

Trabajo Original

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

Cultivo en medio único versus secuencial: efectos en los resultados clínicos y su relación con la presencia de granulaciones citoplasmáticas

María Valeria Paz, Juliana Cicaré, Fernando Lo Menzo, Luciana Domenech, Patricia Perfumo, Viviana Ventura

Servicio de Medicina Reproductiva, Sanatorio Los Arroyos, Grupo Gamma. Rosario. Argentina

Reproducción 2017;32:6-16

Resumen

Objetivo. Determinar si el cultivo embrionario en medio único resulta equivalente al secuencial en cuanto a calidad embrionaria, tasa de embarazo, aborto y embarazo evolutivo. Analizar la presencia de granulaciones citoplasmáticas (pitting), su relación con el medio utilizado y su impacto en los resultados de ICSI. **Diseño.** Estudio prospectivo observacional. **Materiales y métodos.** Se incluyeron 194 ciclos de pacientes menores de 40 años con transferencia embrionaria en fresco. Los medios secuenciales utilizados fueron G1 y G2 (Vitrolife) y medio único CSC (Irvine), sin renovación en día 3. Se registró la presencia de pitting citoplasmático en el día 3 de cultivo. **Resultados.** El análisis multivariado para embarazo

clínico sugiere una tendencia favorable hacia los medios secuenciales ($p = 0,047$). Se encontró una relación significativa entre la presencia del pitting y el cultivo en medio único (CSC 34,39% vs G1/G2 2,23%; $p < 0,001$). Esta característica morfológica resultó beneficiosa en cuanto a la tasa de blastulación, embarazo clínico e implantación, no siendo significativa para aborto o embarazo evolutivo. **Conclusión.** El cultivo de embriones en medios secuenciales G1/G2 favorecería la probabilidad de lograr un embarazo clínico al compararlo con medio único CSC sin renovación en día 3, según las variables explicativas estudiadas. Los resultados obtenidos de este estudio observacional muestran un efecto beneficioso de la presencia de pitting en día 3 en la tasa de blastulación y embarazo, que se debería seguir estudiando para ser confirmado.

Correspondencia: María Valeria Paz
Italia 1440 - 2000. Rosario, Argentina.
Tel: 0341-4209185
Correo electrónico: vpaz@grupogamma.com

Palabras claves. Granulaciones citoplasmáticas, pitting, cultivo embrionario, medios secuenciales, medios únicos.

Culture in single versus sequential medium: effects on clinical outcomes and their relation to the presence of Cytoplasmic granulations

Summary

Objective. To determine if single medium embryo culture is equivalent to a sequential one regarding embryo quality, pregnancy rate, abortion and ongoing pregnancy. Analyze the presence of cytoplasmic pitting, its relationship to the medium used and its impact on ICSI results. **Design.** Observational prospective study. **Materials and methods.** 194 cycles of patients younger than 40 years-old with fresh embryo transfer were included. The sequential media used were G1 and G2 (Vitrolife), and single medium CSC (Irvine) without renewal on day 3. The presence of cytoplasmic pitting was identified on day 3 of culture. **Results.** Multivariate analysis for clinical pregnancy suggests a favorable trend toward sequential media ($p = 0.047$). A significant association between the presence of pitting and single medium culture was found (CSC 34.39% vs G1/G2 2.23%; $p < 0.001$). This morphological feature was beneficial in terms of blastulation, clinical pregnancy and implantation rates; however, it is not significant for abortion or ongoing pregnancy. **Conclusion.** According to the explanatory variables, it is suggested that the embryo culture in G1/G2 sequential media increases the probability of achieving a clinical pregnancy when compared to single medium CSC without renewal on day 3. The results of this observational study show a beneficial effect of the presence of pitting on day 3 on the blastulation and pregnancy rates, which should be further examined in order to be confirmed.

Key words. Cytoplasmic granulations, pitting, embryonic culture, sequential media, unique media.

Introducción

Los grandes avances en los métodos de cultivo embrionario humano nos permiten hoy elegir entre una variedad de opciones para cultivar hasta el estadio de blastocisto de forma cómoda y segura. Existen en la actualidad dos principios para cultivar

un embrión hasta día 5 o 6. Uno es el llamado “de vuelta a la naturaleza” o en inglés “*back to nature*”, basado en la diferente composición del oviducto y del útero en el tracto reproductivo femenino. Este principio ha contribuido al diseño de protocolos que usen medios secuenciales (“protocolo en dos pasos”), en los cuales se cultiva en un primer medio desde el estadio de cigoto hasta clivaje temprano (día 3), luego es necesario cambiar de medio para poder alcanzar el desarrollo a blastocisto. El segundo enfoque es “dejar que el embrión elija” o en inglés “*let the embryo choose*”, que ha llevado a la producción de medios con concentraciones adecuadas de distintos constituyentes y que puede soportar el cultivo hasta blastocisto sin la necesidad de cambiar el medio en día 3. Es el llamado protocolo en “un solo paso” o “*one-step protocol*”, en el que se utiliza un medio único.

