



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Desarrollo y viabilidad de embriones obtenidos por FIV hasta la etapa de blastocisto en medios secuenciales en ratones de la cepa CD-1

Tesis presentada para obtener el título de:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
ALAIN PRIEGO CORTÉS

TUTORA: ROSALINA MARÍA DE LOURDES REYES LUNA



INDICE

RESUMEN	1
I.- INTRODUCCIÓN	2
II.- ANTECEDENTES	9
III.- JUSTIFICACIÓN.	12
IV.- OBJETIVOS	13
V.- HIPÓTESIS	14
VI.- MATERIAL Y MÉTODOS	15
6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.	15
6.2 MEDIOS DE CULTIVO.	15
6.3 INDUCCIÓN DE LA OVULACIÓN.	15
6.4 OBTENCIÓN E INCUBACIÓN DE OVOCITOS.	15
6.5 OBTENCIÓN DE ESPERMATOZOIDES.	16
6.6 FERTILIZACIÓN <i>IN VITRO</i> Y CULTIVO DE EMBRIONES.	16
6.7 VARIABLES REGISTRADAS.	17
6.7.1 <i>Morfología.</i>	17
6.7.2 <i>Viabilidad.</i>	18
VII.- RESULTADOS	19
7.1 OVOCITOS RECUPERADOS Y OVOCITOS FECUNDADOS.	19
7.2 ETAPAS DE DESARROLLO.	19
7.3 MORFOLOGÍA.	20
7.4 RENOVACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.	23
VIII.- DISCUSIÓN	24
IX.- CONCLUSIONES	26
X.- BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

Introducción: En los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) regularmente los embriones son transferidos en las etapas de desarrollo de 4 u 8 células (2do y 3er día respectivamente). Sin embargo, *in vivo*, los embriones en estos estadios de división aún se encuentran en las trompas de Falopio y es en la etapa de blastocisto en la que se implanta el embrión en el útero de forma natural. Esto podría explicar las bajas tasas de implantación y embarazo en la FIV. El uso de medios de cultivo secuenciales (MCS) y la transferencia de blastocistos han llevado al aumento significativo en las tasas de implantación y a obtener altas tasas de embarazo, con una reducción concomitante en el número de embriones transferidos y, por lo tanto, una reducción en el número de gestaciones múltiples. Por lo tanto, se requiere desarrollar MCS que sean capaces de mantener el desarrollo de los embriones hasta blastocisto en el laboratorio y que cubran las necesidades fisiológicas del embrión para no comprometer su viabilidad. Objetivo: Probar medios de cultivo para desarrollar embriones de ratón obtenidos por Fertilización *in vitro* hasta la etapa de blastocisto, para tener mejores probabilidades de implantación. Resultados: Un total de 163 embriones de ratón fueron obtenidos por FIV. Del total de los experimentos en donde hubo fertilización en el 80% se obtuvieron embriones en etapa de 4 células, a partir de estos el 50% desarrolló embriones a 8 células y de estos últimos el 100% avanzó a mórula. Los embriones en las diferentes etapas de desarrollo mostraron características morfológicas normales, es decir, blastómeras uniformes en tamaño y forma redondeada con membrana plasmática intacta; y zona pelúcida íntegra. Al cuarto día se obtuvieron embriones en etapa de mórula, los cuales presentaban la morfología característica. Conclusiones: Mórulas morfológicamente viables se desarrollan a partir de embriones obtenidos por FIV cultivados en los medios secuenciales G1 y G2. Los MCS sustentan el desarrollo de embriones en las etapas de dos, cuatro, ocho células y mórula. Hay un mejor desarrollo embrionario cuando el medio de cultivo es renovado cada tercer día.

I.- INTRODUCCIÓN

En los procedimientos de fertilización *in vitro* (FIV) regularmente los embriones son transferidos en las etapas de desarrollo de 4 u 8 células (2do y 3er día respectivamente). Sin embargo, *in vivo*, los embriones en estos estadios de división aún no llegan al útero y todavía se encuentran en las trompas de Falopio. Esto podría explicar las bajas tasas de implantación y embarazo en la FIV (10% de los embriones transferidos en FIV resultan en un nacimiento vivo), ya que la transferencia de embriones en etapa de divisiones tempranas al útero no da lugar a altas tasas de embarazo en comparación con embriones transferidos después de la compactación o en la etapa de blastocisto (Gardner y Lane, 1997).

Una de las razones por la que los embriones no sean transferidos en la etapa de blastocisto es la dificultad de mantener el embrión de mamífero en cultivo hasta esta etapa ya que se pone en peligro su viabilidad.

Los medios de cultivo para embriones tienden a ser simplistas, ya que carecen de reguladores importantes para la función celular, no toman en cuenta los cambios fisiológicos del embrión ni los cambios en el entorno del tracto reproductor femenino, además de que se emplea un solo medio para todo el desarrollo preimplantatorio del embrión, tratándose de un periodo muy dinámico.

Los medios de cultivo para embriones tienen que ser más complejos y deben reflejar los cambios que se producen en la fisiología del embrión a medida que avanza el desarrollo, y los cambios paralelos en el entorno del aparato reproductor femenino. Además, la composición de tales medios debería cambiar a medida que avanza el desarrollo del embrión. Por consiguiente, el crecimiento óptimo del embrión requiere el uso de dos o más medios de cultivo formulados para cumplir con los requisitos cambiantes del embrión (Gardner y Lane, 1997).

Una consideración importante es que el punto de partida del cultivo, el cigoto, comparte pocas similitudes fisiológicas con el blastocisto, el punto final del período preimplantatorio. Los blastómeros de embriones tempranos tienen una fisiología análoga a la de los organismos unicelulares, es hasta después de que el embrión pasa por la compactación, y con ésta la formación del primer epitelio de transporte, cuando las células de la mórula recién formada adquieren la fisiología más como de una célula somática, siendo capaz de regular su medio interno. Esto significa que antes de la compactación, el embrión es

potencialmente más susceptible a su entorno (Gardner *et al.*, 2002). Por lo tanto, con respecto a la fisiología del embrión, es apropiado considerar el periodo de preimplantación en al menos dos fases: pre-y post-compactación (Gardner y Lane, 1997).

El embrión en etapa temprana se caracteriza por niveles relativamente bajos de biosíntesis, bajas tasas respiratorias y capacidad limitada para utilizar la glucosa como fuente de energía (preferencia por el piruvato como nutriente sobre la glucosa). En contraste, después de la compactación, las tasas de biosíntesis aumentan, junto con un aumento de la capacidad respiratoria y la capacidad de utilizar la glucosa (Gardner y Lane, 1997). Tomando en cuenta esta dinámica en la fisiología del embrión, se ha dado lugar al desarrollo de sistemas de cultivo secuenciales capaces de apoyar el desarrollo de blastocistos viables (Gardner *et al.*, 2002).

