

RAQUEL DI FALCO COSSIELLO

**EFEITO DE QUATRO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA
QUALIDADE MORFOLÓGICA DE ZIGOTOS E EMBRIÕES**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

**Unicamp
2009**

RAQUEL DI FALCO COSSIELLO

**EFEITO DE QUATRO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA
QUALIDADE MORFOLÓGICA DE ZIGOTOS E EMBRIÕES**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

**Unicamp
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C822e Cossiello, Raquel Di Falco
Efeito de quatro diferentes meios de cultura na qualidade
morfológica de zigotos e embriões / Raquel Di Falco Cossiello.
Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Carlos Alberto Petta
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Meio de cultura. 2. Zigoto. 3. Desenvolvimento
embrionário. I. Petta, Carlos Alberto. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês: Morphological differences in human zygotes and embryos cultured in different media

Keywords:

- Culture media
- Zygote
- Embryonic development

Titulação: Mestrado em Tocoginecologia

Área de concentração: Tocoginecologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Alberto Petta
Profª. Drª. Claudia Guilhermino Petersen
Prof. Dr. José Roberto Erbolato Gabiatti

Data da defesa: 31-08-2009

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

C₁
R-1605

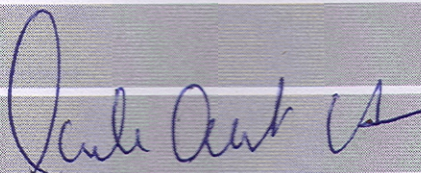
BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: RAQUEL DI FALCO COSSIELLO

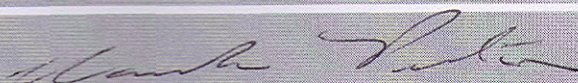
Orientador: Prof. Dr. CARLOS ALBERTO PETTA

Membros:

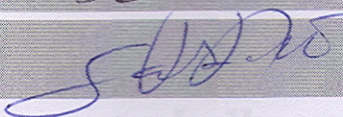
1.



2.



3.



Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 31/08/2009

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais,
por acreditarem sempre em todo meu trabalho...*

*À minha linda avó,
pela presença e infinito apoio durante todos os anos de convivência...*

*Ao meu avô,
pelo exemplo de vida...*

*Ao meu irmão,
por toda experiência compartilhada.*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Petta pela ideia inicial, paciência, dedicação e essenciais ensinamentos ao longo desta jornada.

Ao Dr. Alexandros Aggelis pela paciência, carinho e dedicação indispensável.

Ao Dr. Daniel Faúndes por permitir o desenvolvimento do estudo.

À equipe do Centro de Reprodução Humana de Campinas pelo carinho e disponibilidade na realização deste projeto.

À equipe da Huntington – Medicina Reprodutiva, pelo apoio e compreensão na fase final do estudo, em especial ao José Roberto Alegretti, e ao André Rocha pela disponibilidade em estar presente na correção do artigo.

À Sirlei, pela amizade e infinita paciência na avaliação estatística.

À Adriana, CEMICAMP, pela dedicação e auxílio na busca pelos artigos científicos.

A Deus, por tornar todos os ensinamentos e aprendizados da vida em fases superáveis e executáveis.

*“Cada um de nós compõe a sua história.
Cada ser carrega em si o dom de ser capaz e ser feliz...”*

Almir Sater

Sumário

Resumo	viii
Summary	x
1. Introdução	12
1.1. Meio de cultura	12
1.2. Classificação dos pronúcleos	18
1.3. Qualidade embrionária	20
2. Objetivos	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. Publicação.....	24
4. Conclusões.....	51
5. Referências Bibliográficas.....	52
6. Anexos	57
6.1. Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/Unicamp.....	57