El principio “*back to nature*” parece atractivo para justificar el protocolo en dos pasos, ya que considera los requerimientos dinámicos de un embrión preimplantatorio en las distintas etapas de su crecimiento. Estos medios simulan las condiciones *in vivo* en las cuales el cigoto se desplaza desde el oviducto hasta el útero durante su desarrollo, pasando por entornos de distinta composición. Así, en los primeros estadios de desarrollo, se requiere la presencia de ácido etilendiamintetraacético (EDTA) para superar el bloqueo en dos células,¹ pero resultaría perjudicial para el embrión post-compactación.^{2,3} De igual manera, se sostuvo que una alta concentración de glucosa posee efectos inhibitorios en un embrión temprano,^{4,5} pero es la principal fuente de energía en estadios más avanzados.⁶ Por otro lado, al reemplazar el medio se remueven sustancias nocivas como el amonio, producto de la ruptura de Glutamina (Gln) en solución acuosa,⁷ y se renuevan aminoácidos y nutrientes esenciales para el crecimiento embrionario. Sin embargo, se podrían asociar algunas desventajas al utilizarlo. Con este protocolo, se deben cambiar los embriones de un medio a otro y con ello causar un *stress* osmótico adicional u otro tipo de *shock* (cambios de temperatura y pH), como también remover factores paracrinos o autocrinos producidos durante el primer período de cultivo.

Investigaciones realizadas sobre los distintos requerimientos del cultivo embrionario cuestionaron varias de las afirmaciones antes descritas. Dis-

tintas publicaciones han demostrado que la glucosa por sí misma no es la que produce el bloqueo, sino su combinación con otros componentes del medio y la concentración utilizada. Así, si se utiliza en concentraciones encontradas en el oviducto humano (1-2 mmol/l) se evita el efecto inhibitorio de la misma.^{2, 8-10} Con respecto al EDTA, si se utiliza en una baja concentración, no resulta dañino para el desarrollo hasta blastocisto.^{1, 11} Además, es posible reemplazar la Gln por un dipéptido como la L-alanil-L-glutamina (AlaGln), que es más estable y evita la formación de amoníaco,¹² volviendo innecesaria la utilización de un segundo medio. De esta manera comenzaron a desarrollarse los medios únicos con el objetivo de cultivar el embrión hasta blastocisto de manera ininterrumpida, ya que estos medios contienen todos los componentes necesarios para el desarrollo y evitar así tener que manipular los embriones para cambiarlos de medio y sacarlos del incubador. Desde el punto de vista práctico, el protocolo en un paso es menos laborioso y de menor costo que el cultivo en dos pasos.¹⁰ Existen reportes que sostienen que si se utiliza este medio único se protege más al desarrollo embrionario y no se encuentran diferencias en la calidad embrionaria ni en las tasas de blastulación al comparar con el cultivo en medios secuenciales, aunque algunos renuevan el medio en día 3 al utilizar el medio único.¹³⁻¹⁶

Adicionalmente, en el intento de comparar estos dos métodos de cultivo, Biggers y Racowsky observaron la presencia de "pitting" citoplasmático en los embriones cultivados exclusivamente en medio único. Este fenómeno morfológico llamado "pitting" o citoplasma granuloso¹⁷ se caracteriza por la presencia de pequeños y abundantes pozos de aproximadamente 1,5 μm de diámetro en el citoplasma de las blastómeras.¹⁵ Todavía no se ha establecido de manera definitiva cómo es la apariencia normal del citoplasma embrionario, pero en general se lo considera normal cuando es pálido y claro o presenta finas granulaciones.⁸⁾ Algunos autores sugirieron que el *pitting* es una característica intrínseca embrionaria que está asociada a una mejor tasa de blastulación aunque no se encuentran aumentos en las tasas de embarazo. Podría representar un marcador temprano de actividad citoplasmática de las blastómeras y el comienzo de la compactación.^{17, 19} Por el contrario, Biggers JD y

Racowsky C encontraron que podría estar relacionado con la composición del medio utilizado para el cultivo *in vitro*. En el 2005, Thomas Ebner fue el primero en reportar un aumento en la tasa de abortos en aquellos pacientes en los cuales se había observado pitting citoplasmático en los embriones transferidos.²⁰⁾ La implementación de un buen sistema de clasificación embrionaria tiene beneficios potenciales como ser: una elección apropiada del embrión a transferir, reducir el porcentaje de embarazos múltiples ajustando el número de embriones a transferir de acuerdo a la calidad embrionaria y evaluar diferentes métodos de cultivo. En general las características morfológicas a ser evaluadas durante la división embrionaria son el número de células, simetría, forma, multinucleación, apariencia citoplasmática y grado de fragmentación.

Numerosos trabajos se han publicado con el fin de dilucidar cuál de las dos teorías es la mejor opción para el cultivo embrionario hasta blastocisto, pero en pocos se muestran resultados de embarazos evolutivos. Nuestro objetivo primario fue realizar un estudio comparativo entre el cultivo en medio único sin renovación en día 3 y medios secuenciales, analizando calidad embrionaria, tasas de embarazos, abortos y embarazos evolutivos. Con respecto a la clasificación embrionaria, el parámetro de *pitting* generalmente no está incluido al momento de elegir el mejor embrión. El día 3 marca un punto de transición muy importante en el embrión humano y debe prestarse una atención adicional al momento de la evaluación embrionaria, ya sea si se va a transferir en día 3 o si se cultiva hasta blastocisto. El objetivo secundario de nuestro trabajo, fue analizar si la presencia de *pitting* citoplasmático se relaciona con el medio de cultivo y su impacto en los resultados de ICSI.

Materiales y métodos

En este estudio prospectivo observacional se realizaron procedimientos de laboratorio usando sólo técnicas de reproducción asistida estándares. Los medios de cultivo utilizados para el estudio son medios disponibles comercialmente y ampliamente usados en reproducción humana. El trabajo fue evaluado por parte del Comité de Ética en Investigación del Grupo Gamma.

