

## CULTIU I DESENVOLUPAMENT *IN VITRO* D'EMBRIONS HUMANS

MARK GROSSMANN I MARIA CARME PONS

*Unitat de Reproducció Assistida, Centre Mèdic Teknon.*

Adreça per a la correspondència: Mark Grossmann. Centre Mèdic Teknon.  
Vilana, 12. 08022 Barcelona. Adreça electrònica: [ura@cmtekon.com](mailto:ura@cmtekon.com).

### RESUM

En gairebé trenta anys les tècniques de reproducció humana assistida s'han universalitzat i alhora s'ha aconseguit augmentar-ne l'èxit gràcies a millores tant en l'aspecte clínic com en el del laboratori. Tradicionalment, s'ha utilitzat el criteri morfològic (avaluació de les característiques morfològiques de l'embrió) per seleccionar els millors embrions per transferir. No obstant això, el valor predictiu d'aquest criteri és força limitat i, amb vista a augmentar les taxes de gestació, les transferències de més d'un embrió són les més habituals, amb el conseqüent risc de gestació múltiple. Així, el repte actual en reproducció humana assistida és aconseguir la gestació única mitjançant la reducció del nombre d'embrions transferits a un. Caldrà, doncs, millorar els medis de cultiu per permetre seleccionar embrions en estadis més avançats i alhora disposar de criteris d'avaluació que correlacionin eficaçment les característiques de l'embrió amb la seva viabilitat. Actualment, els esforços s'encaminen en dues direccions: la primera, el desenvolupament del criteri morfològic, amb la tendència a un sistema d'avaluació seqüencial de l'embrió en diferents estadis, i la segona, molt més nova, la recerca de noves tècniques no invasives basades en l'anàlisi dels constituents de l'embrió i del seu metabolisme.

**Paraules clau:** embrió, desenvolupament, cultiu *in vitro*, viabilitat, no invasiu.

### CULTURE AND *IN VITRO* DEVELOPMENT OF HUMAN EMBRYOS

#### SUMMARY

During the past three decades the practice of clinical assisted reproduction have grown world-wide and moreover the success rate has increased thanks to clinical and laboratory improvements. Traditionally, the morphological criteria has been applied to select embryos to transfer. However, the predictive value of this criteria is limited so that the multiple-embryo transfers are very common leading to a higher risk of multiple pregnancy. The goal in assisted reproduction is achieving a single pregnancy through the reduction of the

number of embryos used in transfer to one. Single embryo transfer requires culture media to improve in order to allow the embryo selection in more advanced stages as well as having a reliable method to evaluate the embryo viability. Nowadays, strategies are carrying out in two different fields: the first one, continuing in morphometric criteria, it tends to use a sequential scoring system from the oocyte through to the cleavage-stage embryo to allow selecting the most viable embryo in a cohort and the second one, in the research field, the development of new techniques based on the analysis of the embryo constitution and its metabolism.

**Key words:** embryo, development, *in vitro* culture, viability, non-invasive.

## FASES DEL DESENVOLUPAMENT EMBRIONARI EN HUMANS

El desenvolupament embrionari s'inicia amb la fecundació, quan el gàmet masculí, l'espermatozoide, es fusiona amb el femení, l'òocit, i es forma el zigot.

Es caracteritza per la presència de dos corpuscles polars (CP) i de dos pronuclis (un de femení i un de masculí) que es troben junts, juxtaposats i alineats respecte dels CP. Malgrat que és un punt encara controvertit, es creu que aquesta disposició podria marcar ja l'establiment de la polaritat del futur embrió (Edwards i Beard, 1997).

Els dos pronuclis no arriben a fusionar-se en un sol nucli, sinó que la cromatina de cadascun es condensa directament en cromosomes i a partir d'aquí es produirà la primera divisió cel·lular i, com a resultat, dues cèl·lules filles. La durada d'aquest primer cicle cel·lular és d'unes 24 h, mentre que els següents són més curts, i cada 18-20 hores es produirà un nou cicle de divisió.

El desenvolupament embrionari es caracteritza per una sèrie de cicles de divisió cel·lular sense creixement de les cèl·lules filles. És a dir, en cada divisió cel·lular es duplica el nombre de cèl·lules alhora que es redueix a la meitat la mida de cadascuna. Es passa d'una cèl·lula gegant, com és el zigot, a un conjunt de cèl·lules de mida similar a la d'altres tipus cel·lulars. Les cèl·lules de l'embrió reben el nom específic de *blastòmers*.

Les tres primeres divisions embrionàries (durant dos dies i mig) es realitzen a càrrec del material de reserva (RNA, proteïnes, aminoàcids...) fabricat i emmagatzemat en l'òocit durant la maduració en el fol·licle ovàric. Fins aquest moment es considera que cadascun dels blastòmers és totipotent.

És en l'estadi de 4-8 cèl·lules quan es produeix l'activació del genoma embrionari; en aquests dos dies i mig s'han sintetitzat els RNA i les proteïnes pròpies de l'embrió absolutament necessaris per poder continuar el seu desenvolupament.

En els següents estadis de desenvolupament, a més d'haver-hi divisió, hi ha canvis en la relació entre els blastòmers i, per tant, en l'aparença de l'embrió.

Es produeix el fenomen de la compactació, és a dir, les cèl·lules augmenten la superfície de contacte entre si i es creen unions molt fortes, que culminen en l'estadi de mòrula, on hi ha unes cèl·lules situades en la part més externa i unes altres en la més interna. Aquesta disposició implica ja una certa diferenciació, i així, els gairebé trenta blastòmers que constitueixen la mòrula són considerats pluripotents.

Les cèl·lules situades externament comencen a bombejar líquid des de l'exterior, de manera que es crea una cavitat en l'interior que anirà augmentant de volum. Es tracta de la cavitat blastocèlica, i defineix el darrer estadi del desenvolupament embrionari preimplantacional, anomenat *blastocist*.