Por lo tanto, para poder desarrollar un medio de cultivo adecuado para el desarrollo de blastocistos, se deben analizar los nutrientes y compuestos que resultan importantes e influyen en la fisiología del embrión y en el tracto femenino, como son: carbohidratos, aminoácidos, quelantes y suero.

Carbohidratos.

Los embriones en estadio temprano de desarrollo, en varias especies de mamíferos, no parecen utilizar glucosa como fuente de energía, de hecho la utilización prematura de la glucosa por el embrión en etapa de división se asocia con un deterioro de la capacidad oxidativa, que culmina en reducción del desarrollo del embrión. El cúmulo de células que rodean el embrión temprano es muy activo metabólicamente, consumen glucosa y liberan lactato y piruvato. Por lo tanto, *in vivo*, el embrión temprano está expuesto a un entorno esencialmente libre de glucosa (Gardner y Lane, 1997).

Paralelamente, los niveles de glucosa en el oviducto son más bajos en el momento en que el embrión temprano está presente (0.5 mM), mientras que el piruvato está en su nivel alto (0.32 mM). Por el contrario, la glucosa alcanza su pico de concentración (3.15 mM) y el piruvato su nivel más bajo (0.1mM) en el útero (Gardner y Lane, 1997).

Sin embargo, en medios de cultivo para el desarrollo de embriones en etapas posteriores no debe eliminarse la glucosa, ya que, cuando el cúmulo de células se ha dispersado, el

embrión está expuesto a la glucosa en el tracto femenino. De la misma forma, se debe tomar en cuenta que el embrión, de la etapa de 2 células en adelante, posee un transportador específico para la glucosa (lo que indica alguna función fisiológica para ésta). Además, en presencia de reguladores adecuados (como aminoácidos) la glucosa no pone en peligro el desarrollo del embrión y por último, la glucosa tiene importantes funciones celulares diferentes al ser fuente de energía (precursor anabólico clave), necesario para la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos; precursor para los azúcares complejos de mucopolisacáridos y glucoproteínas; la glucosa metabolizada por la vía del fosfato de pentosa (PPP) genera moléculas de ribosa que son requeridas para la síntesis de ácido nucleico, moléculas de NADPH requeridas para la biosíntesis de lípidos y otras moléculas complejas (Gardner y Lane, 1997).

Por lo tanto, la glucosa será cada vez más importante una vez que se activa el genoma embrionario y los niveles de biosíntesis aumentan.

Aminoácidos.

El embrión de mamífero mantiene una fuente endógena de aminoácidos y posee sistemas de transporte específicos para tomar aminoácidos de sus alrededores (Gardner *et al.*, 2002). Concomitantemente, los aminoácidos se encuentran entre los reguladores más importantes del desarrollo preimplantatorio del embrión de mamífero, por ello son componentes clave de los medios de cultivo para embriones.

Los elevados niveles de aminoácidos presentes en los fluidos del tracto reproductor femenino, con la excepción de la glutamina, comparten una homología con los presentes en los aminoácidos no esenciales de Eagle (Eagle, 1959) (aminoácidos no requeridos para el desarrollo de células somáticas en cultivo). Estos aminoácidos estimulan el desarrollo de cigotos a etapa de blastocisto, reduciendo significativamente la duración de los primeros tres ciclos celulares, lo que resulta en un aumento de las tasas de desarrollo y de viabilidad. Por el contrario, el grupo de aminoácidos esenciales (presentes en niveles relativamente bajos en el tracto femenino) no confiere ningún beneficio para el embrión en cultivo antes de la etapa de 8 células, y la exposición del embrión a tales aminoácidos antes de la compactación da como resultado la pérdida de la viabilidad y el deterioro del desarrollo del blastocisto en cultivo (Gardner y Lane, 1997; Gardner *et al.*, 2002).

Sin embargo, en embriones en etapa de 8 células, la exposición al grupo de aminoácidos esenciales es estimulante; aumenta la velocidad de división de la masa celular interna (internal cell mass-ICM) y el desarrollo fetal posterior (el desarrollo de la ICM se correlaciona positivamente con el desarrollo fetal después de la transferencia). Al mismo tiempo, los aminoácidos no esenciales y la glutamina funcionan como estimulantes para la formación del blastocelo y contribuyen al aumento del número de células del trofoblasto y al aumento de las tasas de eclosión de la zona pelúcida (Gardner y Lane, 1997; Gardner *et al.*, 2002). Este aumento en la utilización de aminoácidos refleja las necesidades específicas de los tipos celulares del blastocisto y el aumento general de la síntesis de proteínas a medida que avanza el desarrollo (Gardner *et al.*, 2002).

Por lo tanto, los porcentajes más altos de desarrollo de blastocistos y eclosión, mayor número de células totales y número de células de la ICM, junto con las tasas más altas de implantación y el desarrollo del feto se producen cuando los cigotos se cultivan durante las primeras 48 h en presencia de aminoácidos no esenciales y glutamina, seguido de cultivo durante 48 h en presencia de todos los 20 de los aminoácidos de Eagle (esenciales y no esenciales) (Gardner y Lane 1997). De manera significativa, tasas equivalentes a las de implantación de blastocistos desarrollados *in vivo* se han obtenido con embriones de ratón y humanos al ser cultivados de esta forma (Gardner *et al.*, 2002).

Además de que los aminoácidos funcionan como precursores anabólicos para proteínas que operan en el embrión en etapa de división, éstos tienen otras al participar como reguladores del metabolismo energético, osmolitos y buffers de pH.

- Reguladores del metabolismo energético: Antes de la compactación, el embrión de mamífero utiliza piruvato, lactato y/o aminoácidos para generar a través de la oxidación, la energía requerida. Seshagiri y Bavister en 1991, así como Barnett y Bavister en 1996, demostraron que el efecto inhibitorio de la glucosa y el fosfato en el desarrollo del embrión disminuye significativamente con la inclusión de aminoácidos no esenciales y glutamina. Los aminoácidos actúan posiblemente a través de su propia oxidación, que a su vez dará lugar a la inhibición alostérica de la enzima fosfofructoquinasa glucolítica a través de un aumento en los niveles de ATP y/o citrato, o por la inhibición directa de una enzima glicolítica, tales como piruvato quinasa por alanina (Gardner y Lane, 1997).

