó 6 días hasta su transferencia. Ochenta y siete embriones de 12 pacientes crecieron en HTF hasta día 3, momento en el que se trasvasaron a CCM y en la otra mitad, otros 105 embriones procedentes de 15 parejas crecieron en ISM-1 hasta día 3 momento en el cual también se trasvasaron a ISM-2.

**Tabla 1**

Descripción de los fenotipos embrionarios en los medios de cultivo HTF e ISM-1

	HTF (n=275)	ISM-1 (n=354)	P valor
Nº Células en D2	$3,98 \pm 0,07$	$4,03 \pm 0,14$	ns
% de Fragmentación en D2	$11,14 \pm 0,78$	$11,19 \pm 0,65$	ns
Media de blastómeras multinucleadas por embrión en D2	$0,15 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	0,071
% embriones granulosos/vesiculados D2	18	67	0,026
Nº Células en D3	$7,32 \pm 0,11$	$7,22 \pm 0,09$	ns
% de fragmentación en D3	$12,53 \pm 0,62$	$11,83 \pm 0,54$	ns
Media de blastómeras multinucleadas por embrión en D3	$0,03 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$	0,026
Nº Células en D3	$7,32 \pm 0,11$	$7,22 \pm 0,09$	ns
% embriones granulosos/vesiculados D3	14	51	0,026

Un total de 57,4% (50/87) de los embriones del grupo HTF/CCM llegaron al estadio de blastocisto mientras que un 37% (39/105) de los embriones llegaron a blastocisto en el grupo ISM-1/ISM-2, resultando estas diferencias estadísticamente significativas.

#### Transferencia embrionaria, gestación, implantación y nacidos vivos

Una media de 2 embriones fueron transferidos por paciente. Todas las transferencias se realizaron con ayuda ecográfica por vía uterina y con catéter de transferencia Wallace (Hythe Kent, UK).

Las tasas de gestación clínica e implantación fue del 52,27% y 36,1% respectivamente en el grupo de pacientes que tuvieron transferencia de embriones cultivados en D3 en HTF y de un 44,68% y 27,3% respectivamente en el grupo de pacientes cuyos embriones se habían obtenido en ISM-1, resultados que no alcanzaron diferencias estadísticamente significativas (tabla 2).

En lo referente a las transferencias de embriones en estadio de blastocisto, el 100% de las parejas que cultivaron sus embriones en la secuencia HTF/CCM tuvieron transferencia embrionaria mientras que el 73% de las parejas cuyos embriones crecieron en ISM-1/ISM-2 culminaron en transferencia.

Las tasas de gestación e implantación entre ambos grupos también resultaron ser estadísticamente dife-

**Tabla 2**

Resultados reproductivos tras la transferencia de embriones cultivados en HTF/CCM e ISM-1/ISM-2

	Día 3	Blastocisto		
	HTF (n=44)	ISM-1 (n=47)	CCM (n=12)	ISM-2 (n=15)
Gestación	52,27% (23/44)	44,68% (21/47)	66,7% (8/12)	46,7% (7/15)
Implantación	36,1%	27,3%	56,7%	33,3%

rentes, siendo del 66,7% y 56,7% en las pacientes con blastocistos obtenidos en HTF/CCM en comparación con sólo el 46,7% y 33,3% de las pacientes que consiguieron embarazo de blastocistos desarrollados en ISM-1/ISM-2 (tabla 2).

De la misma forma resultó estadísticamente significativo la tasa de RNV por paciente con transferencia en cada grupo que fue de 64,3% (36 niños) en el grupo de HTF/CCM versus 41,9% (26 niños) en el grupo de ISM-1/ISM-2.

## DISCUSIÓN

La evolución y expansión de las técnicas de Fecundación in Vitro ha facilitado la existencia en el mercado de un sin fin de nuevas formulaciones de medios de cultivo para gametos y embriones. Cada formulación cambia la concentración de algunos componentes o añade uno nuevo con el propósito de mejorar el rendimiento en la obtención de embriones de calidad óptima para una vez ser transferido, implantar y evolucionar de forma propicia. En cualquier caso no dejan de ser formulaciones que, con la intención de emular las condiciones in vivo, se quedan en aproximaciones mediocres de la situación ideal.