Pacientes

Se incluyeron 185 pacientes menores de 40 años que realizaron un procedimiento de FIV/ICSI con una transferencia en fresco entre julio del 2014 y mayo del 2015 en el Servicio de Medicina Reproductiva del Sanatorio Los Arroyos, Grupo Gamma. Se incluyeron también las pacientes con baja respuesta ovárica (con menos de 5 ovocitos MII), las biopsias testiculares y la utilización de semen donado en los casos correspondientes. Nueve pacientes realizaron dos ciclos de reproducción, por lo tanto, se analizaron en total 194 ciclos.

La estimulación ovárica controlada se realizó siguiendo protocolos ya publicados, según la respuesta y cuadro clínico de la paciente.²¹ El seguimiento de la respuesta folicular fue realizado por ecografía transvaginal y mediciones de estradiol plasmático. Cuando al menos dos folículos alcanzaron el tamaño de 18 mm, la maduración ovocitaria final fue inducida con hCG. La aspiración folicular fue realizada 35 horas postinyección de hCG.

Medios de cultivo y diseño

Se utilizaron dos protocolos de trabajo para el cultivo embrionario. En el protocolo de un solo paso (Grupo A), los embriones fueron cultivados en *Continuous Single Culture* (CSC) con 10 mg/ml de Albúmina Sérica Humana (HSA), *Irvine Scientific*, Santa Ana, CA, EE.UU. En el protocolo en dos pasos (Grupo B), fueron cultivados en los medios secuenciales GIVF Plus-G1 Plus-G2 Plus, Serie G5 *Vitrolife*, Suecia. El G1 y G2 Plus están suplementados con 5 mg/ml de HSA. En ambos grupos se cultivó bajo aceite mineral (*Ovoil*, *Vitrolife*, Suecia). La composición de los medios se encuentra publicada en el trabajo de Morbeck.²²

Procedimientos. Cultivo embrionario

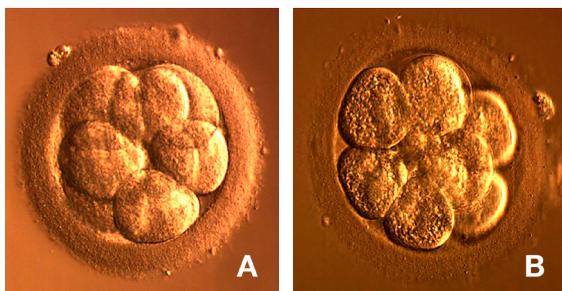
La preparación de los ovocitos y del semen así como también los procedimientos de ICSI han sido extensamente descritos.^{14, 23} Con respecto al método de cultivo, en el grupo A la recuperación ovocitaria se realizó en *Modified HTF* (*Irvine Scientific*, Santa Ana, CA, EE.UU.). Una vez finalizada, los ovocitos se incubaron en CSC hasta el momento de la denudación e inyección, lue-

go de la cual se cambiaron a una nueva placa con CSC hasta el día de la transferencia, sin renovar el medio en el día 3. Por otro lado, en el grupo B, la recuperación ovocitaria se realizó en GMOPS Plus (*Vitrolife*, Suecia), los ovocitos guardados en GIVF Plus y luego de la denudación e inyección se colocaron en G1 Plus hasta el día 3. Para cultivo hasta blastocisto, se cambiaron al medio G2 Plus hasta la transferencia. En ambos casos se cultivaron individualmente en gotas de 25 μ l en placas *Nunc Art*, Dinamarca, bajo aceite mineral. Se utilizaron incubadores trigas K-MINC-1000 COOK Medical, con mezcla de gases en proporción 6% CO₂, 5% O₂ y 89% N₂. El laboratorio cuenta con un sistema de filtración de aire utilizando filtros de alta eficiencia de partículas (HEPA) y filtración química de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) mediante filtros de carbón activado; presión positiva y 24 renovaciones de aire por hora.⁽²⁴⁾

Clasificación embrionaria

En el día 1 se verificó la fertilización de los ovocitos (entre 16 a 18 hs postinyección). Sólo las fertilizaciones normales (2PN y 2CP) siguieron en cultivo hasta su transferencia. En el día 2 (41-44 hs postinyección) se observaron solamente los embriones de los pacientes que van a ser transferidos en día 3, clasificando según el número y simetría de células, fragmentos y multinucleación. En el día 3 (69-70 hs postinyección) fueron clasificados graduando de 1 a 4, siendo 1 el embrión de excelente calidad, 2 muy bueno, 3 regular y 4 malo,⁽²⁵⁾ teniendo en cuenta los mismos parámetros que en día 2. Además, en este día se registró la presencia o ausencia de granulaciones citoplasmáticas o *pitting*. Sin embargo, este parámetro no se consideró para la selección embrionaria al momento de transferir. Los embriones fueron clasificados como “claros u homogéneos” cuando los citoplasmas de las blastómeras eran pálidos, claros o finamente granulares, y como “granular o *pitting*” cuando la mayoría de las blastómeras presentaba granulaciones citoplasmáticas uniformes y pequeños pozos (Figura 1). El porcentaje de buena calidad embrionaria se calculó sumando los embriones grado 1 y 2, y dividiéndolos sobre los embriones fertilizados normalmente. También en

Figura 1. Embrión de día 3 con citoplasma claro u homogéneo (A) y embrión de día 3 mostrando citoplasma granuloso o *pitting* (B).



este día se estimó el porcentaje de embriones que presentaron *pitting* con respecto a los embriones divididos en cada grupo.

