

Embriología

Comparación de los resultados en FIV/ICSI con tres medios de cultivo secuenciales: Vitrolife, Medi-Cult y Cook

Comparison of IVF/ICSI results with three sequential culture media: Vitrolife, Medi-Cult and Cook

Mendoza R, Expósito A, Corcóstegui B, Ramón O, Etxanojauregi, A, Matorras R, Rodríguez-Escudero F.J.

Unidad de Reproducción Humana. Hospital de Cruces-Baracaldo. Vizcaya. España.

Resumen

Se trata de un estudio comparativo, prospectivo y randomizado realizado en un hospital público de la Comunidad Autónoma Vasca y cuyo objetivo es comparar los resultados obtenidos en FIV/ICSI utilizando los medios secuenciales de tres casas comerciales: Vitrolife, Medi-Cult y Cook. Los tres grupos de pacientes son comparables en cuanto a edad de la mujer, tipo y duración de la esterilidad, técnica aplicada (FIV/ICSI), día en que se realizó la transferencia embrionaria, así como respecto al número de ovocitos obtenidos e inseminados. El número de ovocitos fertilizados, embriones transferidos y porcentaje de pacientes con transferencia fue también similar. Las tasas de embarazo fueron de 30,56% con Vitrolife, 40,48% con Medi-Cult y 25,81% con Cook., y las de implantación fueron de 14,03% con Vitrolife, 18,46% con Medi-Cult y 13,54% con Cook, careciendo las diferencias de significación estadística. Analizando aisladamente el tipo de técnica, con la ICSI las tasas de embarazo fueron semejantes (37,5% con Vitrolife, 32% con Medi-Cult y 21,43% con Cook). Sin embargo en FIV, la tasa de embarazo fue casi triple con Medi-Cult que con Vitrolife (52,94% vs 16,67%, $p < 0,05$) y casi doble que con Cook (52,94% vs 29,41%, $p > 0,05$). Concluimos que aunque con los tres medios secuenciales utilizados se consiguen elevadas tasas de embarazo, en nuestras condiciones de trabajo parece existir una tendencia a mejorar los resultados con los medios de Medi-Cult, especialmente en la FIV.

Palabras clave: FIV. ICSI. Medios de cultivo secuenciales.

Correspondencia: Dr. R. Mendoza
Laboratorio de Fertilización In Vitro
Hospital de Cruces-Baracaldo
Plaza de Cruces s/n
48903 Baracaldo (Vizcaya)
rmendoza@hcru.osakidetza.net

Summary

Prospective, randomized, comparative study held in a Basque Public Hospital. The objective of the study was to compare the results obtained after IVF/ICSI using three different sequential media commercially available: Vitrolife, Medi-Cult and Cook. The three groups of patients were comparable in terms of women age, type and duration of infertility, technique applied (FIV/ICSI), day of transfer and respect of the main number of oocytes obtained and inseminated. The main number of fertilized oocytes, embryos transferred and the percentage of patients with embryo transfer was similar in the three groups. Pregnancy rates per transfer were 30.56% with Vitrolife, 40.48% with Medi-Cult and 25.81% with Cook, and implantation rates were 14.03% with Vitrolife, 18.46% with Medi-Cult, and 13.54% with Cook. These differences were not statistically significant. When analyzing the technique applied separately, pregnancy rates were similar in ICSI (37.5% with Vitrolife, 32% with Medi-Cult and 21.43% with Cook), but in IVF pregnancy rates were almost third when comparing Medi-Cult with Vitrolife (52.94% vs 16.67%), being this difference statistically significant, $p < 0,05$; and almost double when comparing Medi-Cult with Cook (52.94% vs 29.41%), though not significant, $p > 0,05$. We conclude that high pregnancy rates were achieved using the three sequential media in our overall IVF/ICSI program. But, in our culture conditions, some benefits were noticed, in terms of pregnancy rates, when using Medi-Cult media specially when FIV was applied.

Key Words: IVF. ICSI. Sequential culture media.