Les cèl·lules més externes (cèl·lules del trofotoderma) van adquirint un aspecte epitel·loide, ja que la pressió del líquid en la cavitat les aplatina contra la zona pellúcida. Mentrestant, les cèl·lules més internes s'agrupen formant la massa cel·lular interna, una mena de pilota ancorada parcialment en el trofotoderma.

Com podem veure a la figura 1, en cinc dies es poden observar totes les fases del desenvolupament embrionari, des del zigot fins al blastocist, estadi en el qual es formen les dues línies cel·lulars diferenciades, el trofotoderma (TF) i la massa cel·lular interna (MCI). Aquest darrer grup de cèl·lules originarà l'embrió pròpiament dit i algunes membranes extraembrionàries, mentre que les cèl·lules del trofotoderma només produiran teixits extraembrionaris.

Entre el 5è i el 7è dia de desenvolupament embrionari el blastocist eclosiona, s'allibera de la zona pellúcida i s'implanta en l'endometri matern.

## QUALITAT EMBRIONÀRIA

En tècniques de reproducció humana assistida, els zigots generats en un cicle de fecundació *in vitro* (FIV) es mantenen entre dos i sis dies en cultiu *in vitro* fins al moment de la transferència (dipòsit dels embrions dins l'úter de la dona).

El desenvolupament embrionari descrit anteriorment, les etapes i les característi-

ques de l'embrió en cadascuna d'aquestes, correspon al desenvolupament ideal. Volem dir amb això que a través del cultiu dels embrions *in vitro* s'ha constatat que un gran nombre d'embrions no arriba a desenvolupar-se fins a l'estadi de blastocist i, per tant, no té possibilitats d'implantar-se a l'úter matern, en part a causa de condicions de cultiu encara subòptimes i, en part, al baix potencial de desenvolupament propi d'alguns embrions.

Per això, durant aquests dies de cultiu *in vitro* és molt important poder esbrinar quins embrions són els que tenen més probabilitats de desenvolupar-se correctament i implantar-se, per tal de seleccionar-los per a la transferència.

Molts estudis, ja des de l'inici de la FIV, demostren que les possibilitats de gestació depenen, entre d'altres factors (edat de la dona, nombre d'embrions transferits, receptivitat endometrial...), de la qualitat dels embrions transferits, és a dir, que quan es transfereixen embrions de bona qualitat les taxes de gestació aconseguides són superiors a quan els embrions transferits no són de bona qualitat (Royen *et al.*, 1999).

La situació ideal seria la transferència d'un únic blastocist viable, embrió amb un gran potencial d'implantació (Gardner, 1998) que originaria una gestació única. Però la realitat és que el cultiu *in vitro* no està suficientment optimit per permetre el desenvolupament fins a l'estadi de blastocist d'embrions que sí que ho farien

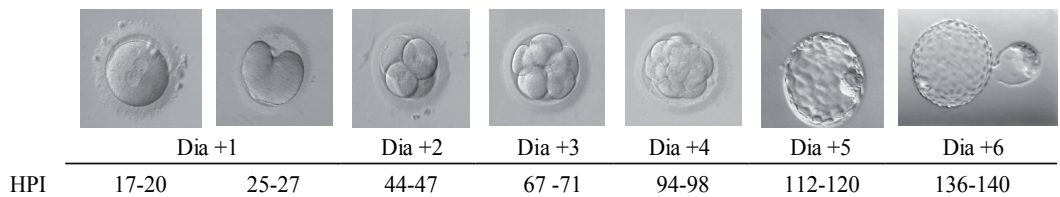


FIGURA 1. Desenvolupament embrionari preimplantacional: del zigot al blastocist. Desenvolupament ideal corresponent als dies de cultiu *in vitro* i a les hores d'observació postinseminació (HPI).

*in utero*, i, el que és més important, encara no existeix cap mètode totalment fiable que permeti distingir entre embrions viables i no viables, de manera que el més habitual és transferir més d'un embrió en els estadis més primerencs del desenvolupament. Aquesta estratègia porta implícit el risc de gestació múltiple, amb les greus complicacions que comporten per als fetus i per a la mare.

Fa deu anys la transferència de tres o quatre embrions era una pràctica molt generalitzada, mentre que actualment la transferència més comuna és la de dos embrions. Malgrat aquesta tendència a reduir el nombre d'embrions, liderada pels països del nord d'Europa, la incidència de gestació de bessons encara continua elevada.

Des d'un punt de vista legal, alguns estats de la Unió Europea han limitat el nombre d'embrions que es poden transferir, com és el cas de l'Estat espanyol, on la Llei 14/2006, de 26 de maig, sobre tècniques de reproducció humana assistida, limita el nombre a tres. En altres països on no està regulat per llei són organismes especials, o bé les societats científiques, les que elaboren recomanacions al respecte.

L'objectiu primordial dels professionals de la reproducció humana assistida és aconseguir una gestació, però no qualsevol tipus de gestació, sinó una gestació única. Tanmateix, els resultats indiquen que aquest és un objectiu difícil d'acomplir, ja que el panorama real amb el qual ens trobem sovint és paradoxal: o no s'obté la gestació o bé s'obté una gestació múltiple.

Per aproximar-nos a l'objectiu cobejat és indispensable disposar de criteris d'avaluació dels embrions que correlacionin eficaçment la qualitat de l'embrió amb la seva capacitat de generar un embaràs.