En el día 5, el estadio de blastocisto se clasificó según Gardner y Schoolcraft^{25, 26} teniendo en cuenta la morfología de masa celular interna (MCI), el trofoectodermo (TE) y grado de expansión del blastocelo. El porcentaje de blastulación se obtuvo sobre los embriones que permanecieron en cultivo prolongado. También se calculó el porcentaje de blastulación de los embriones que presentaron *pitting* en día 3.

Transferencia embrionaria

Las transferencias fueron realizadas en día 2, 3 o día 5, luego de la selección del mejor embrión según las características morfológicas, bajo guía ecográfica. Dependiendo del número de los ovocitos fertilizados, se decidió el día de la transferencia embrionaria, siendo el valor de corte 5 ovocitos fertilizados o más para transferir en día 5. Se realizaron 141 transferencias en D2/D3 (72,7%) y 53 en D5 (27,3%). El elevado porcentaje de transferencias en división temprana fue debido a que el 52,7% de las pacientes tuvieron menos de 5 MII. Sólo 7 pacientes con más de 5 ovocitos fertilizados se transfirieron en día 3. En general se transfieren dos embriones en nuestro servicio, sin embargo, hubo 46 transferencias simples no electivas y 5 con 3 embriones ya que tenían varios procedimientos fallidos en otros centros.

Los embriones excedentes que alcanzaron el desarrollo hasta blastocisto fueron criopreservados por la técnica de vitrificación.

Se analizaron tasas de embarazo clínico, im-

plantación (número de sacos observados sobre el número de embriones transferidos), abortos (número de sacos detenidos sobre el número de sacos implantados) y embarazos evolutivos a la semana 20 de gestación entre ambos medios de cultivo.

Para analizar el impacto de la presencia de *pitting* citoplasmático, se estudiaron sólo las transferencias de dos embriones. Se subdividieron en dos grupos: Grupo I, los dos embriones transferidos con presencia de *pitting*; Grupo II, ningún embrión presentando *pitting*. Luego se compararon las mismas tasas anteriormente mencionadas. Se excluyeron las transferencias en las que tuvieron mezclas de estos dos embriones.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se resumieron a través de media y desvío estándar, y las variables cualitativas a través de frecuencias absolutas y porcentajes. Las comparaciones de grupos respecto a frecuencia de ocurrencia de eventos se llevaron a cabo mediante pruebas Chi-cuadrado de Pearson o exactas de Fisher según la cantidad de datos disponibles. Las comparaciones referidas a valores medios se realizaron mediante pruebas *t*. En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 5%.

Se ajustaron modelos de regresión logística para respuesta binomial para embarazo clínico y embarazo evolutivo, y modelos de *odds* proporcionales para las tasas de implantación y aborto, en función de las siguientes variables explicativas: medio de cultivo, baja respuesta ovárica, presencia de *pitting* en embriones transferidos, presencia de factor masculino, día de transferencia (3 o 5) y número de embriones transferidos (1 o 2), este último no fue considerado para el ajuste de tasa de implantación. El ajuste de modelos se llevó a cabo sobre el subgrupo de transferencias simples y dobles, excluyendo además los casos de transferencias dobles en las que sólo uno de los ET presentaba *pitting*.

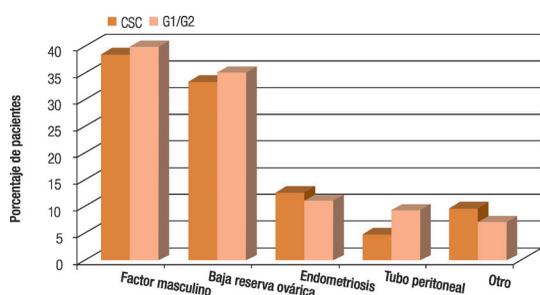
Resultados

Comparación entre los medios de cultivos respecto a las variables de interés

En el período estudiado se pudieron analizar en el Grupo A, 75 ciclos (285 embriones) y en el Grupo B, 119 (405 embriones).

En los pacientes estudiados la distribución de los diagnósticos clínicos fue homogénea entre ambos grupos. Se consideraron tanto los diagnósticos primarios como los secundarios, totalizando 269 diagnósticos. No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los diagnósticos de los pacientes según el medio de cultivo (p – valor = 0,646), encontrándose como diagnósticos predominantes en ambos grupos al factor masculino y la baja reserva ovárica (Figura 2).

Figura 2. Distribución de frecuencias de los diagnósticos según medio de cultivo.



En total, se recuperaron 1,005 ovocitos MII con una media de 5,53 (\pm 3,8) MII por paciente en el Grupo A y 5,24 (\pm 3,82) en el grupo B. No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos al comparar la edad media, ovocitos en MII, tasa de fertilización, porcentaje de transferencias simples no electivas y bajas respondedoras, indicando, junto con los diagnósticos clínicos, la homogeneidad de los grupos en estudio (Tabla 1).

Si bien el porcentaje de diagnóstico de baja reserva ovárica total fue 34,6%, el 52,57% de las pacientes tuvieron menos de 5 ovocitos MII.