- Osmolitos: los aminoácidos son usados por el embrión para mantener las funciones celulares y el volumen celular. La presión osmótica del fluido del oviducto (> 360 mOsmol) es mucho mayor que la de cualquier medio de cultivo. Cuando los embriones se incuban en osmolaridades tan altas en ausencia de osmolitos conocidos, el desarrollo se ve afectado significativamente. En contraste, cuando osmolitos, tales como la glicina, se incluyen en el medio de cultivo se observa un aumento en el desarrollo del embrión. Estudios posteriores han demostrado que la glutamina, taurina y betaína también son utilizados por los embriones en etapa de división como osmolitos (Gardner y Lane, 1997).
- Buffers de pH: El embrión en etapa de división parece carecer de algunos de los mecanismos de regulación para el control del pH. Como los aminoácidos no esenciales están presentes en concentraciones relativamente altas dentro del tracto femenino, aminoácidos tales como glicina (> 2 mM) podrían actuar como un tampón zwitteriónico intracelular, ayudando a minimizar las fluctuaciones de pH. Análisis de pH intracelular en cigotos de ratón y mórulas ha revelado que antes de la compactación la presencia de aminoácidos no esenciales y glutamina en el medio de cultivo ayuda a minimizar los cambios de pH intracelulares. Sin embargo, después de la compactación los aminoácidos tienen poco efecto sobre la capacidad del embrión para regular una carga de ácido (Gardner y Lane, 1997).

Los aminoácidos, al ser metabolizados por el embrión en cultivo o someterse a descomposición espontánea, liberan amonio en el medio de cultivo y, desafortunadamente, el amonio es tóxico para el embrión, obstruyendo el desarrollo y disminuyendo la viabilidad de éste (Gardner y Lane, 1993; Lane y Gardner, 1997). Por lo tanto, se ha propuesto que el medio de cultivo tiene que ser reemplazado cada 48 horas para evitar la acumulación de amonio. Sin embargo, al renovar los medios de cultivo se eliminan factores autócrinos que estimulan el desarrollo del embrión (Gardner y Lane, 1997).

La solución está en transaminar el amonio en el medio de cultivo para el aminoácido glutamato, eliminando la necesidad de renovar el medio. Después de 48 h de cultivo, la enzima glutamato deshidrogenasa, el sustrato α -cetoglutarato y el co-factor NADH se añaden al medio de cultivo en concentraciones seguras para el embrión, posteriormente

la enzima convierte el amonio presente a glutamato (Gardner y Lane, 1997). Blastocistos cultivados en la presencia de aminoácidos cuando amonio fue transaminado del medio tenían un aumento notable en la viabilidad después de la transferencia en comparación con los blastocistos cultivados con el medio renovado después de 48 h, lo que indica que la exposición continua de los embriones a estos factores estimula el desarrollo (Lane y Gardner, 1995).

Quelantes.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) es el quelante (secuestra cationes divalentes de metales pesados) más comúnmente empleado en los medios de cultivo de embriones. El EDTA en el medio de cultivo aumenta el desarrollo del embrión por la quelación de iones tóxicos de metales pesados presentes en los medios, también inhibe la utilización prematura de la glucólisis por los embriones en estadio de división, impidiendo la detención del desarrollo en cultivo (Gardner y Lane, 1997).

El EDTA estimula el desarrollo del embrión durante la etapa de división, mientras que después de la compactación reduce significativamente el desarrollo del blastocisto (Gardner *et al.* 1997a) y el desarrollo fetal después de la transferencia (Gardner y Lane, 1996). Por lo tanto, los embriones pre y post-compactación tienen una respuesta diferente a EDTA, así que, el embrión no debe ser expuesto a este agente quelante después de la etapa de 8 células de desarrollo.

Suero.

El suero es un suplemento común en los medios de cultivo de embriones. Sin embargo, el suero, debido a los factores de crecimiento que contiene, puede afectar negativamente el desarrollo de los embriones por formación precoz del blastocelo, secuestro de lípidos, ultraestructura mitocondrial anormal y perturbaciones en el metabolismo. Contrariamente a lo anterior, el suero es un quelante de potenciales toxinas de embriones y actúa como tampón de pH, de tal forma que confiere cierto grado de protección al embrión en etapa de división (Gardner y Lane, 1997).

Afortunadamente, el suero podemos sustituirlo por una forma apropiada de albúmina sérica o una macromolécula fisiológica como hialuronato. En el caso de hialuronato, se encontró que la inclusión de este glicosaminoglicano en el medio, resultó en tasas de implantación de blastocistos de ratón de casi el doble (Gardner *et al.*, 1997b), lo que justifica el papel de los glicosaminoglicanos en el desarrollo del embrión humano en cultivo y en la implantación después de la transferencia.

II.- ANTECEDENTES

Desde que se empezaron a desarrollar y usar las Técnicas de Reproducción Asistida se ha intentado llevar a etapa de blastocisto a los embriones obtenidos, ya que, es en esta etapa en la que el embrión se implanta en el útero de forma natural.

Barnes *et al.* en 1995 propone dos medios de cultivo secuenciales para embriones desde la etapa de cigoto hasta la de blastocisto. Los medios fueron nombrados G1 y G2 (Tabla 1). El medio G1 está diseñado para el desarrollo de embriones desde cigoto hasta la etapa de 8 células, y el medio G2 está formulado para el desarrollo de embriones desde la etapa de 8 células hasta blastocisto. Haciendo uso de estos medios logró obtener un blastocisto a partir de seis embriones humanos obtenidos por Inyección intracitoplásmica, el cual fue implantado en el útero de una mujer con múltiples fracasos de FIV y que resultó en el nacimiento de una niña en buen estado de salud.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo de embriones G1 y G2. Tomado de Barnes et al., 1995. La osmolaridad de los medios es 260-265 mOsmol.

Componente (mM)	G1	G2
NaCl	85.16	85.16
KCl	5.5	5.5
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	0.5	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.8	1.8
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0	1.0
NaHCO ₃	25.0	25.0
Na piruvato	0.32	0.10
Na lactato (L-isoforma)	10.5	5.87
Glucosa ^b	0.50	3.15
Glutamina	1.0	1.0
Taurina	0.1	0.0
Aminoácidos no esenciales	Todos	Todos
Aminoácidos esenciales	Ninguno	Todos
EDTA	0.01	0.0
Albumina sérica humana	2 g/l	2 g/l

Gardner (1994) investigó el efecto de los aminoácidos, amonio, vitaminas y el cultivo en grupo en el desarrollo de cigotos de ovejas cultivados en medio de Fluido sintético de

oviducto (SOF) suplementado con albumina sérica bovina (BSA). Observó que en cultivo con medio SOF el 28% de los embriones llegaron a mórula y el 29% a blastocisto, mientras que en tratamiento SOF adicionado con todos los aminoácidos de Eagle obtuvieron el 28% de embriones se desarrollaron hasta mórula y el 67% hasta la etapa de blastocisto, con lo que concluye que el desarrollo de blastocistos ocurre en la presencia de todos los aminoácidos de Eagle.