Tradicionalment, l'eina emprada per a la selecció embrionària ha estat el criteri morfològic, mètode no invasiu que consisteix

en la simple observació dels embrions al microscopi invertit per avaluar les seves característiques i classificar-los en una escala de qualitat. Els paràmetres morfològics en els quals es basa l'avaluació són el ritme de desenvolupament, el percentatge de fragmentació, la mida dels blastòmers, la multinucleació i l'aspecte del citoplasma. Així, un embrió de bona qualitat reuneix les següents característiques: el ritme de desenvolupament adequat (4-5 cèl·lules el 2n dia i 7-8 cèl·lules el 3r dia), presenta un percentatge de fragmentació inferior al 20-25 %, els blastòmers que el constitueixen tenen una mida igual o semblant i cap d'aquests no mostra multinucleació (més d'un nucli en un blastòmer) (Royen *et al.*, 1999; ASEBIR, 2008).

Està documentat que el potencial d'implantació dels embrions es redueix quan el ritme de divisió és lent (Desai *et al.*, 2000; Hardanson *et al.*, 2001; Royen *et al.*, 2001), quan el percentatge de fragmentació és superior al 25 % o quan predominen fragments de mida gran (Alikani *et al.*, 2000; Antczak i Blerkom, 1999), quan hi ha una evident desigualtat en la mida dels blastòmers (Hardanson, *et al.*, 2001) o quan observem blastòmers multinucleats (Pelinck *et al.*, 1998; Moriwaki *et al.*, 2004). L'avaluació de les característiques de l'oòcit també té gran importància, ja que anomalies severes en el citoplasma de l'oòcit tenen un efecte en detriment de la viabilitat de l'embrió (Balaban *et al.*, 2008) i, d'altra banda, les anomalies en la zona pellúcida dificultaran el procés d'eclosió (Calderon *et al.*, 2002).

En els darrers anys, diversos estudis proposen la incorporació de nous criteris per determinar la qualitat embrionària basats en l'avaluació de paràmetres morfològics en estadis més primerencs del desenvolupament embrionari. Alguns autors postulen l'avaluació exhaustiva del zigot (mesura i polarització dels pronucis, nombre i mida

dels nuclèols), ja que les seves dades relacionen la morfologia pronuclear dels zigots amb la seva capacitat implantatòria (Scott i Smith, 1998; Tesarik *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000). Altres estudis proposen l'observació de la primera divisió mitòtica la tarda del 1r dia, entre les 25-27 hores postinseminació (Lundin *et al.*, 2001) com a eina per detectar els embrions més competents. La majoria de publicacions recomanen la utilització d'aquests nous paràmetres com a criteri addicional al convencional, per establir un sistema seqüencial que pugui ajudar a diferenciar embrions de la mateixa qualitat.

Però, malgrat l'experiència acumulada en més de vint anys de FIV i de l'aplicació cada cop més exhaustiva del criteri morfològic, l'eficiència de la FIV pel que fa a nens nascuts continua baixa. Es calcula que només la meitat dels embrions de bona qualitat en el 3r dia arriben a desenvolupar-se fins a l'estadi de blastocist (Rijnders i Jansen, 1998) i, en les millors condicions, no-

més la meitat dels blastocists s'implanten (Gardner *et al.*, 1998). Dit d'una altra manera, al voltant del 85 % dels embrions transferits no s'implanten (Sakkas, 2008).

Lògicament, es dedueix que el valor predictiu del criteri morfològic és limitat; la manca d'estàndards explica, en part, aquesta limitació, ja que cada centre té un criteri i una classificació embrionària propis. De fet, l'acord entre diferents centres és màxim en la definició d'embrió de molt bona qualitat i en la d'embrió de mala qualitat, però el consens disminueix a l'hora de classificar embrions de qualitat intermèdia.

En aquest sentit, l'Associació per a l'Estudi de la Biologia de la Reproducció (ASEBIR), que aplega als professionals de la reproducció assistida, ha estat pionera en l'estandardització d'un criteri en proposar una classificació embrionària aplicable en tots els centres de l'Estat espanyol. ASEBIR ha optat, com a primer pas, per la valoració de la qualitat embrionària en una clas-

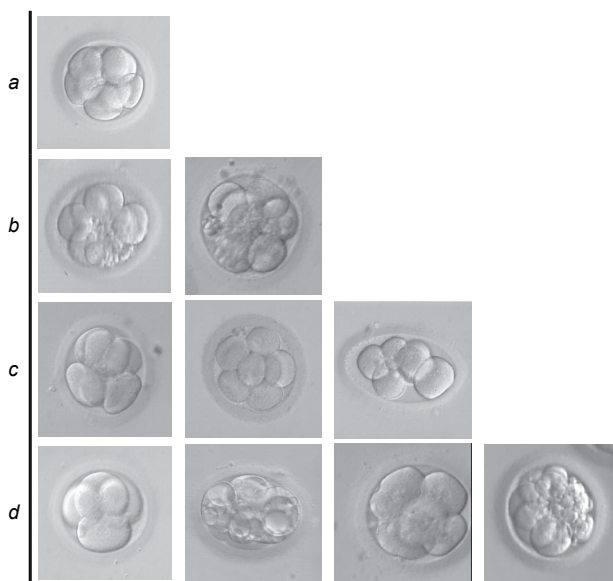


FIGURA 2. Classificació ASEBIR: exemples d'embrions del 3r dia corresponents a cada categoria.

sificació per categories (*a*, *b*, *c* i *d*) enfront d'un sistema de puntuació en què es fa molt més difícil la correcta ponderació dels diferents paràmetres (ASEBIR, 2008). L'aplicació d'aquesta classificació per part del major nombre de centres de reproducció assistida i l'anàlisi posterior de les dades permetrà afinar la classificació i augmentar el seu valor predictiu amb vista a la implantació. A la figura 2 es mostren imatges d'alguns embrions classificats en les quatre categories.

