

Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de Reproducción Asistida

Evolution of the culture media in assisted reproduction techniques

Dorado M, Marqués de Oliveira N, Lorenzo C, Vázquez G, Marco Y

Instituto de Reproducción Marques de Oliveira (IRMO)
Santa Cruz de Tenerife- Spain CP 38006.

Resumen

Desde que se iniciaron las Técnicas de Reproducción Asistida, se intentó llevar a blastocistos los embriones obtenidos, puesto que éste es el estadio en el cual el embrión se implanta en el útero. Los dos sistemas de cultivo más extendidos son el cocultivo y el cultivo secuencial.

La técnica del cocultivo consiste en cultivar embriones sobre una monocapa de células, autólogas o heterólogas, que le proporcionan las moléculas necesarias para el desarrollo del embrión hasta blastocisto. En el cultivo secuencial se cultivan embriones en diferentes medios en distinta composición de nutrientes según el estadio embrionario.

El objetivo de esta revisión es dar a conocer la evolución que se ha llevado a cabo en los sistemas y composición de los medios de cultivos para mejorar la calidad de los embriones cultivados in vitro.

Palabras clave: Fertilización *in vitro*. Medios de cultivo. Cocultivo. Cultivo secuencial.

Summary

Since Assisted Reproduction Techniques were initiated, embryos obtained were tried to carry to blastocyst stage, as in this stage is where the embryo is implanted in the uterus. Most extended culture systems are co-culture and sequential culture.

Co-culture consists of an embryo culture on a mono-layer of autologous or heterologous cells, which provide the necessary molecules for embryo development until its blastocyst stage. In sequential culture, embryos are cultured in different media of different nutrients composition according to its embryonary stage.

The aim of this study is to present the evolution that has been carried out with systems and composition of the culture media to improve quality of embryos cultured in vitro.

Key words: *In vitro* fertilization. Culture media. Co-culture. Sequential culture.

Correspondencia: Dra. Neuda Marqués de Oliveira
Calle Fernando Primo de Rivera nº 99
38006 Santa Cruz de Tenerife
neudam@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

Desde que se iniciaron las Técnicas de Reproducción Asistida, se intentó llevar los embriones a blastocisto. El problema que plantea la transferencia en estadio de blastocisto es la posible cancelación de dicha transferencia. Además, si un embrión se bloquea a lo largo de un cultivo, desconocemos si podría haberse implantado se hubiera sido transferido en los primeros estadios de división (1).

El embrión *in vivo* pasa por diferentes estados de desarrollo que tienen diferentes necesidades metabólicas. Por tanto, el cultivo *in vitro* requiere medios con los nutrientes adecuados en cada fase del desarrollo. Algunos trabajos analizan la composición metabólica de los fluidos del oviducto y del útero, de aquí la necesidad de elaboración de medios secuenciales (2).

Tras la fecundación y en las primeras divisiones embrionarias el fluido es rico en lactatos y piruvatos y pobre en glucosa (3). Cuando el embrión alcanza el estadio de 6-8 células aumenta sus necesidades de glucosa y disminuyen las de lactatos y piruvato, momento en que entra en la cavidad uterina.

EVOLUCIÓN E IMPACTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Veamos de forma cronológica el desarrollo que se ha llevado a cabo en los medios de cultivo:

Año 1980: Se utilizaba un medio natural que consistía en una solución salina y una fuente de energía (HTF médium), o bien suplementado con aminoácidos adicionales (a.a.), vitaminas y precursores de ácidos nucleicos (2, 4-8).

Año 1990: Aparecieron algunas modificaciones como la eliminación de glucosa y fosfato, y la inclusión de Taurina, Glutamina y EDTA (ácido etileno diamino tetracético) (9-11).

Finales 1990: Gardner y Lave (12) demostraron la importancia de los a.a. esenciales y no esenciales junto con las vitaminas en la fase de postcompactación para el desarrollo hasta blastocisto.

Quinn (5) y Pool (9) modificaron el HTF original. Quinn eliminó el fosfato y la glucosa inorgánica originando el primer medio libre de glucosa denominado QB11, suplementado con EDTA y Glutamina. Pool modificó el HTF, al que llamó P1, el cual está libre de fosfato, glucosa y suplementado con Taurina (11). Dirnfeld et al. observaron que los embriones se desa-

rollan mejor sin estos metabolitos y se obtiene una mayor tasa de embarazo (13).