En 1998 en un estudio realizado por Gardner y Lane sobre el cultivo de blastocistos humanos en medios secuenciales libres de suero, mencionan que uno de los efectos benéficos de usar medios secuenciales en el cultivo de embriones es el alto porcentaje de desarrollo de blastocistos (> 80% en embriones de ratón y >50% en humanos) concluyendo que usando medios secuenciales es posible cultivar embriones humanos hasta blastocisto con porcentajes aceptables de desarrollo, implantación y embarazo, reduciendo la transferencia de múltiples embriones y con ello el número de gestaciones múltiples.

Jones (1998) cultivó cigotos humanos en micro gotas de 20 µl de medio IVF-50 por dos días, posteriormente juntó y cultivó 2 o 3 embriones en micro gotas de 50 µl de medio G2 del día 3 al 5. Los embriones se transfirieron a medio G2 nuevo en el día 5 y cultivados por 1 o 2 días más, obteniendo el 44% de embriones con más de 8 células en el día tres y el 52% de cigotos desarrollados hasta blastocisto y propone que con su protocolo se puede mejorar el desarrollo y la selección de embriones viables.

Behr en 1999 estudió el desarrollo de blastocistos humanos sin el uso de co-cultivo, medios condicionados o suero completo. Los embriones fueron obtenidos por FIV y cultivados en gotas de 150 µl de medio P1 por 120 horas. De 838 embriones cultivados 448 (53.5%) alcanzaron la etapa de blastocisto, concluyendo que con un sistema simple de cultivo secuencial se pueden obtener porcentajes aceptables de desarrollo de blastocistos viables, sin el uso de co-cultivo, medio condicionado o suero.

En 2003 Lane comparó el desarrollo de blastocistos en co-cultivo y en cultivo con medios secuenciales G1 y G2. Para el co-cultivo usaron células BRL (Buffalo Rat Liver) y los embriones se cultivaron por 7 días. Para el cultivo en medios secuenciales, los cigotos se colocaron en medio de Gardner 1 mejorado (G1.2), a las 72 h se transfirieron a medio de Gardner mejorado (G2.2) y se cultivaron durante otras 72 h. El porcentaje de blastocistos

desarrollados fue equivalente en co-cultivo (26.7%) y en los medios secuenciales G1.2/G2.2 (21.4%). Tampoco hubo diferencia en el número de células del blastocito.

Utsunomiya *et al.* (2004) realizaron un estudio para evaluar las ventajas y porcentajes de implantación y de embarazos al usar blastocistos comparados con embriones en el día 3 de desarrollo. El porcentaje de blastulación fue de 35.4% (460 de 1299), mientras que los porcentajes de implantación fueron similares para ambos tratamientos (21.4% para blastocisto y 19.1% para embrión en día 3), así mismo, no hubo diferencia en el porcentaje de embarazos (29.3% para blastocisto y 29.2 para embrión en día 3). Por lo tanto, concluyen que no existen ventajas al usar blastocistos comparado con embriones en día 3 de desarrollo.

Por su parte, Perin en el 2007, examinó el efecto de dos medios (KSOM y medios secuenciales G1/G2) en el desarrollo hasta la etapa de blastocisto de embriones de ratón fertilizados *in vitro*. Observó que el porcentaje de cigotos que se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto después de 96 y 120 horas de cultivo era mayor para el grupo cultivado en medio KSOM (83% y 94% respectivamente) en comparación con el grupo cultivado en los medios G1/G2 (55% a las 96 horas y 77% a las 120 horas). De igual forma, el número de células de la masa celular interna fue mayor en el grupo KSOM. Por lo que concluye que el medio KSOM es mejor para cultivar embriones desde una célula hasta blastocisto en ratón.

III.- JUSTIFICACIÓN.

Normalmente, en la FIV humana se transfieren los embriones en el día 2 (etapa de 4 células) o en el día 3 (etapa de 8 células) de desarrollo, pero hay que tomar en cuenta que *in vivo* el embrión en estadio de división aún reside en la trompa de Falopio. La transferencia de embriones de diferentes mamíferos en éste estadio al útero podría explicar en parte las bajas tasas de implantación asociadas a la FIV.

La transferencia de embriones en etapa de blastocisto aumentará las tasas de implantación y de embarazo por embrión transferido. Sin embargo, uno de los principales problemas para poder transferir blastocistos es que los medios de cultivo utilizados en la FIV y el desarrollo de embriones son incapaces de mantener al embrión de mamífero por más de un par de días sin que se vea disminuida drásticamente su viabilidad. Por lo tanto, se requiere desarrollar medios de cultivos secuenciales o prolongados que sean capaces de mantener el desarrollo de los embriones hasta blastocisto y que cubran las necesidades fisiológicas del embrión para no comprometer su viabilidad.

Por otra parte, no todos los embriones concebidos a través de FIV son capaces de llegar a la etapa de blastocisto, debido principalmente a anomalías cromosómicas. El cultivo de blastocistos elimina a la mayoría de los embriones anormales antes de la transferencia. Por lo tanto, el cultivo de embriones hasta la etapa de blastocisto *in vitro* puede ser considerado como parte de la selección natural a la que están sometidos los embriones durante el desarrollo. Se podría entonces concluir que los embriones que llegan a la etapa de blastocisto tienen un potencial de desarrollo inherentemente superior y por lo tanto, alta viabilidad.

El poder analizar el desarrollo de los embriones y el uso de técnicas no invasivas para el análisis del metabolismo para seleccionar los blastocistos más viables para la transferencia, junto con cultivos prolongados para blastocisto pueden llegar a ser de suma importancia en la FIV.

Por lo tanto en este trabajo se analizó el desarrollo de los embriones hasta etapa de blastocisto en diferentes medio de cultivo, además del uso de cultivos secuenciados o prolongados. Esto puede llegar a ser de suma importancia para obtener embriones viables para su transferencia, en las Técnicas de Reproducción Asistida como la FIV e ICSI lo que podría asegurar llegar a término el desarrollo embrionario.

IV.- OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desarrollo de los embriones obtenidos por fertilización *in vitro* hasta la etapa de blastocisto al ser incubados en medios de cultivo secuenciales

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar si el cambio de medios secuenciales cada 24 horas mantiene el desarrollo del embrión.

Determinar si el cambio de medios secuenciales cada 48 horas beneficia el desarrollo de los embriones.

V.- HIPÓTESIS

La utilización de medios de cultivos largos en embriones de ratones de la cepa CD-1 obtenidos por FIV permitirá la obtención de blastocistos viables.

VI.- MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental.

Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa CD-1 de 10 semanas de edad. Se realizaron 10 experimentos en grupos de 2 hembras y 1 macho.

6.2 Medios de cultivo.

Los medios de cultivo secuenciales para embriones fueron preparados en el laboratorio siguiendo las concentraciones establecidas por Barnes y colaboradores en 1995 (Tabla 1). De igual forma el medio CZB-Hepes (20 mM de Hepes, 81.6 mM de NaCl, 4.8 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO₄-7H₂O, 1.7 mM de CaCl₂-2H₂O, 1.2 mM de KH₂PO₄, 0.1 mM de EDTA-Na₂, 31 mM de Na Lactato, 5 mM de NaHCO₃, 0.3 mM de Na Piruvato, 0.1 mg/ml de Polivinil alcohol, 10µg/ml de Rojo de fenol, 1mg/ml de BSA; pH 7.4) para la maduración de ovocitos y espermatozoides.

6.3 Inducción de la ovulación.

Se indujo superovulación a ratones hembra por la administración vía intraperitoneal 5 U.I. (0.1ml) de gonadotropina coriónica de yegua preñada (PMSG), posteriormente, a las 48 horas se administró vía intraperitoneal 5 U.I. de gonadotropina coriónica humana (HCG) (Yoshida y Perry, 2007).

6.4 Obtención e incubación de ovocitos.

A las 15 horas de la administración de HCG se sacrificaron las dos hembras del grupo por dislocación cervical. Los oviductos se recolectaron y colocaron en medio CZB-Hepes para recuperar los complejos cúmulo-ovocito (células de la granulosa-ovocito) de las asas de las trompas de Falopio. Los complejos cúmulo-ovocito recuperados se incubaron en medio CZB por 3 horas permitiendo la separación de las células de la granulosa del ovocito.

6.5 Obtención de espermatozoides.

Los espermatozoides se obtuvieron por perfusión de la cola del epidídimo de los machos adultos y se capacitaron por 1 hora en medio CZB-Hepes adicionado con albúmina al 4%.

6.6 Fertilización *in vitro* y cultivo de embriones.

Para realizar la fertilización *in vitro* los ovocitos se colocaron en grupos de 4 en gotas de 50 μ l de medio de cultivo secuencial G1. Cada placa contenía ocho gotas de medio cubiertas de aceite mineral (figura 1).

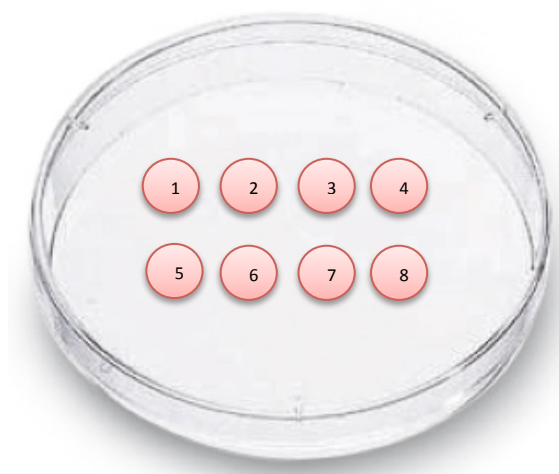


Figura 1. Modelo de las placas para cultivo de embriones en donde las 8 gotas representan 50 μ l de medio de cultivo G1 cubiertas con aceite mineral.

Para la fecundación cada grupo de 4 ovocitos se incubó en presencia de 50,000 espermatozoides capacitados en medio G1 (Tabla 1). Posteriormente las placas para cultivo se incubaron en una estufa a 37° C en atmósfera húmeda de aire y CO₂ al 5%. Se verificó el desarrollo embrionario cada 24 horas.

Los embriones resultantes de la fertilización fueron cultivados por tres días (hasta etapa de 8 células) en medio G1. Al cuarto día de desarrollo los embriones fueron transferidos a medio G2 hasta culminar el cultivo a los 5 días (Etapa de blastocisto). A la mitad de los experimentos se les cambiaron los medios secuenciales diario y al resto cada tercer día.

6.7 Variables registradas.

6.7.1 Morfología.

Se analizó la morfología de los embriones de ratones todos los días durante el experimento. El análisis se basó en los parámetros establecidos por Remohí *et al.* (2012) en el Manual práctico de esterilidad y reproducción humana: laboratorio de reproducción asistida (Tabla 2).

Tabla 2. Parámetros utilizados para el análisis morfológico de embriones, con la descripción de las características presentes en un embrión viable en las primeras etapas de desarrollo. Basado en Remohí *et al.* (2012).

PARÁMETROS PARA EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE EMBRIONES	
Parámetro	Características de un embrión viable
Número de células	4 células en el día 2 y 7-8 células en el día 3 es el número óptimo. 6, 9 o 10 células es aceptable.
Velocidad de división	El embrión duplica su número de células cada 24 horas.
Tamaño celular y simetría	Embriones de 2,4 u 8 células, con distribución regular del volumen celular y blastómeros de un tamaño similar, se consideran simétricos.
Aspecto del citoplasma	Aspecto claro y ligeramente granulado
Zona pelúcida	Disminución asimétrica del grosor durante el cultivo.
Fragmentación	Hasta un 35% de fragmentación asociada a un solo blastómero o que corresponde a la fragmentación de un blastómero

6.7.2 Viabilidad.

Se analizó la viabilidad de los embriones todos los días por medio del avance en el desarrollo y por análisis morfológico utilizando, como se mencionó anteriormente, los parámetros descritos por Remohí *et al.* (2012) (Tabla 2).

VII.- RESULTADOS

7.1 Ovocitos recuperados y ovocitos fecundados.

Se recuperaron un total de 320 ovocitos distribuidos en 10 experimentos (promedio de 32 ovocitos recuperados por experimento), los cuales después de la incubación en medio CZB-H el 51% (163 ovocitos) presentaron cuerpo polar, por lo que eran viables para ser fecundados. Del total de ovocitos con cuerpo polar, 163 (100%) fueron fertilizados por FIV (Tabla 3).

Tabla 3. Numero total de ovocitos recuperados, porcentaje de ovocitos que presentaron cuerpo polar posterior a la incubación, viables para fecundación, y número de ovocitos fecundados por fertilización *in vitro*.

Ovocitos recuperados (n)	Porcentaje de ovocitos con presencia de cuerpo polar	Ovocitos fecundados (n)
320	51%	163

7.2 Etapas de desarrollo.

Los 163 embriones fecundados por FIV se distribuyeron en 10 experimentos. En los 10 experimentos (100%) se obtuvieron embriones de 2 células, en el 80% de los experimentos los embriones avanzaron a etapa de 4 células, y en el 40% los embriones progresaron a etapa de 8 células y mórula (Tabla 4).