Diversos autors demostren que les aneuploidies cromosòmiques són una de les causes de la fallada en la implantació (Giannaroli, 1997; Munné i Cohen, 1998; Harper i Delhanty, 2000). Troben aneuploidies en embrions de mala qualitat, en embrions procedents de dones majors de trenta-set anys d'edat (Gianaroli *et al.*, 1999), en embrions procedents de parelles amb historial previ d'avortaments i, el que és més remarcable, també s'observen aneuploidies en embrions de bona qualitat. Aquests autors proposen seleccionar els embrions cromosòmicament normals mitjançant les tècniques de diagnòstic genètic preimplantacional (DGP), per tal d'incrementar la taxa d'implantació dels embrions transferits. De tota manera, els resultats publicats no mostren una millora substancial en la taxa de «nen-a-casa», que és el que, en definitiva, vol una parella estèril. Per aquest motiu, el DGP no es considera actualment una tècnica de rutina per a la selecció dels embrions més competents i, a més, no hem d'oblidar que es tracta d'un mètode invasiu que implica la manipulació de l'embrió i l'extracció d'una cèl·lula, amb el conseqüent perjudici sobre el desenvolupament i viabilitat posteriors.

En els darrers anys, en l'àmbit de la recerca, s'estan desenvolupant noves tècniques no invasives per a l'avaluació de la viabilitat embrionària que en el futur puguin ser alternatives als mètodes descrits i aplicats fins avui dia. Totes es duen a terme en

l'àrea de les «òmiques», i es basen en l'anàlisi dels constituents de l'embrió viable, el seu genoma (genòmica), els seus RNA missatgers (transcriptòmica), la seva expressió proteica (proteòmica) i, finalment, els metabòlits que utilitza l'embrió (metabolòmica). Mentre que l'anàlisi del material genètic s'ha de fer de manera invasiva, prenent mostres de l'embrió i, per tant, minvant-ne el potencial de desenvolupament, l'anàlisi de les proteïnes i dels metabòlits és ideal, ja que es realitza de manera no invasiva.

Conceptualment es pot considerar que la informació que pot aportar l'anàlisi metabòlica és el reflex més real de com és un embrió en un moment determinat, ja que són els metabòlits els que caracteritzaran les funcions de l'embrió. Així, com millor puguem definir quins metabòlits estan correlacionats amb la viabilitat embrionària, més fiable serà el valor de predicció del mètode.

L'estudi de les vies metabòliques utilitzades en les diferents etapes del desenvolupament embrionari per a la millora dels medis de cultiu ha permès desenvolupar treballs que suggereixen que embrions amb gran activitat glucolítica tenen poc potencial de desenvolupament (Gardner *et al.*, 2001; Lese, 2002). Altres autors proposen mesurar el *turnover* d'alguns aminoàcids per predir el potencial de desenvolupament *in vitro* d'un embrió per esdevenir blastocist (Houghton *et al.*, 2002) o bé per generar una gestació evolutiva (Brison *et al.*, 2004). Recentment, s'ha publicat un estudi molt interessant (Vergouw *et al.*, 2008) en el qual, analitzant canvis en el metabolisme oxidatiu, s'obté un resultat amb un valor de predicció de la gestació superior en un 15 % al valor de predicció del criteri morfològic.

Des d'un altre vessant tècnic, estudis de mesures de consum d'oxigen realitzats en bovins semblen indicar que embrions amb un índex de respiració superior o inferior al rang mitjà tenen menys probabilitats de

generar un embaràs (Lopes *et al.*, 2007) i la mateixa tecnologia aplicada a oòcits suggereix resultats en la mateixa línia: les taxes de respiració altes o baixes es correlacionen amb la subsegüent atrèsia o amb anomalies en els oòcits (Scott *et al.*, 2007).

En definitiva, la majoria d'aquests estudis destillen la idea que els embrions que s'implanten modifiquen el seu entorn *in vitro* de manera diferent a com ho fan els que no s'implanten i, a més, aquest comportament metabòlic és independent de la seva morfologia.

Tots aquests assaigs tenen, com a denominador comú, la utilització de tecnologia altament especialitzada (cromatografia líquida d'alta resolució, espectroscòpia, microfluorimetria...) que, ara per ara, no està a l'abast de la majoria de laboratoris de reproducció assistida. En la mesura en què se simplifiquin i s'avalui l'eficàcia d'aquestes tecnologies en l'aplicació clínica, descobrirem la seva potencialitat com a eina en el camí envers la transferència d'un únic embrió.

## CULTIU *IN VITRO* D'EMBRIONS HUMANS

La idea de fer créixer embrions humans en condicions artificials extrauterines es va publicar, sembla que per primera vegada, l'any 1944 a la revista *Science*, en un treball signat pels científics Rock i Menkin.

De totes maneres, no fou fins tres dècades després que Steptoe i Edwards (els mateixos que tindrien el primer naixement *in vitro*) publicaren dades de creixement *in vitro* d'embrions humans fins a l'estadi de blastocist (Steptoe *et al.*, 1971). I avui, trenta-vuit anys després d'aquella fita, encara es considera que les condicions de cultiu *in vitro* d'embrions són subòptimes, és a dir, millorables.

De fet, els primers medis emprats per al cultiu *in vitro* d'embrions eren senzillament els mateixos medis pensats i descrits per al cultiu cel·lular, per exemple el medi Ham's F-10 (originàriament descrit per al cultiu de cèl·lules d'ovari de hamster), el medi Dulbecco's MEM (*minimum essential medium*), o lleugeres variacions d'aquests medis.

Els requeriments nutricionals de les cèl·lules somàtiques en cultiu són constants al llarg del temps, però no ho són els requeriments dels embrions, que mostren diferents exigències en funció del seu estadi de desenvolupament abans i després de la compactació. Per això, un medi de cultiu apropiat per al desenvolupament *in vitro* d'embrions hauria de considerar la particular fisiologia dels embrions i els seus requeriments nutricionals a l'hora d'establir la seva composició.