INTRODUCCIÓN

La investigación sobre fisiología reproductiva (1), los estudios sobre los requerimientos nutricionales de los ovocitos y embriones tanto in vivo (2) como in vitro (3-10) y el desarrollo de diversos sistemas de cultivo (11, 12,) que permiten cultivar los embriones "in vitro" hasta el estadio de blastocisto (13-15) han dado como resultado el desarrollo de nuevos medios de cultivo secuenciales. En el mercado existen diferentes medios disponibles, no conociéndose adecuadamente las ventajas de cada uno de ellos ya que son escasos los estudios comparativos al respecto.

El objetivo de este estudio prospectivo y randomizado es comparar las tasas de embarazo e implantación conseguidas tras FIV/ICSI con los medios secuenciales de nueva generación disponibles en el mercado y comercializados en España: Serie G-III Vitrolife (Goteborg, Suecia), Medi Cult (Dinamarca) y Cook (Sydney, Australia).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se incluyeron en el estudio las pacientes sometidas a FIV/ICSI en nuestra Unidad de Reproducción entre Febrero y Abril de 2003. Las pacientes fueron sometidas a supresión hipofisaria con análogos de la GnRH en protocolo largo (Decapeptyl® (Laboratorios Ipsen Pharma, Barcelona) y estimuladas con FSH recombinante (Gonal F®, Laboratorios Serono, Madrid) y HMG ultrapurificada (Menopur, Laboratorios

Ferring, España). Se administraron 250 microgramos de HCG recombinante (Ovitrelle, Laboratorios Serono, Madrid) cuando se observaron al menos 3 folículos de 18 mm. La punción folicular se llevó a cabo a las 36 horas, bajo sedación y por vía transvaginal ecográfica. La fase lútea se suplementó con Progesterona micronizada (Utrogestan®, Seid, Barcelona).

El lavado folicular y ovocitario, así como el resto de los procedimientos de laboratorio se llevaron a cabo siguiendo estrictamente las normas de utilización de los medios recomendadas por cada casa comercial. Se incluyeron en el estudio 118 pacientes, que fueron distribuidas en tres grupos de estudio, según una tabla de números aleatorios: 37 pacientes en el grupo Vitrolife, 47 pacientes en el grupo Medi-Cult y 34 pacientes en el grupo Cook. Los embriones se cultivaron en grupos de tres, en microgota cubiertos de aceite de parafina desde el estadio de pronúcleos hasta la transferencia. La transferencia se llevó a cabo en día +2, +3 o +4 dependiendo del día de la semana en que se realizó la punción folicular, ya que en nuestro centro no se realizan transferencias los fines de semana. Nuestro protocolo de número de embriones a transferir es de 3 embriones en los casos de buen pronóstico (edad <35 años y buena calidad embrionaria) y 4 embriones en el resto de los casos. Todas las transferencias fueron realizadas utilizando set de Frydman (Prodimed, Neuilli-en-Thelle, Francia) y bajo control ecográfico como se ha descrito previamente (16). A los 14-16 días de la transferencia embrionaria se realizó análisis de β -hCG en sangre para

determinación de embarazo y se confirmó el mismo por ecografía a las dos semanas.

Los resultados se expresan como media \pm desviación estandar. Para el análisis estadístico se utilizaron la χ^2 para las variables cuantitativas y la t- Student para las variables cualitativas. Se consideró diferencia estadísticamente significativa $p < 0,05$.

En la inspiración, diseño, ejecución y el análisis del presente trabajo no ha participado directa ni indirectamente ninguna de las casas comerciales objeto del estudio.

RESULTADOS

Al comparar las características epidemiológicas de las pacientes, no encontramos diferencias significativas en ninguna de las variables estudiadas: edad, tipo y duración de la esterilidad, número de intento, día de la transferencia, técnica utilizada (FIV/ICSI) y número de ovocitos obtenidos e inseminados (Tabla 1).