Se pudieron analizar 690 embriones, 285 en el grupo A y 405 en el grupo B, como se muestra en la (Tabla 2). Con respecto a la calidad embrionaria en el día 3, no hubo diferencias significativas al comparar los dos métodos de cultivo, aunque se observó un ligero aumento en los embriones de buena calidad al utilizar los medios secuenciales. En cultivo hasta blastocisto se dejaron 364 embriones, 167 en el Grupo A y 197 en el grupo B, no encontrando diferencias significativas en el porcentaje de blastulación. El hallazgo notorio fue al analizar el porcentaje de embriones con *pitting* en día 3, encontrando que éstos se observan casi exclusivamente al cultivar en medio único (34,39% vs 2,23%).

El promedio de embriones transferidos fue de 1,80 (\pm 0,43) y 1,78 (\pm 0,49) en los Grupo A y B respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo en las tasas de embarazo, implantación, abortos y embarazos evolutivos (Tabla 3).

Debido a que en este estudio hubo un alto porcentaje de pacientes bajas respondedoras y sólo hubo 53 transferencias en D5, se analizaron también las tasas de embarazo según el día de la transferencia, no existiendo diferencias significativas al transferir en día 3 o día 5, ya sea entre los dos grupos como dentro de un mismo grupo (Tabla 4 y 5), aunque en D5 se observa mayores tasas de embarazos al cultivar en medios secuenciales, siendo más notoria esta diferencia en los embarazos evolutivos (40,74% vs 23%).

Tabla 1. Características de los pacientes en grupos en estudio.

	Grupo A (CSC)	Grupo B (G1/G2)	P
Número de ciclos	75	119	
Edad promedio (\pm SD)	34,99 (\pm 2,85)	35,09 (\pm 3,14)	0,81
*Bajas respondedoras (n)	50,67% (38)	53,78% (64)	0,67
Ovocitos MII (media \pm SD)	5,53 \pm 3,8	5,24 \pm 3,82	0,6
Tasa de fertilización	72,46% (292/403)	67,31% (406/602)	0,09
Transferencias simples no electivas (n)	21,33% (16)	25,21% (30)	0,53

*Pacientes con diagnóstico de baja reserva ovárica y también aquellas con menos de 5 MII.

Tabla 3. Resultados de embarazos e implantación.

	Grupo A (CSC)	Grupo B (G1/G2)	P
Embriones transferidos (media \pm SD)	1,80 \pm 0,43	1,78 \pm 0,49	0,79
Sub B hCG Positiva (%)	41,33	43,70	0,75
Embarazos clínicos (%)	36,00	38,65	0,71
Implantación (%)	26,67	27,36	0,89
Abortos (%)	30,50	15,52	0,12
Embarazos evolutivos a semana 20 (%)	25,30	34,45	0,17

Tabla 4. Embarazos según día de la transferencia.

	Grupo A (CSC)	Grupo B (G1/G2)	P
Nº transferencias en día 2/3	49	92	
Sub B hCG positiva (%)	40,82	41,30	0,96
Embarazos clínicos (%)	34,69	36,96	0,79
Embarazos evolutivos (%)	26,53	23,61	0,45
Nº transferencias en día 5	26	27	
Sub B hCG positiva (%)	42,31	51,85	0,48
Embarazos clínicos (%)	38,46	44,44	0,66
Embarazos evolutivos (%)	23,00	40,74	0,16

Tabla 5. Embarazo clínico y evolutivo según el día de transferencia embrionaria utilizando el mismo medio de cultivo.

Medio de cultivo	Embarazo clínico		p-valor	Embarazo evolutivo		p-valor
	D2 y 3	D5		D2 y 3	D5	
Grupo A (CSC)	34,69% (17/49)	38,46% (10/26)	0,746	26,53% (13/49)	23,07% (6/26)	0,742
Grupo B (G1/G2)	36,69% (34/92)	44,44% (12/27)	0,485	32,61% (30/92)	40,74% (11/27)	0,438
Total	36,17% (51/141)	41,51% (22/53)	0,498	30,5% (43/141)	32,07% (17/53)	0,833

Tabla 6. Resultados según presencia o ausencia de pitting citoplasmático.

Variable	Presencia de pitting citoplasmático		p-valor
	Sí	No	
Embarazo bioquímico (SubBeta+)	72,72% (16/22)	27,27% (6/22)	0,006
Embarazo clínico	63,63% (14/22)	22,73% (5/22)	0,014
Tasa de implantación	45,45% (20/44)	18,18% (8/44)	0,011
Abortos	30,00% (6/20)	12,50% (1/8)	0,633
Embarazo evolutivo	45,45% (10/22)	22,73% (5/22)	0,203

Tasa de blastulación según presencia de pitting citoplasmático

Estas comparaciones se realizan sólo sobre los embriones cultivados en medio CSC (Grupo A), ya que sólo se dispone de 9 embriones con *pitting* en medio G1/G2 (Grupo B). Se analizaron 167 embriones que se cultivaron hasta blastocisto. Para el medio de cultivo CSC, la presencia de *pitting* se encontró asociada a la tasa de blastulación, siendo ésta del 70,91% en embriones con *pitting* y del 46,43% en embriones que no presentaron esta característica (p - valor: 0,003).

Comparación de las distintas variables según presencia o ausencia de pitting citoplasmático

Para este análisis se incluyen sólo las transferencias dobles del medio CSC (Grupo A). Se cuenta con 58 ciclos, de los que se excluyen 14 por tratarse de transferencias mixtas de embriones con y sin *pitting*, por lo que en total se analizaron 44 ciclos.