Resumo

Objetivo: comparar os efeitos de quatro diferentes meios de cultura na morfologia dos zigotos e embriões. **Materiais e métodos:** estudo retrospectivo conduzido no Centro de Reprodução Humana de Campinas, em que 2.289 embriões de 319 ciclos de ICSI foram avaliados de setembro de 2006 a setembro de 2008. O protocolo longo foi usado para estimulação ovariana em todos os casos. Todos os oócitos foram cultivados em dois meios diferentes. O meio HTF (Irvine Scientific) foi usado como meio-padrão, enquanto que os meios Universal IVF Medium (Medicult), Global (LifeGlobal) e IVF-30 (Vitrolife) foram usados como secundários. A separação dos oócitos em meios diferentes foi realizada alternadamente após ICSI. A presença e a posição de pronúcleos e Nuclear Precursor Bodies (NPBs) foram checadas 18 a 20 horas após ICSI. Baseado na classificação descrita por Gianaroli et al., os zigotos foram identificados como: (A1) pronúcleos justapostos e centralizados com NPBs grandes e alinhados; (A2) pronúcleos justapostos e centralizados com NPBs grandes e dispersos. Os embriões foram avaliados 44 a 46 horas após ICSI, de acordo com o número de blastômeros, porcentagem de fragmentação e multinucleação. Os embriões considerados *top* apresentaram quatro blastômeros regulares, fragmentação menor que 20% do volume embrionário e blastômeros não multinucleados. Para a análise dos dados foram utilizados

Z-test, *odds ratio* simples e múltiplo através de regressão logística com seu respectivo intervalo de confiança a 95%. **Resultados:** quando a classificação dos zigotos foi analisada, o meio IVF-30 mostrou maior porcentagem (55,2%) de zigotos A1+A2, em relação ao HTF, Global e Universal IVF Medium (49,1%, 44,7% e 44,2%, respectivamente). A porcentagem de embriões *top* foi significativamente maior no meio Global (40,4%) comparado com HTF (21,1%), IVF-30 (25,0%) e Universal IVF Medium (11,1%). No segundo dia de desenvolvimento, Medicult produziu mais embriões com três células em relação aos outros meios que produziram mais embriões com quatro células. **Conclusão:** Houve diferenças significativas entre os quatro meios de cultura sobre a morfologia dos zigotos e a morfologia embrionária. IVF-30 (Vitrolife) resultou em maior número de zigotos com pronúcleos centralizados e nucléolos justapostos e dispersos. Global (LifeGlobal) sustentou maior formação de embriões *top* no dia 2 e maiores taxas de clivagem em relação aos demais meios.

Palavras-chave: meio de cultura, zigoto, desenvolvimento embrionário.

Summary

Objective: compare the effects of four different culture media on the quality of zygotes and embryos. **Methods:** This retrospective study, performed at the Center for Human Reproduction of Campinas-Brazil analyzed 2289 embryos were assessed from September 2006 to September 2008. Long protocol was used for ovarian stimulation in all cases. The oocytes of each patient were cultivated in two different culture media. The medium HTF - Irvine was set as the default for all cycles and IVF Medium - Medicult, GGG 20 - Global and IVF 30 - Vitrolife defined as secondary media. The sibling oocytes were divided in the two culture media after ICSI. The confirmation of fertilization and classification as described by Gianaroli were evaluated 18-20 hours after ICSI. On the second day (day 2) of development, the embryos were evaluated according the number of cells, percentage of fragmentation and number of nuclei. On day 2, the embryos that had four cells with less than 20% of fragmentation and were mononucleated embryos were classified as Top. Z-test and Odds ratios were used for statistical analysis. **Results:** IVF-30 showed a higher percentage (55.2) of zygotes A1 + A2 when compared to HTF, Global and Universal IVF Medium media (49.1%; 44.7%; 44.2% respectively) The percentage of Top embryos was significantly higher in Global medium (40.4%) compared to HTF (21.1%), IVF-30 (25.0%) and Universal IVF medium (11.1%). On day 2 Universal IVF Medium produced

more embryos with three blastomeres when compared to other media that produced more embryos with four blastomeres. **Conclusions:** The use of IVF-30 medium resulted in a higher number of zygotes with centralized pronuclei with juxtaposed or scattered nucleoli. Meanwhile, Global medium produced a greater number of morphologically good embryos (TOP) and higher cleavage rate on the second day of development.

Keywords: culture media, zygote, embryonic development.