La elección por un laboratorio de uno u otro medio de cultivo se basa, en muchas ocasiones, en los resultados previos en series de pacientes comparando con los medios que ese laboratorio esté utilizando de forma habitual.

En el estudio que nos ocupa comparamos dos medios de cultivo, HTF e ISM-1, en ovocitos y embriones obtenidos de ciclos de donación ovocitaria. Un número semejante de pacientes se distribuyó de forma aleatoria en cada uno de los grupos.

Se cree que tras la fecundación y las primeras divisiones, el entorno del embrión se encuentra enriquecido con *piruvato* y *lactato* y bajas concentraciones de glucosa. Después de la activación genómica, cuando el embrión alcanza el estadio de seis a ocho células, se produce un aumento en el consumo de glucosa. Actualmente se acepta que una concentra-

ción de glucosa de 2.78 mM en el medio de cultivo es suficiente para mantener la movilidad espermática, satisfacer los requerimientos de glucosa de los primeros estadios en el ciclo de la pentosa-fosfato y evitar los efectos tóxicos que producía en las primeras divisiones embrionarias (19). En cuanto a los niveles de fosfato, se acuerda que en la fase de postcompactación, cuando aumenta la actividad glicolítica en el embrión, deberían moderarse entorno a 0.25 mM (20), para minimizar sus efectos negativos en combinación con la glucosa. Todos estos beneficios son en principio aportados por ambos tipos de medio estudiados; tal vez por ello no se apreciaron diferencias en la comparación de las tasas de fecundación, ni en la distribución de los diferentes patrones pronucleares estudiados ni en la media de blastómeras de los embriones cultivados en ambos grupos. Dicha similitud también podría tal vez deberse a que a pesar de que en el grupo de ISM-1 los ovocitos fueron traspasados a ISM-1 tras la microinyección, el medio de maduración ovocitaria, es decir, el medio en que estuvieron los ovocitos desde su captación a su inseminación, fue el mismo en ambos grupos y, por lo tanto, los ovocitos culminaron la maduración citoplasmática en el mismo ambiente bioquímico antes de su inseminación/microinyección, ya que no hubieron diferencias en cuanto a la calidad seminal de las parejas del estudio.

La comparación sobre los fenotipos de división embrionarios hasta día 3 de desarrollo utilizando uno u otro medio mostró que ni el número medio de blastómeras, ni simetría entre ellas, grado o tipo de fragmentación, ni compactación fueron diferentes entre ambos grupos.

La única característica distintiva entre ellas fue el aspecto de las blastómeras tanto en día 2 como en día 3 de desarrollo embrionario. Los embriones que habían sido cultivados en medio ISM-1 mostraban un aspecto de las blastómeras mucho más granuloso y/o vesiculado que aquellos cuyo medio de crecimiento fue HTF. Este aumento en el aspecto granulado de las blastómeras podría tener una relación con su actividad transcripcional. Sin embargo, si esto fuera cierto, dicho acontecimiento no se reflejó en la habilidad de dichos embriones a implantar tras su transferencia en día 3, pero tampoco mejoró su capacidad de evolucionar ex vivo a estadios más avanzados ya que un menor porcentaje de embriones cultivados en la secuencia ISM-1/ISM-2 fueron capaces de diferenciarse hasta blastocisto. Otro de los motivos podría deberse a la presencia de EDTA en el medio ISM-1; se ha descrito una relación de la granulosidad de los embriones con altas concentraciones de EDTA en el me-

dio de cultivo (21), molécula que está ausente en el medio HTF usado.