Se encontró una asociación significativa entre la presencia de *pitting* y subunidad Beta positiva (p - valor = 0,006), embarazo clínico (p - valor = 0,014) e implantación (p - valor = 0,011), identificándose en todos los casos a la presencia de *pitting* como un factor beneficioso (Tabla 6).

No se encontraron diferencias significativas en la ocurrencia de abortos y embarazo evolutivo según presencia o ausencia de pitting. Sin embargo, la tasa de embarazo evolutivo fue el doble en los casos con presencia de *pitting* (45,5% vs 22,73%).

Análisis multivariado

En el modelo de regresión logística ajustado para embarazo clínico, se encontró que el número de embriones transferidos, el medio de cultivo y la presencia de *pitting* citoplasmático producen un efecto significativo sobre la probabilidad de que se presente este evento ($p = 0,004$, $p = 0,047$ y $p = 0,004$ respectivamente) siendo no significativas la baja respuesta ovárica, el factor masculino y el día de la transferencia. Como resultado de este análisis se encontró que es más probable la ocurrencia de un embarazo clínico al transferir dos embriones versus uno, que los embriones presenten *pitting* citoplasmático y además se ve favorecida al utilizar los medios secuenciales G1/G2. Los OR para cada variable explicativa considerada en el modelo, se muestran en (Tabla 7).

Por otro lado, al considerar conjuntamente estas mismas variables para explicar las tasas de implantación y aborto en modelos de *odds* proporcio-

Tabla 7. Razones de *odds* e intervalo de confianza para las variables estadísticamente significativas en la predicción de la probabilidad de embarazo clínico.

Variable	Odds ratio	IC 95%
Nº de embriones transferidos (2 vs 1)	3.1323	1,3808 - 7,1054
Medio de cultivo (G1/G2 vs CSC)	2.4668	0,9683 - 6,2842
Pitting (no vs sí)	0.2173	0,0740 - 0,6381

nales, ninguna de ellas resultó estadísticamente significativa ($p > 0,29$ en todos los casos), y en el modelo logístico binario para embarazo evolutivo el único predictor significativo entre los analizados fue el número de embriones transferidos ($p = 0,040$), señalando que la probabilidad de lograr un embarazo evolutivo es mayor para transferencias dobles que para las simples [OR (2 vs 1) = 2,2611, IC95% = (0,9998; 5,1137)].

Discusión

Al comparar el cultivo en medio único (CSC) sin renovación en día 3 y en medios secuenciales (G1/G2) no se obtuvieron diferencias significativas respecto de calidad embrionaria, tasa de blastulación, tasas de embarazos, abortos y embarazos evolutivos a la semana 20. Sin embargo, al considerar conjuntamente el embarazo clínico con un grupo de variables explicativas en un modelo de regresión logística multivariado (medio de cultivo, baja respuesta ovárica, presencia de *pitting* en embriones transferidos, factor masculino, día de la transferencia y número de embriones transferidos) se encuentra una relación significativa entre el embarazo clínico y el medio de cultivo utilizado, como también con la presencia de *pitting* y número de embriones transferidos. Así, si cultivamos en G1/G2, es más probable que ocurra un embarazo clínico que si cultivamos en el medio CSC, manteniendo fijas las restantes condiciones consideradas en el modelo.

Cuando se ajusta un modelo similar, para analizar embarazo evolutivo utilizando las mismas variables independientes, el único predictor significativo fue el número de embriones transferidos, favoreciendo al embarazo evolutivo las transferencias dobles. No encontramos relación con el medio de cultivo a pesar de observar una tendencia más alta, aunque no significativa, del embarazo evolutivo a favor del medio secuencial cuando hicimos los análisis comparativos univariados. Habría que tener en cuenta que los abortos disminuyeron el número de evolutivos a analizar por lo que se debería continuar aumentando el número de casos para ver si este efecto encontrado en el embarazo clínico es trasladado significativamente también a los evolutivos.

En los trabajos disponibles publicados se comparan distintas marcas comerciales de medios al estudiar cultivo en medio único versus secuencial. Aunque las formulaciones de los medios únicos están basadas en los mismos principios de desarrollo, pueden diferir ampliamente en la concentración de los sustratos, y por lo tanto, los resultados presentados no pueden generalizarse a todas las formulaciones disponibles comercialmente.^{10, 14, 16, 27-30} Biggers realiza una revisión sobre el tema y en todos los trabajos que analiza se compara un solo medio único (Global) versus 7 marcas distintas de secuenciales.¹⁰ En la mayoría se compara hasta tasa de blastulación, muchos a favor del medio único pero con renovación en día 3. Sólo en tres trabajos nombrados en esa revisión se llega hasta embarazo clínico sin encontrar diferencias. En los datos publicados por Sepúlveda también se renueva el medio único en día 3 (Global) y no se encontró diferencias en las tasas de embarazos, sí en las tasas de implantación a favor del medio único, pero en ese trabajo se analizaron receptoras de óvulos donados.¹⁴ Entonces si uno de los objetivos del medio único es evitar la manipulación embrionaria al tener que cambiar de placa y medios, y con ello evitar sacarlo del incubador y evitar disturbios en el embrión, si se renueva el medio en día 3, no se estaría aprovechando estas ventajas. Sólo se mejoraría el *stress* ambiental que puede sufrir el embrión al cambiarle la composición del medio si fuese secuencial y además que el control de calidad debe realizarse en un solo medio. Pocos son los trabajos sin renovación del me-

dio único en día 3 y en general; comparan calidad embrionaria, cinética de división y porcentaje de blastulación sin analizar tasas de embarazo como resultado final.^{13, 15, 16, 31, 32} Recientemente Werner publicó un estudio prospectivo randomizado en el que demuestra que en el cultivo en medio único (CSC) sin renovación en día 3 se obtiene una menor tasa de blastulación al comparar con el secuencial, pero no se ve afectada la tasa de implantación.³³ En ese estudio sólo se incluyeron las pacientes normorrespondedoras, poniendo en duda si las conclusiones pueden extrapolarse a las bajas respondedoras. En nuestro trabajo se incluyeron todos los diagnósticos y alrededor del 50% fueron bajas respondedoras.