Estos resultados pueden inducir a creer que la glucosa y el fosfato inorgánico son perjudiciales para el cultivo embrionario, pero debemos tener en cuenta que estos medios están suplementados con Taurina y EDTA, los cuales son beneficiosos para el cultivo. Es posible que la mejoría en la calidad de los embriones cultivados en estos medios sea por estos suplementos y no por haber eliminado la glucosa y el fosfato inorgánico (10).

COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Glucosa: es necesaria para mantener la velocidad espermática en el medio de cultivo, para la división del embrión y para asegurar los requerimientos de la ruta de la pentosa fosfato.

Magnesio: la concentración debe ser alta para compensar el incremento intracelular de Calcio inducido por el cultivo *in vitro*.

Taurina y EDTA: protegen de la oxidación. Sin embargo, una alta concentración de EDTA puede provocar granulación en el embrión.

Ácido Cítrico: importante en el desarrollo preimplantatorio debido al ciclo del ácido tricarbóxico.

Glutamina: beneficioso para el desarrollo *in vitro* del embrión. La forma estable es la Alanil-glutamina, ya que la glutamina libera amonio, el cual es embriotóxico (14).

ASPECTOS IMPORTANTES A TENER EN CUENTA EN UN MEDIO DE CULTIVO

Para conseguir un medio de cultivo eficaz es necesario recrear las condiciones del medio natural donde se desarrolla el embrión de forma *in vitro*. Esto es posible conociendo los nutrientes y metabolitos que se encuentran en cada estadio por los que pasa el embrión hasta llegar al útero (13). Uno de estos metabolitos es la glucosa en el medio de fertilización y otro es el nivel de fosfato inorgánico necesario. Generalmente se aceptan dos aspectos distintos según el estadio: la baja o nula concentración de Pi en el cultivo durante la precompactación y la moderada o alta concentración de Pi en la fase de postcompactación, que es cuando la actividad glucolítica se incrementa. Por otro lado, los a.a. se desaminan en solución y pueden llegar a ser tóxicos por la formación de amo-

niaco. Por ello los medios de cultivo sólo se deben incubar dos o tres días. Una alternativa a esto podría ser la sustitución del dipéptido estable alanil-glucosamina por glucosa.

Otro aspecto importante de los medios de cultivos es el efecto que tienen sobre el pH. Así, la composición del medio, la concentración de bicarbonato sódico y la concentración de CO₂ en la atmósfera determinan el pH final del medio equilibrado. Estudios sobre el % de CO₂ (5 ó 6%) han revelado que no existen diferencias significativas (5, 15).

Con respecto a la concentración de Ca²⁺/Mg²⁺, se ha discutido el uso de rojo fenol como indicador de pH, el uso de tampones como HEPES o MOPS, la atmósfera de CO₂, así como la utilización de aceite para cubrir los medios, sin llegarse a una conclusión o ventajas con respecto a su uso (16).

Existen igualmente discrepancias en la influencia de factores autocrinos y paracrinos en el desarrollo *in vitro*. Se ha observado el beneficio de la inclusión de factores de crecimientos que estimulan al embrión para llegar a blastocisto.

COCULTIVOS FRENTE A MEDIOS SECUENCIALES

Una de las principales causas de fallos en la implantación en Técnicas de Reproducción Asistida obedece al desfase temporal existente en el momento de realizar su transferencia en un endometrio que todavía no ha alcanzado su madurez funcional. El problema se plantea en el mantenimiento de esos embriones a la espera del momento más oportuno hasta su transferencia (17).

COCULTIVO

El éxito del cultivo *in vitro* de embriones se basa en tener un buen soporte nutritivo que incluya oligoelementos y hormonas. Es por ello el cocultivo una técnica popular de fácil manejo y rápida difusión.

Se ha experimentado con células epiteliales tubáricas (18), células endometriales humanas (19), células del cúmulo y de la granulosa (13, 17) y células Vero, derivadas del epitelio renal en simios. Estos cultivos han arrojado tasas de desarrollo hasta blastocisto que sobrepasan el 60% (19, 20). Este sistema de cocultivo mejora los resultados en pacientes con fallos repetidos en ciclos de FIV.

El cultivo de embriones por este método puede eliminar factores que afecten al desarrollo, como las

hipoxantinas observadas en muchos medios de cultivo que se sabe inducen al bloqueo en dos células (17). El cocultivo puede tener efecto antioxidante y factores específicos para el desarrollo. Por el contrario, cuando se usan células de donantes, el embrión puede contaminarse por patógenos o tóxicos (21). Actualmente se comercializa líneas de células alteradas para el cocultivo ajenas a los epitelios ginecológicos, con el inconveniente de que estas líneas celulares no enriquecen hormonalmente dicho medio.