Al analizar los resultados obtenidos con los tres medios secuenciales no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas: media de ovocitos fertilizados y transferidos (Tabla 2). Tampoco hubo diferencias en el porcentaje de pacientes que tuvieron transferencia. La calidad de los embriones transferidos es también similar con los tres medios; así, la media de embriones Tipo I transferidos

Tabla 2
Resultados

| | Vitrolife | Medi-Cult | Cook | p |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|
| Nº ovocitos fertilizados | 5,56 \pm 4,17 | 4,95 \pm 3,83 | 5,12 \pm 3,76 | ns |
| Nº embriones transferidos | 2,81 \pm 1,10 | 3,02 \pm 1,10 | 3,20 \pm 1,03 | ns |
| % pacientes con transferencia | 100 | 93,02 | 88,23 | ns |
| Nº ET. Tipo I | 1,36 \pm 1,36 | 1,41 \pm 0,71 | 1,62 \pm 0,74 | ns |
| Nº ET Tipo II | 1,83 \pm 0,75 | 1,33 \pm 0,65 | 1,20 \pm 0,44 | ns |

fue de 1,36 \pm 1,36 con Vitrolife vs 1,41 \pm 0,71 con Medi-Cult vs 1,62 \pm 0,74 con Cook y la media de embriones Tipo II transferidos fue de 1,83 \pm 0,75 con Vitrolife vs 1,33 \pm 0,65 con Medi-Cult vs 1,20 \pm 0,44 con Cook (Tabla 2). La tasa de embarazo fue superior con Medi-Cult (40,48%) que con Vitrolife (30,56%) y que con Cook (25,81%), sí bien las diferencias no son estadísticamente significativas (Figura 1). Del mismo modo, la tasa de implantación fue superior con Medi-Cult (18,46%) que con Vitrolife (14,03%) y Cook (13,54%), pero sin alcanzar la significación estadística (Figura 1).

Al analizar separadamente los resultados en FIV e ICSI se observa un comportamiento desigual. En ICSI la tasa de embarazo fue muy semejante con Vitro-

Tabla 1
Datos epidemiológicos

| | Vitrolife | Medi-Cult | Cook | |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|----|
| Número de ciclos | 37 | 47 | 34 | ns |
| Media de Edad | 33,56 \pm 3,28 | 33,57 \pm 3,46 | 34,14 \pm 3,70 | ns |
| Técnica | | | | |
| - FIVTE | 35,14% | 42,55% | 52,94% | ns |
| - ICSI | 64,86% | 57,45% | 47,06% | ns |
| Tipo de Esterilidad | | | | |
| Primaria | 89,19% | 91,11% | 87,88% | ns |
| Duración de la | | | | |
| Esterilidad (x en años) | 4,69 \pm 2,17 | 5,11 \pm 2,56 | 5,16 \pm 2,20 | ns |
| Número de intento | 2,02(1,01) | 1,85(0,89) | 1,85(0,88) | ns |
| Día de la transferencia | | | | |
| - Día +2 | 24 | 24 | 22 | ns |
| - Día +3 | 5 | 9 | 8 | ns |
| - Día +4 | 7 | 9 | 1 | ns |
| Número ovocitos obtenidos | 13,18 \pm 7,04 | 11,44 \pm 6,24 | 10,55 \pm 6,59 | ns |
| Número ovocitos inseminados | 10,48 \pm 5,83 | 9,44 \pm 5,24 | 8,41 \pm 5,31 | ns |

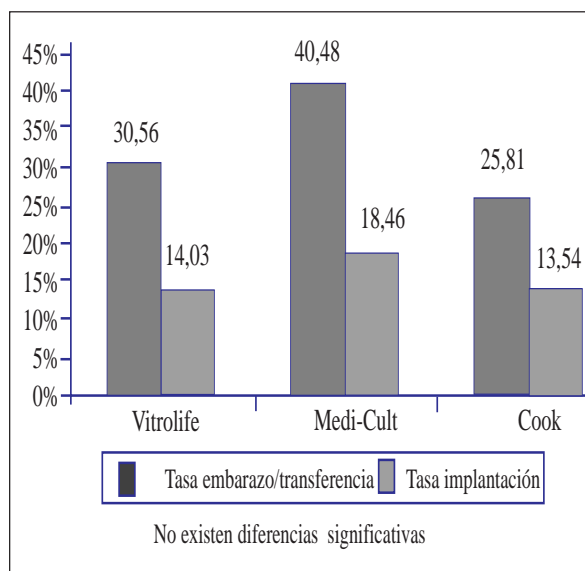


Figura 1

Tasas de embarazo e implantación y medios de cultivo

life (37,5%) y con Medi-Cult (32%) y algo mas bajas con Cook (21,43%). En cambio, en FIVTE la tasa de embarazo con Medi-Cult (52,94%) fue casi triple que con Vitrolife (16,67%) siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) y casi doble que con Cook (29,41%) careciendo en este caso de significación estadística ($p = 0,15$).