En els seus primers estadis de desenvolupament, els embrions precompactació creixen tan ràpidament que no tenen oportunitat de respondre als canvis ambientals externs: tot allò que necessiten per a aquestes primeres divisions abans de l'activació del genoma embrionari ja s'hauria de trobar en l'oòcit i, per tant, atès que l'embrió és força autònom, medis senzills pel que fa a la composició suportarien bé aquestes primeres divisions.

Avui se sap que l'embrió en l'estadi de zigot majoritàriament usa piruvat com a font energètica principal i lactat en menor grau, mentre que manté molt baix el consum de glucosa i el d'oxigen. Amb l'activació del genoma, en l'estadi de quatre a vuit cèl·lules, i les primeres diferenciacions cel·lulars, els blastòmers cada vegada s'assemblen més a les cèl·lules somàtiques i ajusten més la seva activitat a les condicions ambientals, fins a assolir el moment de la implantació, que depèn completament de la interacció entre l'embrió ecllosionat i el seu entorn, l'endometri (Weima, 1996).

De fet, en estadis precompactació els embrions creixen de la mà del genoma matern, i tenen una única línia cel·lular que consumeix preferentment piruvat i aminoàcids no essencials, amb una baixa activitat biosintètica i també amb baix consum d'O<sub>2</sub>. A mesura que l'embrió es desenvolupa augmenta el consum energètic i la síntesi proteica, de manera que en estadis postcompactació els embrions funcionen amb el seu propi genoma, en dues línies cel·lulars diferents que requereixen glucosa com a font principal d'energia, així com aminoàcids, tant essencials com no essencials, amb una alta activitat biosintètica i un alt consum d'O<sub>2</sub> (per a una revisió, vegeu Gardner i Lane, 2003). Els nutrients que aporta el tracte reproductiu femení haurien de ser un reflex d'aquestes necessitats energètiques variables. Mitjançant tècniques de perfusió s'ha estudiat àmpliament la composició i distribució dels diversos nutrients presents. Hi ha molts treballs publicats que mostren l'enorme complexitat i variació (entre espècies i durant el cicle menstrual) en aquesta composició (per a una revisió, vegeu Aguilar i Reyley, 2005; Tay *et al.*, 1997).

Així, al llarg del trànsit per l'aparell reproductor, l'embrió humà es troba amb nivells decreixents de piruvat i lactat i nivells creixents de glucosa, ja que en les trompes hi ha nivells alts de lactat i piruvat i nivells baixos de glucosa (que les cèl·lules de la granulosa que acompanyen l'embrió metabolitzen a lactat i piruvat), mentre que a l'úter és a l'inrevés.

Malgrat que es coneixia la complexitat de composició del fluids oviductals, el medi anomenat HTF (*human tubal fluid*) es formulà com un medi senzill, amb només electrolïts i amb la glucosa com a font d'energia. Atès que l'absència d'aminoàcids provoca l'endarreriment de l'expressió gènica, les formulacions posteriors d'aquest medi ja n'incorporen.

De totes maneres, afegir aminoàcids a un medi de cultiu no és tan fàcil com sembla, ja que no tots són estables a 37 °C i en la seva descomposició alliberen amoni, un potent agent embriotòxic (Gardner i Lane, 1993) que *in vivo* és constantment metabolitzat, però que en cultiu *in vitro* s'acumula en el medi.

Per lluitar contra l'excés d'amoni hi ha dues opcions: d'una banda, els embrions es poden cultivar en grans volums de medi (0,5-1 ml), que no cal renovar al llarg dels dies de cultiu, però en els quals qualsevol efecte autocrí resultant del creixement dels embrions queda diluït en aquest excés de volum. D'altra banda, els embrions es poden cultivar en gotes de menys volum de medi (20-100 µl), encara que això comporta *a*) cobrir les gotes amb oli mineral o de parafina perquè es mantinguin estables, *b*) allargar el temps que es triga a fer la valoració dels embrions i *c*) canviar periòdicament el medi de cultiu, de manera que en renovar el medi s'extreuen els metabòlits que els embrions mateixos generen amb efecte autocrí.

Potser el sistema de cultiu en gotes amb oli mineral o de parafina és el més estès perquè la capa d'oli ofereix una protecció física que evita que certes micropartícules presents en l'ambient assoleixin el medi, i a la vegada manté estables durant més temps les condicions de CO<sub>2</sub> i de temperatura quan les plaques de cultiu es treuen dels incubadors per observar o manipular els embrions.

Atès que en el seu trànsit al llarg del tracte genital femení els embrions tenen a l'abast només petites quantitats de fluid (microlitres) sobre les quals poden influir abocant-hi factors que ells mateixos produeixen, hi ha la tendència de cultivar els embrions en gotes de poc volum (20-50 µl).

I per tal de contrarestar aquest efecte advers de la dilució dels factors embrionaris



alliberats al medi del cultiu *in vitro*, cada vegada que es renova el medi hi ha la possibilitat, òbvia, d'agrupar quatre o cinc embrions en una mateixa gota de medi. Amb aquesta estratègia s'aconsegueix potenciar l'efecte autocrí i, fins i tot, tenir un cert efecte paracrí, ja que factors que embrions de mal desenvolupament no podrien produir els rebrien dels altres embrions amb els quals comparteixen medi. L'inconvenient d'aquesta estratègia està en la legislació vigent: les directives europees sobre cèl·lules i teixits (Directives UE 2004/23/CE i 2006/17/CE, transposada a l'Estat espanyol pel Reial Decret 1301/2006) exigeixen la completa traçabilitat de les cèl·lules i teixits, incloent-hi les cèl·lules reproductores. Malgrat que, a l'hora d'escriure aquest capítol, l'administració espanyola encara no ha nomenat interlocutors responsables per consultar-los la implementació d'aquesta norma, sembla que els embrions haurien de cultivar-se individualment, tal com mostra la imatge de la figura 3.