CULTIVO SECUENCIAL

Los medios secuenciales simplifican lo anterior, aportando los nutrientes, oligoelementos y hormonas de las que carecen los cocultivos y permiten estandarizar su uso. Como desventaja tiene un coste elevado y no existe la interacción embrión-célula.

El cultivo secuencial se lleva a cabo en dos medios distintos dependiendo de las necesidades metabólicas y nutricionales (2). Gardner et al., no sólo defendió el cambio de necesidades nutricionales sino las distintas concentraciones de metabolitos que hay a lo largo del recorrido que realiza el embrión *in vivo* (12).

El medio secuencial se basa en el cambio de piruvato por glucosa para incrementar la demanda de energía para el desarrollo hasta blastocisto (22). El medio G1 (Vitrolife) está basado en el nivel de carbohidratos presente en las trompas y aminoácidos esenciales para la división. Del mismo modo está presente EDTA para secuestrar los cationes divalentes tóxicos y contrarrestar la actividad glicolítica del embrión. El medio G2 (Vitrolife) está basado en el nivel de carbohidratos en el útero, además de aminoácidos esenciales y no esenciales, y no contiene EDTA.

Rutinariamente, la transferencia de embriones se realiza en el día +2. En ese momento los embriones se encontrarían *in vivo* en la trompa. Si se consigue cultivar embriones hasta blastocisto, se puede realizar una selección de éstos más estricta y más eficaz, por lo tanto se alcanza una mayor sincronía entre endometrio y embriones.

COCULTIVO VERSUS CULTIVO SECUENCIAL

El porcentaje de embriones que llegan a blastocisto es significativamente mayor utilizando medios secuenciales (23). Sin embargo, es muy parecido el porcentaje que llega a mórula utilizando uno y otro

cultivo. Aunque también es mayor el porcentaje de implantación con medios secuenciales el número de nacido no es significativo (23). Los resultados indican que los medios sintéticos responden mejor a las necesidades de los embriones a pesar de la ausencia del medio fisiológico celular (23).

Los embriones presentan dos etapas distintas. La primera, ante de la activación genómica (hasta 8 células), cuando la síntesis de proteínas depende del RNA materno. En este periodo se requiere de protección frente a radicales libres, EDTA y una reducida concentración de glucosa y fosfato. La segunda fase, en el momento de la activación genómica, cuando las necesidades del embrión son cuantitativamente y cualitativamente mayores. La posibilidad de llevar los cultivos a blastocisto limitaría el número de embarazos múltiples, se podría efectuar diagnóstico preimplantatorio y transferir en blastocisto permitiendo la selección de embriones.

COMPARACIÓN DE LA UTILIZACIÓN DEL MONOCULTIVO FRENTE AL CULTIVO SECUENCIAL

Para realizar este estudio se diseñaron tres formas de cultivar los embriones hasta blastocisto:

Grupo 1: cultivar los embriones durante 5 días en monocultivo (Róterdam médium).

Grupo 2: cultivo de los embriones durante 3 días en monocultivo y 2 días en monocultivo nuevo.

Grupo 3: cultivo de los embriones en medio secuencial G1/G2 durante 5 días.

En este estudio no encontraron diferencias significativas entre los tres sistemas de cultivo con respecto a blastulación, implantación y embarazo, lo cual se contradice con otros estudios similares (25). Por lo tanto el monocultivo es tan eficaz como el medio secuencial. No obstante, los resultados obtenidos son más bajos que los publicados anteriormente (24, 27). Esto puede ser explicado por la selección de pacientes en este estudio y porque sólo se tuvieron en cuenta el porcentaje de embriones que llegaron a blastocisto con respecto a los fertilizados.

El éxito del cocultivo puede ser debido a la mezcla de sustratos energéticos (piruvato, lactato y glucosa). Se observó mejoría en el grupo en el que se cambiaba a medio nuevo en día 3 (2º grupo de cultivo). Aún así, las alteraciones genéticas afectan a la formación del blastocisto independientemente del medio de cultivo empleado (28, 29).

COMPARACIÓN DE UN MEDIO DE COCULTIVO CON UN MEDIO SECUENCIAL

Es objetivo de la comparación es comprobar si los nuevos medios disponibles en el mercado mejoran la calidad embrionaria con respecto a los utilizados hasta ahora. Esta comparación se llevó a cabo para observar como se desarrollan los embriones en un medio libre de glucosa y fosfato (P1 Medium) con Cook IVF Medium (añade la glucosa en fase de 2PN). En este estudio todas las variables que tienen impacto en los resultados de la FIV eran similares en ambos grupos (P1 Medium y Cook IVF Medium) (30). Se observó que los resultados eran similares con respecto a la fertilidad y la morfología embrionaria. Las diferencias se apreciaban en el porcentaje de embriones que alcanzaban el estadio de 4 células en el día +2, o 6 células en el día +3 (54,3% con P1 Medium vs 41,9% con Cook). Igualmente, se obtuvo un mayor número de embarazos clínicos e implantación con el medio libre de glucosa (P1 Medium) (30).