DISCUSIÓN

Gadner et al. con técnicas de microfluorescencia cuantitativa analizaron la composición metabólica de los fluidos del oviducto y el útero a lo largo del ciclo menstrual (1). Las concentraciones de metabolitos a los que son expuestos in vivo los ovocitos y los embriones en sus primeros estadios varían a lo largo del tracto reproductor femenino (2). Durante los primeros estadios de división el embrión se encuentra en un ambiente rico en piruvato y lactato y bajas concentraciones de glucosa. Cuando el embrión entra en la cavidad uterina, 6-8 células, las concentraciones de piruvato y lactato disminuyen y aumentan las de glucosa. En los años ochenta diversos trabajos confirman (3-6) que el piruvato es la principal fuente de energía para los embriones en sus primeras divisiones, y la glucosa lo es a partir de la activación del genoma hasta el estadio de blastocisto.

Otras sustancias, como aminoácidos, sales minerales, factores de crecimiento, vitaminas, enzimas, etc no solo son necesarios también para el metabolismo embrionario (7-10) sino que ayudan a mantener el pH intracelular, la osmolaridad del medio, disminuyen el estrés oxidativo, etc.

Los nuevos medios de cultivo secuenciales tienen en cuenta todos estos factores y con ellos se consigue prolongar el cultivo de los embriones in vitro hasta el estadio de blastocisto (11-14).

Los resultados obtenidos en este estudio prospectivo y randomizado muestran que los tres medios secuenciales estudiados son capaces de dar lugar a embriones viables, de buena calidad (Tipo I), y que una vez transferidos (2,81 con Vitrolife vs 3,02 con Medi-Cult vs 3,20 con Cook) dan lugar a tasas de embarazo (30,56% con Vitrolife vs 40,48% con Medi-Cult vs 25,81% con Cook) e implantación (14,03% con Vitrolife vs 18,46% con Medi-Cult vs 13,54% con Cook) no diferentes estadísticamente. Observamos una tendencia a aumentar ambas tasas cuando utilizamos los medios de Medi-cult.

Estos resultados concuerdan con los conseguidos por Van Langendonck et al (17) que comparando los

medios G 1.2/G2.2 de Vitrolife y los de Cook consiguieron tasas de embarazo (en día +2: 39% y 40%, en día +3: 40% y 57%) y tasas de implantación (13% y 16% en día +2 y de 23% y 29% en día +3) respectivamente, siendo todas ellas no diferentes estadísticamente. Por el contrario Jansen et al (18) consiguieron tasas de embarazo por transferencia significativamente superiores ($p = 0,00001$) con medios de Cook (43,2%) que los conseguidos con los medios G1.2/G2.2 de Vitrolife (30,2%).

Podemos concluir que con la utilización de los medios secuenciales comercializados se obtienen buenos resultados en cuanto a tasas de embarazo e implantación tras realizar FIV o ICSI. No puede descartarse que un aumento de la población objeto de estudio pudiera haber detectado diferencias no demostradas en nuestro trabajo.

Una vez concluido nuestro estudio, a pesar de ser conscientes de que las diferencias carecen de significación estadística, nos hemos decantado por el empleo de los medios de Medi-Cult, por su tendencia a mejorar los resultados, especialmente patentes en la FIV. Además su coste es semejante a los otros medios y su manejo más sencillo.