Tabla 4. Proporción de los experimentos en los que se obtuvieron embriones en etapas de 2 células, 4 células, 8 células y mórula.

Etapas	Proporción de los experimentos
2 células	10/10
4 células	8/10
8 células	4/10
Mórula	4/10

Del total de los experimentos en donde hubo fertilización en el 80% se obtuvieron embriones en etapa de 4 células. Partiendo de estos últimos, el 50% desarrollo embriones a 8 células y, tomando los experimentos en los que se obtuvieron embriones de 8 células como el total, el 100% avanzó a mórula.

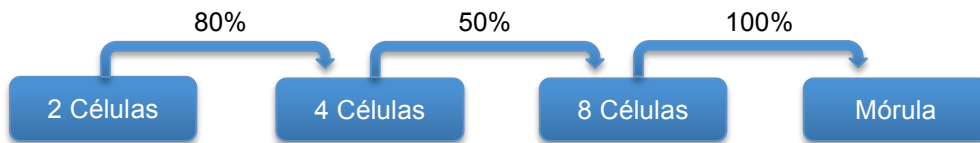


Figura 2. Porcentaje de experimentos en los cuales se recuperaron embriones en diferentes etapas desarrolladas, tomando el número de experimentos de la etapa inmediata anterior como el 100%.

7.3 Morfología.

Los ovocitos se recuperaron en grupos compuestos de cúmulos de células de la granulosa-ovocito, los cuales forman nubes (Figura 3). En los ovocitos de ratón maduros incubados durante 3 horas se observó el primer cuerpo polar y citoplasma homogéneo y transparente (figura 4).

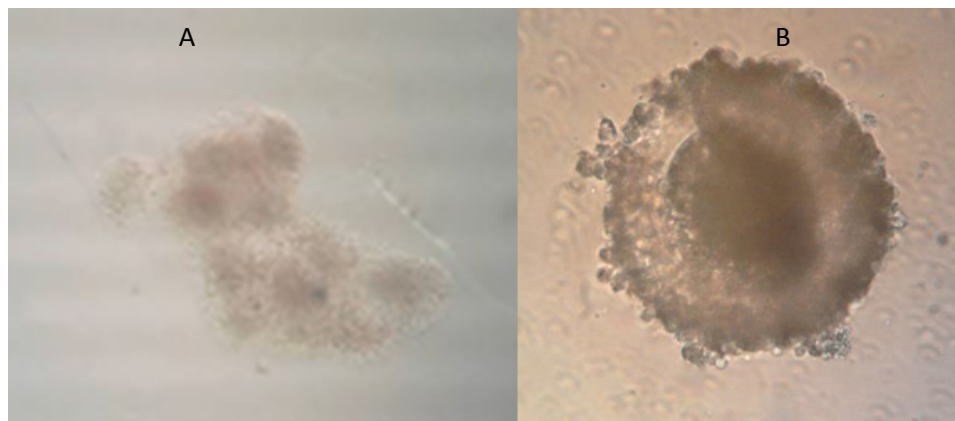


Figura 3. Microfotografías en contraste de fases que muestran: A) Nube de ovocitos de ratón recién recuperados de las asas después de la inducción. Con aumento de 4x. B) Ovocito cubierto de células de la granulosa (cúmulo células de la granulosa-ovocito). Con aumento de 40x.

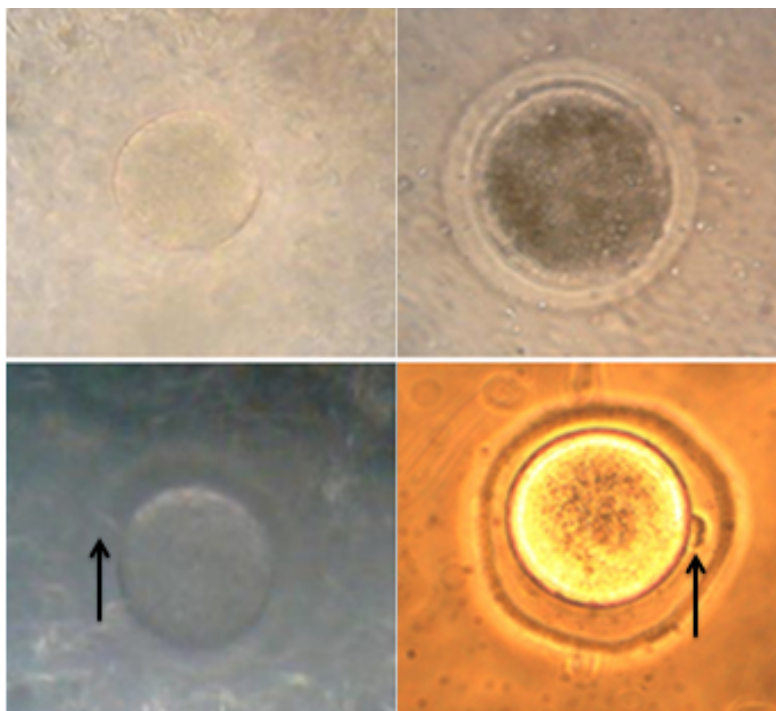


Figura 4. Fotografías en contraste de fases de ovocitos de ratón maduros después de las 3 horas de incubación en medio CZB a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. Se observa el primer cuerpo polar (flecha). Con aumento de 40x.

A las 24 horas de la FIV se observaron embriones en etapa de dos células (Figura 5), en el día 2, embriones de cuatro células (Figura 6) y en el día 3 embriones de ocho células. Todos los embriones en dichas etapas presentaron características morfológicas normales, es decir, blastómeras simétricas con citoplasma homogéneo, membrana plasmática distinguible e intacta, tamaño uniforme y forma redondeada; y zona pelúcida íntegra.