Otras sustancias que se incluyen en el diseño de los medios de cultivo son ciertos *aminoácidos* como glicina, glutamina y taurina; su adición a los medios de cultivo se debe a que se cree que son importantes porque tienen capacidad para tamponar el pH intracelular del embrión cuyo mantenimiento es fundamental para minimizar el estrés homeostático y metabólico responsable de la pérdida de viabilidad embrionaria (22). Se ha observado que los aminoácidos pierden el grupo amino espontáneamente en solución de forma que los medios de cultivo sólo podrían ser incubados durante un tiempo limitado antes de que se alcancen niveles tóxicos de amonio (23). En el caso de la glutamina, esencial en la transición del estadio de ocho células a mórula, una solución es la sustitución por el dipéptido estable alanyl-glutamina que no desamina (24) y más recientemente se ha publicado que la adición de glicil-glutamina favorece el desarrollo de la masa celular interna (25). Sin embargo, y a pesar de la ausencia de glutamina en el medio HTF, no se observaron diferencias en el grado de compactación ni en la habilidad de formación de blastocistos. La *taurina*, beneficiosa durante las primeras 48h de cultivo, previene la deplección del contenido intracelular de los embriones y actúa como antioxidante junto al EDTA (26, 27). En cuanto a la *alanina*, parece no ser necesaria en el medio porque los propios embriones la producen por transaminación del piruvato durante el proceso de eliminación de amonio del medio (28). El medio HTF, a diferencia del medio ISM-1, no lleva ningún tipo de aminoácido y, sin embargo, esto no afectó a la calidad embrionaria en día 3 ni a las tasas de gestación e implantación conseguidas con ambos medios.

Tras la comparación de ambos tipos de medio, aunque las tasas de gestación e implantación no se vieron afectadas en las transferencias embrionarias en día 3, la eficiencia reproductiva del medio se vio negativamente afectada al cultivar los embriones durante más tiempo hasta el estadio de blastocistos, tal vez influenciada por la mayor elevada tasa de multinucleación que presentaron los embriones en ISM-1. De hecho la tasa de gestación, implantación y recién nacido vivo fue significativamente menor en los casos en los que los embriones crecieron en la secuencia ISM-1/ISM-2 en comparación con la secuencia habitual de nuestro centro HTF/CCM por lo que se desestimó la utilización de ISM-2 para cultivo prolongado.

Otro de los datos analizados fue la tasa de recién nacido vivo que resultó ser significativamente mejor

en el grupo de HTF/CCM que en el de ISM-1/ISM-2, lo que podría de alguna forma reflejar que aunque la tasa de gestación e implantación no fuera diferente, el medio ISM-1 no favoreció el crecimiento postimplantatorio, dando una mayor tasa de aborto. Queda una vez más reflejada la importancia de la utilización de uno u otro medio de cultivo en el fenotipo embrionario y las consecuencias clínicas que pueden tener a pesar de conseguir embriones con fenotipos aceptables en día 3 de desarrollo.

Ante la imposibilidad de conocer la composición cuantitativa de la secuencia del medio ISM-1/ISM-2, los resultados obtenidos en este estudio nos hacen pensar que a pesar de que las diferencias cualitativas en la composición de los medios empleados son mínimas, si que deben existir diferencias cuantitativas de algunos de los componentes que se traducen en unos mejores resultados al utilizar la secuencia de medios HTF/CCM.

En resumen, la utilización de ISM-1/ISM-2 en nuestra rutina de trabajo dió lugar a un cambio en el fenotipo embrionario a nivel de granulación de las blastómeras y multinucleación que se reflejó en una disminución de la tasa de gestación, implantación y RNV mayoritariamente debida a los casos en los que se dejaron los embriones crecer hasta estadio de blastocisto. Las diferencias cualitativas existentes en los medios de cultivo utilizados en ambos grupos pone de manifiesto la cuestión de las verdaderas necesidades nutricionales de los embriones humanos al menos en los primeros estadios evolutivos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Gardner DK, Lane M.:** Embryo culture systems. In: Handbook of in vitro fertilization. Trounson A, Gardner DK. (eds.). CRC Press, Boca Raton (FL), 1993; pp.: 85-114.
2. **Barnet DK, Bavister BD.:** What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? Mol Reprod Dev 1996; 43: 105-133.
3. **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; 44: 493-498.
4. **Brassescio A, Cairó O, Rovira S, Aísa S, Zorrilla J, Guardino X, Berenguer MJ, Brassescio M.:** Pequeños cambios en el laboratorio de reproducción asistida: ¿mejoran su eficiencia? Rev Int Androl 2004; 2(2): 68-72.
5. **Cutting R, Pritchard J, Clarke H, Martin K.:**

Establishing quality control in the new IVF laboratory. *Hum Fertil* 2004; 7(2): 119-125.