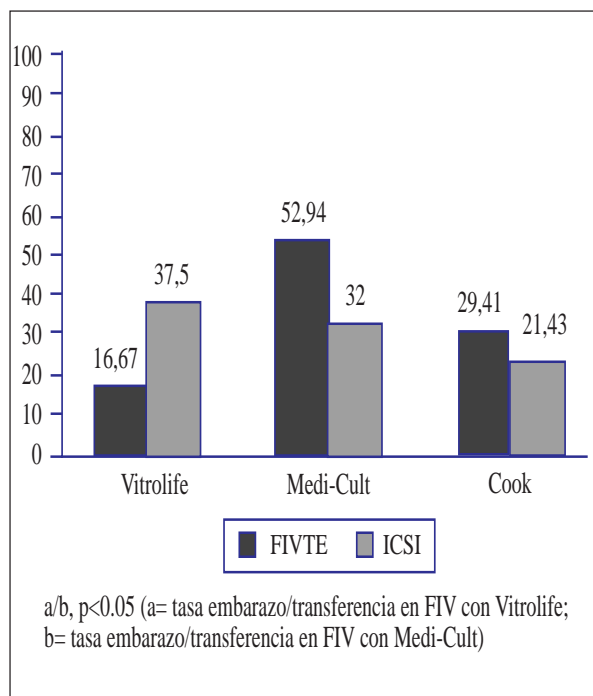


Figura 2

Tasas embarazo en FIV o ICSI y medio de cultivo utilizado

BIBLIOGRAFÍA

1. **Gardner DK, Leese HJ.:** Assessment of embryo metabolism and viability. In: Trounson A, Gardner DK, editors. Handbook of in vitro fertilization. Boca Raton (FL): CRC Press, 1993;195-211.
2. **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.
3. **Leese HJ, Barton AM:** Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. J Reprod. Fertil. 1984; 72:9-13.
4. **Gardner DK, Leese HJ.:** Assessment of embryo viability prior to transfer by the non invasive measurement of glucose uptake. J Exp Zool 1987; 242:103-105.
5. **Hardy K, Hooper MAK, Handyside AH, Rutherford AJ, Wiston RM, Leese HJ.:** Non invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. Hum Reprod. 1989; 4:188-191.
6. **Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ.:** Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. J Reprod Fertil 1993; 99:87-95.
7. **Gardner DK, Lane M.:** Amino acids and ammonium regulate the development of embryos in culture. Biol Reprod 1993; 48:377.
8. **Van Winkle LJ.:** Amino acid transport in developing animal oocytes and early conceptuses. Biochem Biophys Acta 1988; 947,173.
9. **Wales RG.:** Effects of ions on the development of the preimplantation mouse embryos in vitro. Aust J Biol Sci 1970; 23:421.
10. **Schulz GA, Heyner S.:** Growth factors in preimplantation mammalian embryos, OX Rev Reprod Biol 1993; 15:43-82.
11. **Gardner DK, Lane M.:** Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner DK, editors. Handbook of in vitro fertilization Boca Raton (FL): CRC Press, 1993; 85-114.
12. **Menezo Y, Dumont M, Hazout A, Nicolle B, Pouly JL, Janny L.:** Culture and co-culture techniques. Fertil Steril 1995; 95:413-418.
13. **Huisman GJ, Fauser BC, Eijemans MJ, Pieters MH.:** Implantation rates after in vitro fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. Fertil Steril. 2000; 73:558-564.
14. **Gardner DK, Lane M, Kouridakis K, Schollcraft WB.:** Complex physiologically based serum-free culture media increase mammalian embryo development. In: In vitro Fertilization and Assisted Reproduction. Proc Xth Cong IVF Eds V Gomel and PCK Leung Monduzzi Editore, Bologna 187-191.
15. **Lane M, Gardner DK.:** Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of preimplantation mouse embryos in vitro. Hum Reprod 1992; 7:558-561.
16. **Matorras R, Prieto E, Mendoza R, Expósito A, Corcóstegui B, Rodríguez-Escudero FJ.:** Ultrasound-guided embryo transfer improves pregnancy rates and increases the frequency of easy transfers. Human Reprod 2002 Jul; 17:1762-6.
17. **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.
18. **Janssens R, Joris H, Verheyen G, Van Steirteghem A.:** Significant differences in blastocyst formation rates and pregnancy rates between two commercial sets of sequential media. Human Reprod 2000;15(Abtract Book 1):34.