De Clerck et al., encontraron un retraso en la división de los embriones utilizando Cook IVF Medium comparando con Menezo B2 Medium (31). De forma similar se observó que utilizando G1.2 Medium se obtenía una división más rápida que con Sydney IVF Medium (32). Esta observación puede ser importante porque los embriones que se dividen más rápidamente muestran una mayor tasa de implantación y una mayor capacidad de llegar a blastocisto (33). Las diferencias observadas entre ambos medios puede deberse a la adición de glucosa o también la composición del suero añadido. A P1 medium se le añade 20% SSS (suero sintético sustitutivo) que contiene 5% de HSA y 1% de globulina humana, lo que equivale al 1% HSA del Cook. La presencia de globulina con HSA consigue mayor tasa de desarrollo del embrión y embarazo (34-36).

COMPARACION DE TRES MEDIOS SECUENCIALES

Los resultados obtenidos en un estudio prospectivo y randomizado muestran que los tres medios secuenciales estudiados son capaces de dar lugar a embriones viables, de buena calidad pero sin diferencias significativas en cuanto a implantación y embarazo. Aunque los parámetros obtenidos son similares, con Medi-cult se obtiene los porcentajes más altos, especialmente en ciclos de FIV (37).

	Vitrolife	Medi-cult	Cook
% embarazo	30,7%	40,5%	25,8%
% implantación	14,3%	18,5%	13,5%
	Vitrolife	Medi-cult	Cook
ICSI	37,5%	32%	21,4%
FIV	16,7%	52,9%	29,4%

CONCLUSIÓN

Una de las principales causas de fallos de implantación en Técnicas de Reproducción se debe a desfase temporal existente en el momento de realizar la transferencia de embriones cuando el endometrio todavía no ha alcanzado su madurez funcional. Pese a la cantidad de estudios dedicados a elaborar un medio de cultivo que permita mantener esos embriones hasta el momento indicado, reproducir las condiciones naturales hasta ese día sigue siendo un tema comprometido y difícil de resolver. Cocultivo y medios secuenciales consiguen buenos resultados pero no se puede decantar claramente por alguno de ellos. El cocultivo aporta nutrientes esenciales como oligoelementos y hormonas, pero por otro lado puede provocar la contaminación por patógenos. Los medios secuenciales están estandarizados y son de fácil manejo, aunque suponen un coste más elevado. Las distintas empresas comerciales tienen sus medios específicos los cuales no revisten demasiadas diferencias ni obtienen resultados muy distintos.

Es por tanto fundamental proseguir las investigaciones en este sentido hasta obtener un medio de cultivo que mantenga los embriones más allá de lo conseguido hasta ahora. Todo ello en aras de evitar el desfase que actualmente tenemos a la hora de transferir, aumentando a la tasa de implantación y de embarazo.

BIBLIOGRAFÍA

- Grossman M, Marina F, Martin P, Pons MC, Alcolea R, Torrus C, Marina S.:** ¿Cocultivo hoy=medios secuenciales mañana? *Asebir* año 3, 1998; 1: 22-25.
- 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.
- Biggers JD.:** Pioneering mammalian preimplantation embryo. *New York Plenum Press* 1987: 1-22.
- Quinn P.:** Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and inorganic phosphate. *J. Assist Reprod Genet* 1995; 12: 97-105.
- Patrick Q.:** The development and impact of culture media for assisted reproductive. *Fertil Steril*, 2004; 81: 1-3.
- 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; 4: 493-496.
- Menezo Y, Testart J, Perrone D.:** Ferum is not necessary in human in vitro fertilization, early embryo cultura and transfer. *Fertil Steril.* 1984; 42: 750-753.
- Tomas B, Pool D.:** Development of culture media for human assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2004; 81: 287-290.
- Pool TB; Atiee SH, Martin JE.:** Oocyte and embryo culture. *Basic concepts and recent advances. Infertility and Reproductive Medicine Clinics of North America.* 1998; 9: 181-185.
- Mahendra DS.:** Culturing human embryos with and without glucosa. *Fertil Steril.* 1998; 69: 970-973.
- Pool TB.:** Recent advances in the reproduction of viable human embryos in vitro. *Reprod BioMed Online* 2002; 4: 294-302.
- Gardner DK, Lane M.:** Development of viable mammalian embryos in vitro: evolution of sequential media. *Elsevier science* 2002: 187-213.
- Martha D, Mara K, Sholmit G, Ilan C, Yael G.:** A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertil Steril.* 1997; 67: 120-122.
- Simon C, Patrick Q, Lee K, Cheryl A, John PPT, Geoff L.:** Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril.* 2002; 78: 1254-1260.
- Patrick Q, Simon C.:** Equivalency of culture media for human in vitro fertilization formulated to have the same pH under an atmosphere containing 5% or 6% carbon dioxide. *Fertil Steril.* 2004; 81: 1502-1506.
- Quin P.:** Media used in the assisted reproductive technologies laboratories. *A color atlas for human repro-*