6. **Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Cizek-Sajko M.:** Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reproductive BioMedicine Online* 2004; 8(6): 687-694.
7. **Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S, Sapienza F, Varoni E, Greco E.:** Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 10(5): 669-681.
8. **Daya S, Gunby B.:** Recombinant versus urinary FSH for ovarian stimulation in assisted reproduction. *Hum Reprod* 1999; 14: 2207-2215.
9. **Bouchard B, Fauser BC.:** Gonadotropin-releasing hormone antagonist: new tools vs old habits. *Fertil Steril* 2000; 73: 18-20.
10. **Bouloux PM, Handelsman DJ, Jockenhovel F et al.:** First human exposure to FSH-CTP in hypogonadotropic hypogonadal males. *Hum Reprod* 2001; 16: 1592-1597.
11. **Dal Prato L, Borini A.:** Use of antagonists in ovarian stimulation protocols. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 10(3): 330-338.
12. **Pellicer A, et al.:** Ovarian response and outcome of in-vitro fertilisation in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 1989; 4(3): 285-289.
13. **Díaz I, Navarro J, Blasco L, Simón C, Pellicer A, Remohí J.:** Impact of stage II-IV endometriosis on recipients of sibling oocytes: matched case control study. *Fertil Steril* 2000; 74: 31-34.
14. **Bosch E, Reis Soares S, Aizpurua J, Serra V, Lara C, Remohí J.:** Donación de ovocitos. En: Manual práctico de esterilidad y reproducción humana, pp.: 189-203. Remohí J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. (eds.). McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid, 2005.
15. **Bosch E, Bellver J, Escudero E, Pellicer A, Rodríguez M, Vidal C, Gaytán J, Remohí J.:** Donación de ovocitos. En: Reproducción humana, pp.: 489-498. Remohí J, Pellicer A, Simón C, Navarro J, (eds.). McGraw-Hill/Interamericana de España, Madrid, 2002.
16. **Gámiz P, Rubio C, de los Santos MJ, Mercader A, Simon C, Remohi J, Pellicer A.:** The effect of pronuclear morphology on early development and chromosomal abnormalities in cleavage-stage embryos. *Hum Reprod* 2003; 11: 2413-2419.
17. **Alikani M, et al.:** Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum Reprod* 2000; 15(12): 2634-2643.
18. **Mercader A, Gámiz P, Albert C, Romero JL, Escribá MJ.:** Valoración morfológica del blastocisto. En: Manual práctico de esterilidad y reproducción humana, pp.: 425-434. Remohí J, Cobo A, Romero JL, Pellicer A, Simón C. (eds.). McGraw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, 2005.
19. **Quinn P.:** Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 97-105.
20. **Gardner DK, Lane M.:** Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution of sequential media. In: Principles of cloning, pp.: 187-213. Cibelli J, Lanza R, Campbell K, West MD. (eds.). Elsevier Science, San Diego, 2002.
21. **Cooke S, et al.:** Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril* 2002; 78: 1254-1260.
22. **Lane M, Gardner DK.:** Amino acids and vitamins prevent culture induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. *Hum Reprod* 1998; 13: 991.
23. **Lane M, Gardner DK.:** Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2003; 69: 1109-1117.
24. **Lane M, Gardner DK.:** Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 305-312.
25. **Summers MC, McGinnis LK, Lawitts JA, Biggers JD.:** Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum Reprod* 2005; 20: 1364-1371.
26. **Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK.:** Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod* 1998; 13: 3441-3448.
27. **Dumoulin JCM, Evers JLH, Bras M, Pieters MHEC, Geraedts JPM.:** Positive effect of taurine on preimplantation development of mouse embryos in vitro. *J Reprod Fert* 1992; 94: 373-380.
28. **Quinn P.:** Media use in the assisted reproductive technologies laboratories. In: A colour atlas for human assisted reproduction. Laboratory and clinical insights, pp.: 241-256. Patrizio P, Tucker MJ, Guelman V. (eds.). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003.