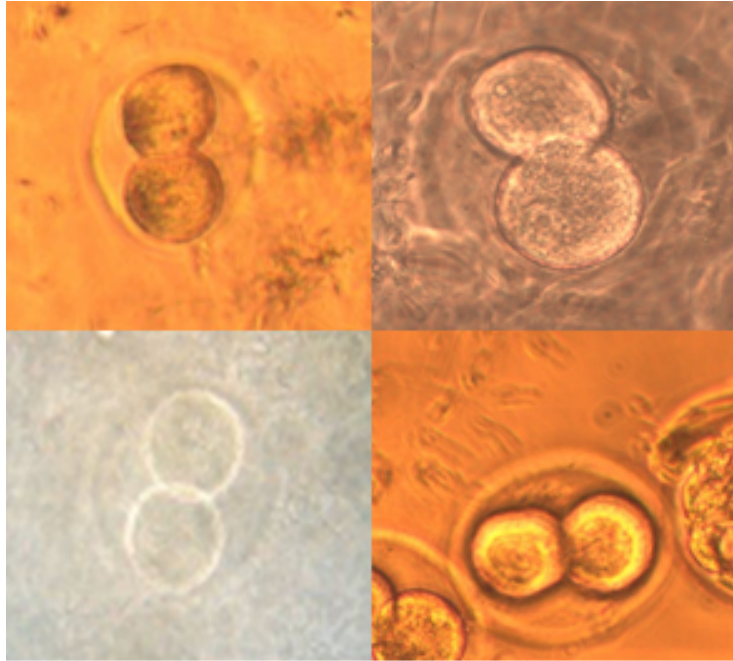


Figura 5. Fotografías en contraste de fases de embriones de ratón en etapa de dos células cultivados por 24 horas en medio G1 a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. 40x

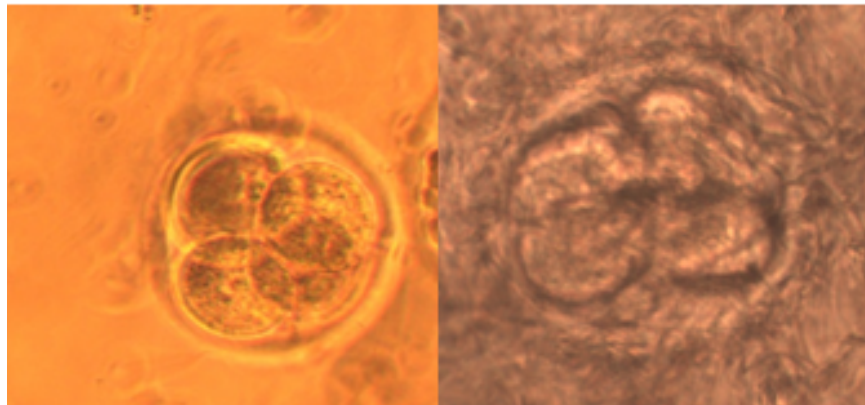


Figura 6. Fotografías en contraste de fases de embriones de ratón en etapa de cuatro células incubados por 2 días en medio G1 a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. 40x

Al cuarto día se obtuvieron embriones en etapa de mórula (Figura 7), los cuales presentaban la morfología característica, es decir, 16 o más blastómeras de forma esferoide, unidas constituyendo una masa compacta y de apariencia simétrica.

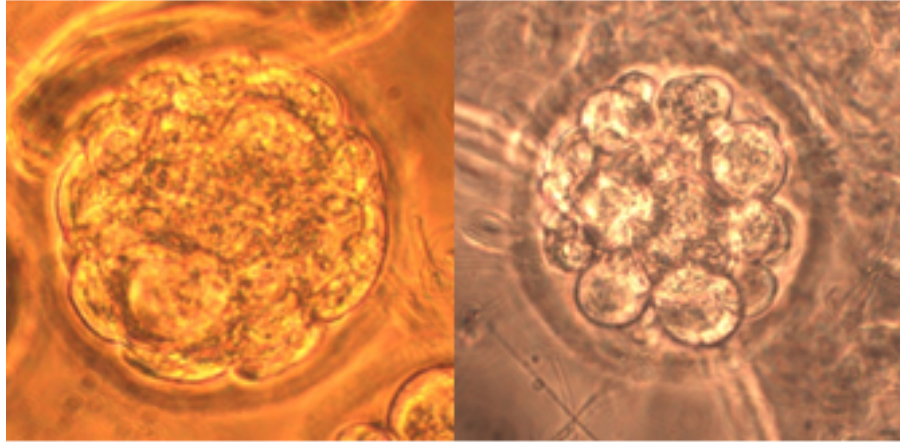


Figura 7. Fotografías en contraste de fases de mórulas de ratón incubadas por 4 días en medio G2 a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. 40x

7.4 Renovación de medios de cultivo.

Se observó que al renovar los medios de incubación secuenciales cada 24 horas el desarrollo de los embriones se detuvo en la etapa de 4 células. Los mejores resultados en el desarrollo se obtuvieron cuando el medio de cultivo secuencial G1 se renovó cada 48 horas, y en los días 4 y 5 los embriones se incubaron en el medio G2 (sin renovación de medio), donde se logró avanzar el desarrollo hasta etapa de mórula (tabla 5).

Tabla 5. Proporción de los experimentos en los que se obtuvieron embriones en etapas de 2 células, 4 células, 8 células y mórula cuando el medio de cultivo se renovó cada 24 horas y cuando se renovó cada 48 horas.

Etapa	Proporción de los experimentos	
	Cultivo renovado C/24 h	Cultivo renovado C/48 h
2 células	5/5	5/5
4 células	4/5	4/5
8 células	3/5	1/5
Mórula	3/5	1/5

VIII.- DISCUSIÓN

En la literatura se ha reportado que en los procesos de fertilización *in vitro* el porcentaje de éxito en el desarrollo embrionario hasta la etapa de mórula y blastocisto ha sido de 28% (Gardner *et al.*, 1994), 44% (Jones *et al.*, 1998) y 55% (Perin *et al.*, 2007).

En este trabajo se experimentó con el uso de medios secuenciales para el desarrollo embrionario. El porcentaje de ovocitos fecundados por FIV fue del 52%, el cual se encuentra dentro del rango aceptado en los protocolos usados en Clínicas de Reproducción Asistida. Del total de experimentos, el porcentaje en el que se obtuvieron embriones en las etapas de cuatro y ocho células fue de 80% y 40% respectivamente, lo cual también concuerda con Jones *et al.* (1998) que obtuvo el 44% de embriones con más de 8 células en el día tres.

Actualmente los embriones son transferidos al útero en etapas de cuatro y ocho células, por lo tanto, los porcentajes de desarrollo hasta esas etapas obtenidos en este trabajo son aceptables. El desarrollo de embriones en las primeras etapas puede deberse a que el medio G1 cumple los requerimientos fisiológicos de carbohidratos y aminoácidos principalmente, nutrientes que juegan un papel crucial en el desarrollo del embrión.

El porcentaje de desarrollo a mórula a partir de ocho células fue del 100% y del 40% del total de experimentos, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Jones *et al.* (1998) y Behr *et al.* (1999), que obtuvieron el 52% y el 53.5%, respectivamente, de embriones que alcanzaron dicha etapa. Así como fue mayor en comparación con los datos presentados por Gardner *et al.* (1994), quien obtuvo el 28% de embriones desarrollados a mórula. El desarrollo hasta la etapa de mórula nos indica que el medio G2 contiene los nutrientes necesarios para sustentar el desarrollo del embrión hasta esta etapa.