De manera similar, si fa uns anys era possible que un centre de reproducció humana assistida (RHA) es fabriqués els seus propis medis de cultiu, amb l'actual legislació hi ha tantes exigències i controls de qualitat que sembla que només sigui rentable la produc-

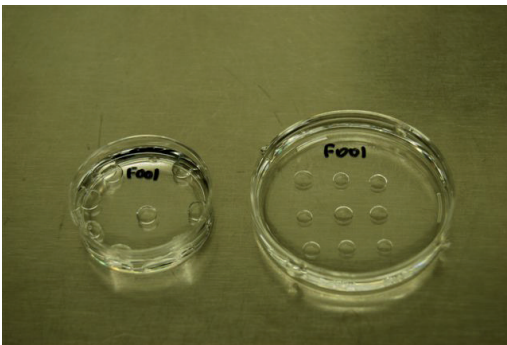


FIGURA 3. Detall que mostra les gotes de medi de cultiu cobertes per l'oli de parafina en placa de Petri, que permeten el cultiu *in vitro* individualitzat.

ció pròpia en quantitats enormes. És per això que pràcticament tots els centres consumeixen medis comercials. Sorprenentment hi ha força variabilitat entre lots, de manera que es recomana establir controls de toxicitat a pesar de tots els controls de qualitat que han de tenir els medis comercials.

Una de les causes de variabilitat dels medis comercials prové de les macromolècules que contenen com a font de proteïnes. Inicialment els medis se suplementaven amb sèrum matern desactivat en concentracions entre el 5 i el 10 %, fet que suposava una càrrega extra de feina amb l'agreujaent d'introduir en el medi molècules no controlades o agents infecciosos. Ara tots els medis comercials incorporen albúmina sèrica humana (HSA, ultrapura o recombinant), o sèrum substitut (SSS), que garanteixen molta més definició en la composició i eviten el risc d'infecció. Els medis de cultiu poden o no incorporar antibiòtics (generalment gentamicina) per prevenir les contaminacions bacterianes.

Per una raó similar, la del risc de contaminació heteròloga, s'han abandonat les estratègies de cocultiu amb cèl·lules VERO (derivades de ronyó de la mona verda) o de l'endometri (derivades d'un grup concret de pacients), que s'havien establert per millorar el desenvolupament embrionari postcompactació, amb la idea que fossin les cèl·lules del cocultiu les que aportessin els factors de creixement que els medis de cultiu no contenen. Avui dia l'únic sistema de cocultiu que es manté utilitza cèl·lules de la pacient mateixa.

Finalment, cap a on han d'evolucionar, en les seves característiques, els medis de cultiu *in vitro* per a embrions humans? Atès que els medis acumulen ROS (radicals lliures derivats de l'oxigen, com  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  i  $OH^-$ , fins i tot provocats per la mateixa llum ambiental) i amoni, però en canvi són deficientes en polipèptids, com els factors de

creixement, sembla que les properes generacions de medis de cultiu seran medis més estables, amb agents antioxidants i macromolècules que promoguin la implantació.

Amb tota aquesta informació s'ha d'afrontar el dilema del cultiu *in vitro*: quin sistema s'escull?

Hi ha dues estratègies: una es fixa en els requeriments nutricionals dels embrions i presenta formulacions diferents per a cada estadi, de manera que els embrions s'han de canviar de medi periòdicament; és el sistema de cultiu en medis seqüencials. L'altra estratègia considera que els embrions disposen de diverses rutes metabòliques i que n'usen una o una altra en funció del seu estadi, de manera que es poden cultivar embrions en un mateix medi de composició complexa des de l'estadi de zigot fins al de blastocist. Hi ha dades a favor i en contra de totes dues estratègies, encara que s'ha de dir que la majoria de centres de RHA usen medis seqüencials.

En les condicions de cultiu *in vitro* apropiades no és necessari eliminar la glucosa de la composició del medi en estadis primers de desenvolupament, però s'ha de combinar amb la presència d'aminoàcids i EDTA (un agent quelant) per suprimir l'activitat glucolítica. Evidentment, la

glucosa és imprescindible en la composició de medis per al cultiu *in vitro* fins a l'estadi de blastocist.

L'elecció del medi de cultiu no es pot considerar com una decisió aïllada en el laboratori de RHA, sinó que s'ha de pensar en tot el sistema de cultiu *in vitro*.

Una decisió important en el sistema de cultiu que s'esculli és la composició gasosa de l'atmosfera en què es cultiven els embrions, i de la qual dependrà el pH del medi i l'aparició o no de ROS. En condicions normals la composició gasosa atmosfèrica té com a elements principals un 78 % de  $N_2$  i el 20 % d' $O_2$ , mentre que la presència d' $O_2$  en el tracte genital femení és escassa, especialment en l'úter. Per això, i per evitar l'aparició de molècules reactives, es proposa el cultiu *in vitro* en atmosferes artificials amb concentracions d' $O_2$  tan baixes com el 5 %. En aquestes condicions s'aconsegueixen blastocists amb moltes més cèl·lules (Gardner i Lane, 2001), però aquest sistema resulta molt costós econòmicament i no està gens estès al nostre país.

En relació amb l'atmosfera de cultiu *in vitro*, també és fonamental establir quina concentració de  $CO_2$  és l'adequada perquè el pH del medi es mantingui a l'entorn de 7,4 (però no més alt d'aquest valor), sobretot si els medis de cultiu triats usen bicarbonat com a tampó. Atès que la ubicació mateixa del laboratori de RHA s'ha de tenir en compte (l'alçada respecte al nivell del mar influeix la pressió gasosa parcial), cada centre ha d'establir els seus estàndards, que de tota manera oscil·laran entre el 5 i el 6,5 % de  $CO_2$ .