Con el advenimiento del *time-lapse* se ha comenzado a estudiar aún más el cultivo continuo en un solo paso para poder utilizar al máximo este avance tecnológico y proteger el desarrollo embrionario al evitar sacar los embriones del incubador para su observación. En nuestro caso utilizamos las incubadoras trigas Cook; entonces, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo observacional, al cultivar hasta día 5 sin utilizar el *time-lapse* tendríamos que volver a considerar el cultivo en medios secuenciales, por lo menos al comparar estas dos marcas comerciales (*Irvine* versus *Vitrolife*) y sabiendo que no se renovó el medio en día 3 al cultivar en medio único.

Con respecto al criterio de selección utilizado para el día de la transferencia, no se encontraron diferencias en las tasas de embarazos al transferir en día 3 o 5. Así, se prefiere adelantar la transferencia a día 2 o 3 en aquellas pacientes bajas respondedoras, priorizando al útero materno para el desarrollo embrionario ya que estas pacientes no poseen embriones de buena calidad sobrantes que nos puedan llevar a una mala elección embrionaria al momento de transferir.

Los resultados del modelo logístico multivariado para embarazo clínico también indicaron que la probabilidad de ocurrencia del mismo es mayor cuando se transfieren dos embriones. No obstante, para interpretar este resultado habría que tener en cuenta que las transferencias simples fueron no electivas, es decir, que era el único embrión disponible para transferir.

La presencia de granulaciones citoplasmáticas en día 3 se observó casi exclusivamente en los em-

briones cultivados en medio único, es decir, en el medio que contiene todos los requerimientos necesarios para alcanzar el estadio de blastocisto desde el inicio del cultivo. Inicialmente se pensó que el *pitting* podría ser una manifestación de activación genómica debido a que no se observa en día 2, sólo en día 3.²⁰ Sin embargo, Tesarik mostró mediante un estudio de microscopía electrónica que no todas las blastómeras están activadas simultáneamente y el *pitting* se observa en todas las blastómeras, por lo que se puede cuestionar esta hipótesis.³⁴ Nuestros resultados coinciden con las propuestas que sostienen que no estaría relacionado con algo intrínseco embrionario o del paciente y puede estar relacionado con la composición del medio de cultivo.¹⁵ Biggers reporta esta asociación con el medio único, pero en ese trabajo no se analizaron luego resultados sobre esos embriones transferidos. Algunos autores discuten una posible relación entre condiciones de cultivos desfavorables y la presencia de *pitting*.^{15, 35} Sin embargo, Rienzi y Desai sostienen que las granulaciones citoplasmáticas no son predictores de tasas de embarazos, según sus resultados publicados.^{17, 19} La principal diferencia en la composición del medio único (CSC) y el primer medio de los secuenciales (G1) es la ausencia en este último de aminoácidos esenciales. Nosotros encontramos que la presencia del *pitting* está asociada a la formación de blastocisto y la tasa de embarazo clínico.

Finalmente podríamos concluir de acuerdo a los resultados de este estudio observacional que las condiciones bajo las cuales se encontró que es más probable que ocurra un embarazo clínico son las transferencias de dos embriones que hayan sido cultivados en medios secuenciales G1/G2. Sin embargo, debemos considerar las limitaciones del diseño del trabajo. Si bien no se encontró diferencias significativas en los embarazos evolutivos, se observa una tendencia más alta hacia los medios secuenciales. Para poder afianzar estas conclusiones deberían extenderse estos análisis a estudios prospectivos randomizados, incluyendo un número de pacientes adecuado para garantizar una potencia prevista. Además, estos resultados no pueden hacerse extensivos a otros sistemas de cultivo comerciales. La presencia de *pitting* citoplasmático en día 3 parecería afectar favorablemente los resultados de reproducción asistida, pero se

debería seguir estudiando para su confirmación y poder llegar a considerarlo como un patrón más dentro de la clasificación embrionaria.

Agradecimientos: Los autores agradecen la colaboración de las Dras Marta Quaglino y Daniela Dianda en los análisis estadísticos.