Los embriones desarrollados hasta las diferentes etapas presentaron morfología normal y característica de cada etapa, blastómeras con citoplasma homogéneo y membrana plasmática intacta, por lo tanto, se consideraron como embriones viables. Sin embargo, el análisis morfológico no es suficiente para determinar si el desarrollo del embrión es correcto en un 100% para poder elegir los mejores embriones a implantar.

Por otro lado, al renovar el medio de cultivo cada 24 horas los embriones desarrollaron hasta la etapa de 4 células, en cambio, cuando el medio de cultivo se renovó cada 48

horas, se logró llevar el desarrollo embrionario hasta la etapa de mórula. Esto podría deberse a que, como lo mencionaron Gardner y Lane en 1997, en el medio de cultivo encontramos factores autócrinos producidos por el mismo embrión que al renovar el medio de cultivo cada 24 horas son eliminados del medio. En cambio, si el medio se renueva cada 48 horas dichos factores estimulan el desarrollo del embrión.

Se ha reportado en la literatura que a pesar de obtener blastocistos morfológicamente correctos, no se obtienen tasas más altas de implantación, para ello se requiere que los blastocistos sean viables, por lo que se deben desarrollar más medios secuenciales que sustenten el desarrollo del embrión hasta blastocisto viable.

Al cultivar embriones en medios secuenciales se podrían realizar análisis metabólicos y genómicos para detectar embriones viables y hacer la elección de los mejores a implantar para obtener éxito en las Técnicas de Reproducción Asistida. Además, el embrión en etapa de blastocisto es cuando se implanta *in vivo*, por lo tanto es la fase ideal a la que se debe llegar usando medios de cultivo secuenciales. En este trabajo no se obtuvieron blastocistos, una de las posibles causas pueden ser los medios de cultivo en especial el G2 al no cubrir con los requerimientos necesarios para el desarrollo del embrión hasta esta etapa. También puede deberse a las variaciones en el pH, temperatura y CO₂ en el medio de cultivo al trabajar con los embriones. Es muy importante mantener estables estos tres factores al cultivar embriones ya que ligeras variaciones en cualquiera de ellos altera el metabolismo del embrión provocando daños en el material genético, deteniendo el desarrollo embrionario. Por consiguiente se requieren más estudios de los medios de cultivo para llevar a los embriones obtenidos por FIV o ICSI a etapa de blastocisto en condiciones de viabilidad adecuados para llegar a término en su desarrollo después del proceso de implantación.

IX.- CONCLUSIONES

- Mórulas morfológicamente viables se desarrollan a partir de embriones obtenidos por FIV cultivados en los medios secuenciales G1 y G2.
- Los medios de cultivo secuenciales sustentan el desarrollo de embriones en las etapas de dos células, cuatro células, ocho células y mórula.
- Hay un mejor desarrollo embrionario cuando el medio de cultivo es renovado cada tercer día.

X.- BIBLIOGRAFÍA

- Barnes, F., Crombie, A., Gardner, D.K., Kausche, A., Lacham-Kaplan, O., Suikkari, A.M., Tiglias, J., Wood, C. and Trounson, A.O. (1995) Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Human Reproduction*, 10:3243-3247.
- Behr, B., Pool, T.B., Milki, A.A., Moore, D., Gebhardt, J., and Dasig, D. (1999) Preliminary clinical experience with human blastocyst development *in vitro* without co-culture. *Human Reproduction*, 14:454–457.
- Dorado M., Marqués de Oliveira N., Lorenzo C., Vázquez G., Marco Y. (2006) Evolución de los medios de cultivo embrionario en Técnicas de Reproducción Asistida. *Revista Iberoamericana de Fertilidad*, 23:31-36.
- Gardner, D.K. and Lane, M. (1993) Amino acids and ammonium regulate the development of mouse embryos in culture. *Biology Reproduction*, 48:377–385.
- Gardner, D.K. and Lane, M. (1996) Alleviation of the “2-cell block” and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Human Reproduction*, 11:2701–2712.
- Gardner, D.K. and Lane, M. (1997) Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Human Reproduction Update*, 3:367–382.
- Gardner, D.K. and Lane, M. (1998) Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *European Society for Human Reproduction and Embryology. Human Reproduction*, 13:148-159.
- Gardner, D. K., Lane, M., Spitzer, A. and Batt, P. A. (1994) Rates of Cleavage and Development for Sheep Zygotes Cultured to the Blastocyst Stage In Vitro in the Absence of Serum and Somatic Cells: Amino Acids, Vitamins, and Culturing Embryos in Groups Stimulate Development. *Biology of reproduction* 50:390-400.
- Gardner, D.K., Lane, M.W. and Lane, M. (1997a) Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 h of development from the zygote. *Theriogenology*, 47:278.
- Gardner, D.K., Lane, M. and Rodriguez-Martinez, H. (1997b) Fetal development after transfer is increased by replacing protein with the glycoaminoglycan hyaluronate for embryo culture. *Human Reproduction*, 1:215.
- Gardner, D.K., Lane, M. and Schoolcraft W. B. Physiology and culture of the human blastocyst. (2002) *Journal of Reproductive Immunology*, 55:85–100.

- Glujovsky D., Blake D., Bardach A., Farquhar C. (2012) Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Issue 7. Art. No.: CD002118. DOI: 10.1002/14651858.CD002118.pub4.
- Jones, G.M., Trounson, A.O., Gardner, D.K., Kausche, A., Lolatgis, N. and Wood, C. (1998) Evolution of a culture protocol for successful blastocyst development and pregnancy. *Human Reproduction*, 13:169–177.
- Lane, M. and Gardner, D.K. (1995) Removal of embryo-toxic ammonium from the culture medium by in situ enzymatic conversion to glutamate. *Journal of Experimental Zoology*, 271:356–363.
- Lane, M. and Gardner, D.K. (1997) Differential regulation of mouse embryo developments and viability by amino acids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 109:153–164.
- Lane, M., Gardner, D.K., Hasler, M.J., Hasler, J.F. (2003) Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 60:407–419.
- Perin, P.M., Maluf, M., Januário, D.A.N.F. and Saldiva, P.H.N. (2008) Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. *Fertility and Sterility*, 90:1503-1510.
- Remohí, J. (2012) *Manual práctico de esterilidad y reproducción humana: laboratorio de reproducción asistida*. 4ta Edición. Editorial Médica Panamericana. ISBN: 8498357330, 9788498357332.
- Utsunomiya, T., Ito, H., Nagaki, M. and Sato, J. (2004) A prospective, randomized study: day 3 versus hatching blastocyst stage *Human Reproduction*, DOI: 10.1093/humrep/deh288.
- Yoshida, N. and Perry, Anthony. (2007) Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Nature Protocols*, 2:296-304.