Tradicionalment els medis d'elaboració pròpia incorporaven roig de fenol com a indicador de pH. Alguns medis comercials mantenen aquesta substància com una ajuda a l'importantíssim control de pH.

Finalment, s'ha d'establir quina és la temperatura de cultiu adequada (a l'entorn de



FIGURA 4. Pantalla d'un incubador, on s'indiquen les condicions estàndard de cultiu *in vitro*.

37 °C) perquè el medi i els embrions estiguin realment a 37 °C. Tot això en atmosfera humida i foscor. A la figura 4 es mostra la pantalla d'un incubador amb les condicions considerades adequades per al cultiu d'embrions.

Totes aquestes decisions no tenen sentit si no es disposa de prou incubadors per cultivar els embrions generats en els cicles de FIV. Cada vegada que s'obre la porta d'un incubador, les condicions de temperatura, concentració gasosa i humitat prefixades per a aquesta cambra canvien i cal un temps llarg (que depèn de cada marca i del temps que hagi estat obert) per recuperar les condicions d'equilibri. Les recomanacions ASEBIR (2001) sobre la relació incubadors/nombre de casos de FIV indiquen que un centre de RHA hauria de disposar, com a mínim, de dos incubadors, amb una relació d'un incubador per cada tres-cents casos, i amb un màxim de cinc casos alhora per incubador.

En conclusió, no hi ha un sistema universalment acceptat per al cultiu *in vitro* d'embrions humans preimplantacionals, però s'accepta que com més llarg sigui el període de cultiu, més s'han d'ajustar els medis a les necessitats metabòliques dels embrions. I si bé és cert que els embrions humans presenten una plasticitat que els capacita per desenvolupar-se mínimament bé en un ampli ventall de medis i de condicions de cultiu *in vitro*, també és cert que el que es pretén en reproducció humana assistida no és pas un desenvolupament de mínims, sinó el millor desenvolupament amb vista a aconseguir les més altes taxes d'implantació possibles dels embrions transferits.

En aquest sentit, i com a conclusió, cal una visió holística del procés, de manera que l'èxit de les tècniques de reproducció assistida estarà directament lligat a l'avaluació acurada dels embrions cultivats en gotes individuals amb metodologies no in-

vasives que ens permetin caracteritzar de manera fiable la viabilitat de l'embrió, però lògicament també dependrà de la qualitat de l'estimulació ovàrica, ja que d'uns oòcits d'escassa qualitat rarament es derivaran embrions viables i, per descomptat, dependrà de la col·locació atraumàtica i neta de l'embrió seleccionat dins l'úter per part del ginecòleg.

Tots els esforços dedicats a seleccionar l'embrió viable que acabi amb el naixement d'una criatura sana hauran valgut la pena.

## AGRAÏMENTS

És de justícia aprofitar aquestes línies per agrair als companys de la Unitat de Reproducció Assistida de Centre Mèdic Teknon el seu entusiasme, col·laboració i bon humor, trets fonamentals per al bon funcionament de l'equip.

## BIBLIOGRAFIA

- AGUILAR, J.; REYLEY, M. (2005). «The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects». *Anim. Reprod.*, 2: 91-105.
- ALIKANI, M.; CALDERON, G.; TOMKIN, G.; GARRISI, J.; KOKOT, M.; COHEN, J. (2000). «Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in-vitro». *Hum. Reprod.*, 15: 2634-2643.
- ANTCZAK, M.; BLERKOM, J. VAN (1999). «Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains». *Hum. Reprod.*, 14: 429-447.
- ASEBIR (2001). *Cuadernos de embriología clínica. Vol. 1. Recomendaciones sobre recursos humanos y físicos para el laboratorio de RHA*. Madrid: ASEBIR.
- (2008). *Cuadernos de embriología clínica. Vol 2. Criterios ASEBIR de valoración morfológica de oocitos, embriones tempranos y blastocistos humanos*. Madrid: ASEBIR.
- BALABAN, B.; ATA, B.; ISIKLAR, A.; YAKIN, K.; URMAN, B. (2008). «Severe cytoplasmic abnormalities of the