- duction. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins 2003: 241-256.
17. **Romero L, Figueroa MJ, Velarde P, Gonzalez A.:** Las técnicas de cocultivo versus medios secuenciales: La búsqueda de un método sencillo para su uso rutinario. *Asebir* año 3, 1998: 25-26.
 18. **Jia-Sen X, Samuel THC, Pak-Chung H, William SB.:** Coculture of oviductal cells maintains mitochondrial function and decreases caspase activity of cleavage stage mouse embryos. *Fertil Steril.* 2003; 80: 178-183.
 19. **Amparo M, Juan GV, Ernesto E, Jose R, Antonio P, Carlos S.:** Clinical experience and perinatal outcome of blastocyst transfer after coculture of human embryos with human endometrial epithelial cells: a 5 year follow-up study. *Fertil Steril.* 2003; 80: 1162-1168.
 20. **Juan LG, Paulo S, Antonia H, David O.:** Cultivo y transferencia de blastocisto ¿la respuesta? *Rev Colomb Obstet. Ginecol* 1999; 50: 89-94.
 21. **Bongso A, Fong CY, Ratnam S.:** Coculture: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991; 56: 179-191.
 22. **Macklon NS, Pieters MH, Hassan PH, Jeucken MJ, Fauser BC.:** A prospective randomized comparison of sequential versus monoculture systems for in vitro human blastocyst development. *Human Reprod* 2002; 17: 2700-2705.
 23. **Sandrine G, Jacqueline L, Samia H, Dominique B, Bruno S, Jean-Francois G.:** Comparison of two blastocyst culture systems : coculture on vero cells and sequential media. *Fertil Steril.* 2001; 76: 1032-1035.
 24. **Jones GM, Trounson AO, Lolagatis N, Wood C.:** Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998b; 70: 1022-1029.
 25. **Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.:** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in vitro fertilization. *Human Reprod.* 1998; 13: 3434-3440.
 26. **Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB.:** Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: toward a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2000b; 73: 126-129.
 27. **Milki AA, Hinkley MD, Fish JD, Dasig D, Behr B.:** Comparación de blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations *Fertil Steril* 2000; 73: 126-129.
 28. **Kola I, Sathanathan AH, Gras L.:** Chromosomal analysis of preimplantation mammalian embryos. *Handbook of in vitro fertilization.* CRC Press, Boca Raton, Florida 1993: 173-175.
 29. **Van BJ.:** Developmental failure in human reproduction associated with chromosomal abnormalities and cytoplasmic pathologies in meiotically mature oocytes. *The biological basis of early human reproductive failure* 1994: 283-285.
 30. **BenYD, Amit A, Azem F, Chawart T.:** Prospective randomized comparison of two embryo culture systems: P1 medium by Scientific and the Cook IVF medium. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2004; 21: 291-295.
 31. **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.
 32. **Van LA, Dmlylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J.:** Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: A prospective, randomized, comparative study. *Fertil Steril* 2001; 76: 1023-1031.
 33. **McKiernan SH, Bavister BD.:** Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Human Reprod* 1994; 9: 2123-2129.
 34. **Muggleton HAL, Glazier AM, Wall M.:** A prospective analysis of the in vitro development of spare human in vitro fertilization preimplantation embryos using in-house prepared medium and Medi-cult commercial medium. *Human Reprod* 1995; 10: 2976-2984.
 35. **Pool TB, Martin JE.:** High continuing pregnancy rates after in vitro fertilization embryo transfer using medium supplement with a plasma protein fraction containing alpha and beta-globulins. *Fertil Steril* 1994; 61: 714-719.
 36. **Weathersbee PS, Pool TB, Ord T.:** Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12: 354-360.
 37. **Mendoza R, Exposito A, Corostegui B, Ramon O, Etxannojauregi A, Matorral R, Rodriguez E.:** 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.