Referencias

1. Abramczuk J, Solter D y Koprowski H. The beneficial effect of EDTA on development of mouse one-cell embryos in chemically defined medium. *Dev Biol* 1977; 61: 378-383.
2. Gardner D K y Lane M. Alleviation of the "2-cell block" and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 1996; 11: 2703-2712.
3. Gardner D K, Lane M W y Lane M. EDTA stimulates cleavage stage bovine embryo development in culture but inhibits blastocyst development and differentiation. *Mol Reprod Dev* 2000; 57: 256-261.
4. Quinn P, Moinipanah R, Steinberg J M y col. Successful human in vitro fertilization using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate ions. *Fertil Steril* 1995; 63: 922-924.
5. Conaghan J, Handyside A H, Winston R M L y col. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *Reproduction* 1993; 99: 87-95.
6. Leese H J y Barton A M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *Reproduction* 1984; 72: 9-13.
7. Lane M. y Gardner D K. Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Reproduction* 1994; 102: 305-312.
8. Barak Y; Goldman S; Gonen Y y col. Does glucose affect fertilization, development and pregnancy rates of human in-vitro fertilized oocytes? *Hum Reprod* 1998; 13: 203-211.
9. Bavister B. Glucose and the culture of human embryos. *Fertil Steril* 1999; 72: 233-234.
10. Biggers J y Summers M. Choosing a culture medium: making informed choices. *Fertil Steril* 2008; 90: 473-483.
11. Fissore R A. Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence of ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol Reprod* 1989; 41: 835-841.
12. Summers M C, McGinnis L K, Lawitts J A y col. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum Reprod* 2005; 20: 1364-71.
13. Paternot G, Debrock S, D'Hooghe T M y col. Early embryo development in a sequential versus single medium: a randomized study. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 83.

14. Sepúlveda S, García J, Arriaga E y col. In vitro development and pregnancy outcomes for human embryos cultured in either a single medium or in a sequential media system. *Fertil Steril* 2009; 91: 1765-1570.
15. Biggers J D y Racowsky C. The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOMAA medium: is a two-step protocol necessary? *Reprod Biomed Online* 2002; 5: 133-140.
16. Hardarson T, Bungum M, Conaghan J y col. Noninferiority, randomized, controlled trial comparing embryo development using media developed for sequential or undisturbed culture in a time-lapse setup. *Fertil Steril* 2015; 104: 1452-1459.
17. Desai N N, Goldstein J, Rowland D Y y col. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod* 2000; 15: 2190-2196.
18. Hartshorne G. The embryo. *Hum Reprod* 2000; 15: 31-41.
19. Rienzi L, Ubaldi F, Minasi M G y col. Blastomere cytoplasmic granularity is unrelated to developmental potential of day 3 human embryos. *J Assist Reprod Genet* 20: 314-7, 2003.
20. Ebner, T.; Tews, G.; Sommergruber, M. y col. Cytoplasmic pitting has a negative influence on implantation outcome. *J Assist Reprod Genet* 2005; 22: 239-244.
21. La Marca A y Sunkara S K. Individualization of controlled ovarian stimulation in IVF using ovarian reserve markers: from theory to practice. *Hum Reprod Update* 2014; 20: 124-140.
22. Morbeck D E, Krisher R L, Herrick J R y col. Composition of commercial media used for human embryo culture. *Fertil Steril* 2014; 102: 759-766.
23. Ebner T, Yaman C, Moser M y col. A prospective study on oocyte survival rate after ICSI: influence of injection technique and morphological features. *J Assist Reprod Genet* 2001; 18: 623-628.
24. Morbeck D E. Air quality in the assisted reproduction laboratory: a mini-review. *J Assist Reprod Genet* 2015; 32: 1019-1024.
25. Balaban B, Brison D, Calderon G y col. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod* 2011; 26: 1270-1283.
26. Gardner D K y Schoolcraft W B. In vitro culture of human blastocyst. En: *Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics Beyond*. Jansen R and Mortimer D (eds.) Parthenon Publishing, London, pp378-388, 1999.
27. Ciray H N, Aksoy T, Goktas C. y col. Time-lapse evaluation of human embryo development in single versus sequential culture media-a sibling oocyte study. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 891-900.
28. Scarica C, Ubaldi F M, Orlando G. y col. Single step versus sequential culture medium: effects on embryo development, genetic and clinical outcomes. En: *Abstract Book of the 31st Annual Meeting of ESHRE*. Evers J, Somigliana E and Sharpe R (eds.) Oxford University Press, Munich, 24-i25, 2015.
29. Sfontouris I A, Kolibianakis E M, Lainas G T y col. Blastocyst development in single-step versus sequential culture media: a prospective randomized study with sibling oocytes. En: *Abstract Book of the 30th Annual Meeting of ESHRE*. Evers JLH, Somogliana E and Sharpe R (eds.) Oxford University Press, Munich, 2-i3, 2014.
30. Shimomura M, Fukunaga N, Kitasaka H y col. Comparisons between different types of culture medium for human embryo development. En: *Abstract Book of the 30th Annual Meeting of ESHRE*. Evers J, Somogliana E and Sharpe R (eds.) Oxford University Press, Munich, 2014.
31. Reed M L, Hamic A, Thompson D J y col. Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study. *Fertil Steril* 2009; 92: 1783-1786.
32. Summers M C, Bird S, Mirzai F M y col. Human preimplantation embryo development in vitro: a morphological assessment of sibling zygotes cultured in a single medium or in sequential media. *Hum Fertil* 2013; 16: 278-285.
33. Werner M D, Hong K H, Fransiak J M y col. Sequential versus Monophasic Media Impact Trial (SuMMIT): a paired randomized controlled trial comparing a sequential media system to a monophasic medium. *Fertil Steril*, 2016.
34. Tesaík J, Kopeń V, Plachot M y col. Early morphological signs of embryonic genome expression in human preimplantation development as revealed by quantitative electron microscopy. *Dev Biol* 1988; 128: 15-20.
35. Cooke S, Quinn P, Kime L y col. Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril* 2002; 78: 1254-1260.