- oocyte decrease cryosurvival and subsequent embryonic development of cryopreserved embryos». *Hum. Reprod.*, 23: 1778-1785.
- BOLETÍN OFICIAL DEL ESTADO (2006). *Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida* (9292).
- (2006). *Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos* (19625).
- BRISON, D. R.; HOUGHTON, F. D.; FALCONER, D.; ROBERTS, S. A.; HAWKHEAD, J.; HUMPHERSON, P. G.; LIEBERMAN, B. A.; LEESE, H. J. (2004). «Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover». *Hum. Reprod.*, 19: 2319-2324.
- CALDERON, G.; PRADOS, N.; CALIGARA, C.; MANTRANA, E.; NAVARRO, J.; PELLICER, A. (2002). «Calidad embrionaria. Indicadores predictivos de vitalidad». A: REMOHÍ, J.; PELLICER, A.; SIMÓN, C.; NAVARRO, J. [ed.]. *Reproducción humana*. 2a ed. Madrid: McGraw-Hill, 463-468.
- DESAI, N.; GOLDSTEIN, J.; ROWLAND, D. Y.; GOLDFARB, J. M. (2000). «Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study». *Hum. Reprod.*, 15: 2190-2196.
- EDWARDS, R. G.; BEARD, H. K. (1997). «Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos». *Hum. Reprod.*, 3: 863-905.
- GARDNER, D. K.; VELLA, P.; LANE, M. (1998). «Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers». *Fertil. Steril.*, 69: 84-88.
- GARDNER, D. K.; LANE, M. (1993). «Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture». *Biol. Reprod.*, 48: 377-385.
- (2001). «Embryo culture». A: GARDNER, D. K.; WEISSMAN, A.; HOWLES, C. M.; SHOHAN, Z. [ed.]. *Textbook of assisted reproductive techniques*. Londres: Martin Dunitz, 203-222.
- (2003). «Metabolic requirements during preimplantation development and the formulation of culture media». A: VEECK, L. L.; ZANINOVIC, N. [ed.]. *An atlas of human blastocysts*. Londres: The Parthenon Publishing Group, 41-60.
- GIANAROLI, L.; MAGLI, M. C.; MUNNE, S.; FIORENTINO, A.; MONTANARO, N.; FERRARETTI, P. (1997). «Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy?». *Hum. Reprod.*, 12: 1762-1767.
- GIANAROLI, L.; PLACHOT, M.; MAGLI, M. C. [ed.]. (2000). *Atlas of embryology. Hum. Reprod.*, 15 (supl. 4).
- HARDARSON, T.; HANSON, C.; SJÖGREN, A.; LUNDIN, K. (2001). «Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation». *Hum. Reprod.*, 16: 313-318.
- HARPER, J.; DELHANTY, J. (2000). «Preimplantation genetic diagnosis». *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 12: 67-72.
- HOUGHTON, F. D.; HAWKHEAD, J. A.; HUMPHERSON, P. G.; HOGG, J. E.; BALEN, A. H.; RUTHERFORD, A. J.; LEESE, H. J. (2002). «Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity». *Hum. Reprod.*, 17: 999-1005.
- LOPES, A. S.; MADSEN, S. E.; RAMSING, N. B.; LØVENDAHL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. (2007). «Investigation of respiration of individual bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro* and correlation with viability following transfer». *Hum. Reprod.*, 22: 558-566.
- LUNDIN, K.; BERGH, C.; HARDARSON, T. (2001). «Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF». *Hum. Reprod.*, 16: 2652-2657.
- MORIWAKI, T.; SUGANUMA, N.; HAYAKAWA, M.; HIBI, H.; KATSUMATA, Y.; OGUCHI, H.; FURUHASHI, M. (2004). «Embryo evaluation by analysing blastomere nuclei». *Hum. Reprod.*, 19: 152-156.
- MUNNE, S.; COHEN, J. (1998). «Chromosome abnormalities in human embryos». *Hum. Reprod. Update*, 4: 842-855.
- PELINCK, M. J.; VOS, M. DE; DEKENS, M.; ELST, J. VAN DER; SUTTER, P. DE; DHONT, M. (1998). «Embryos cultured *in vitro* with multinucleated blastomeres have poor implantation potential in human *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection». *Hum. Reprod.*, 13: 960-963.
- RIJNDERS, P. M.; JANSEN, C. A. M. (1998). «The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection». *Hum. Reprod.*, 13: 2869-2873.
- ROCK, J.; MENKIN, M. F. (1944). «*In vitro* fertilization and cleavage of human ovarian eggs». *Science*, 100: 105-107.
- ROYEN, E. VAN; MANGELSCHOTS, K.; NEUBOURG, D. DE; LAUREYS, I.; RYCKAERT, G.; GERRIS, J. (2001). «Calculating the implantation potential of day 3 embryos in women younger than 38 years of age: a new model». *Hum. Reprod.*, 16: 326-332.
- ROYEN, E. VAN; MANGELSCHOTS, K.; NEUBOURG, K. DE; VALKENBURG, M.; MEERSSCHE, M. VAN DE; RYCKAERT,

- G.; MASTERMINDS, W.; GERRIS, J. (1999). «Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer». *Hum. Reprod.*, 14: 2345-2349.
- SAKKAS, D. (2008) «Objective embryo quality assessment: From morphology to the “omics”». *Hum. Reprod.*, 23(supl. 1): 35.
- SCOTT, L. A.; SMITH, S. (1998). «The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval». *Hum. Reprod.*, 13: 1003-1013.
- SCOTT, L.; ALVERO, R.; LEONDIRES, M.; MILLER, B. (2000) «The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation». *Hum. Reprod.*, 15: 2394-2403.
- SCOTT, L.; DELEGGE, K.; O'LEARY, T.; BERNTSEN, J.; PLOUGSGARD, H.; RAMSING, N. (2007). «Respiration rates of human oocytes are stage specific and correlate with in vitro development: A potential non-invasive selection method». *Hum. Reprod.*, 22(supl. 1): 144-145.
- STEPHENS, P. C.; EDWARDS, R. G.; PURDY, J. M. (1971) «Human blastocysts grown in culture». *Nature*, 229: 132-133.
- TAY, J. I.; RUTHERFORD, A. J.; KILLICK, S. R.; MAGUINNESS, S. D.; PARTRIDGE, R. J.; LEESE, H. J. (1997) «Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents». *Hum. Reprod.*, 12: 2451-2456.
- TESARIK, J.; JUNCA, A. M.; HAZOUT, A.; AUBRIOT, F. X.; NATHAN, C.; COHEN-BACRIE, P.; DUMONT-HASSAN, M. (2000). «Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognised by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology». *Hum. Reprod.*, 15: 1396-1399.
- UNIÓ EUROPEA (2006). *Directiva 2006/17/CE de la Comisión de 8 de febrero de 2006 por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos.*
- VERGOUW, C. G.; BOTROS, L. L.; ROOS, P.; LENS, J. W.; SCHATS, R. P.; HOMPES, G. A.; BURNS, D. H.; LAMBALK, C. B. (2008). «Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection». *Hum. Reprod.*, 23: 1499-1504.
- WEIMA, S. M. (1996) «The culture of embryos». A: BRAS, M.; LENS, J. W.; PIEDERIE, M. H.; RIJNDERS, P. M.; VERVELD, M.; ZEILMAKER, G. H. [ed.]. *IVF lab: Laboratory aspects of in-vitro fertilization*. Amsterdam: NV Organon.