1. Introdução

As técnicas de reprodução assistida utilizadas no tratamento da infertilidade conjugal vêm apresentando grande desenvolvimento tecnológico nos últimos anos. O sucesso durante a realização dos procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) depende do aprimoramento das técnicas de alta complexidade e das condições de cultivo oferecidas ao embrião em desenvolvimento (1).

Um dos pilares que possibilitou a evolução da área da reprodução assistida se deve ao conhecimento das necessidades fisiológicas do embrião humano, desde o estágio de zigoto até o estágio mais avançado de desenvolvimento pré-implantacional, o blastocisto. Aliada à essa informação, a busca pela composição das secreções tubárias e uterinas tornou-se importante para a criação de meios de cultura existentes atualmente (2).

1.1. Meio de cultura

O processo de fertilização *in vivo* ocorre na região da ampola do oviduto, onde a partir da união do oócito com espermatozoide, a origem do zigoto torna-se possível. Após essa fusão, o zigoto, em seu primeiro dia de desenvolvimento,

“caminha” pela tuba, a fim de encontrar o útero como ambiente final para o processo de implantação. Durante esse processo, que possui aproximadamente cinco a seis dias de duração, o zigoto passa a ser chamado de embrião, por apresentar características morfológicas e necessidades fisiológicas distintas em relação aos estágios iniciais de desenvolvimento.

Inicialmente, os meios para cultura embrionária tinham a glicose como substrato de energia. Somente após a observação do meio *in natura* foi possível a fabricação comercial de meios de cultura com diferentes fontes energéticas para os diferentes estágios de desenvolvimento.

Uma das primeiras descrições da composição da tuba uterina foi feita em um estudo em que foram coletados fluidos da ampola do oviduto e do útero de mulheres em diferentes estágios do ciclo menstrual. Os resultados mostraram a presença de lactato, glicose e piruvato como fontes de energia, além de diferenças na concentração desses três componentes na tuba e no ambiente uterino (3). Enquanto a concentração de lactato e piruvato é maior na região da ampola comparada à região do útero durante a fase lútea, a concentração de glicose aumenta durante a fase lútea no ambiente uterino (4;5;6).

Da mesma maneira, foi possível observar que durante o desenvolvimento embrionário ocorrem mudanças dinâmicas em seu metabolismo e, que, além de alterações morfológicas, as necessidades fisiológicas dos embriões são diferentes em cada estágio de desenvolvimento. No estágio de zigoto, o embrião está inicialmente quiescente, caracterizado pelo baixo metabolismo e atividade

biossintética (7). Durante essa fase, é predominante a utilização de ácido carboxílico, piruvato e lactato como substratos energéticos, aliados a aminoácidos específicos, como o aspartato (8).

Durante as fases iniciais de desenvolvimento, o metabolismo embrionário é completamente dependente do genoma materno para a geração de ATP e, portanto, o consumo de glicose é restrito a baixos níveis nessa fase (3). Posteriormente, Leese et al (9) mostraram que a necessidade de glicose aumenta nos estágios a partir de oito células em relação ao consumo de lactato e piruvato, assim como a atividade metabólica e o consumo de oxigênio.

Os diferentes componentes dos meios de cultura são essenciais para o desenvolvimento do embrião *in vitro*, oferecendo cada um deles o suporte para a cultura embrionária, sendo os aminoácidos e macromoléculas considerados mais importantes para estágios mais avançados (10).

Apesar da diversidade dos meios disponíveis para o cultivo embrionário, os carboidratos, sais minerais, proteínas, vitaminas, antibióticos, EDTA, aminoácidos e água são componentes para o desenvolvimento *in vitro*, exercendo, cada um deles, sua função na manutenção da cultura do embrião no laboratório.

Os carboidratos, como o piruvato de sódio e lactato de cálcio, são fontes de energia essenciais no início do desenvolvimento embrionário, e a glicose como fonte energética indispensável para os estágios mais avançados de desenvolvimento embrionário. Os sais minerais, como o cálcio, são importantes para a compactação celular, enquanto o sódio atua no controle da osmolaridade.

A albumina é a proteína mais comumente utilizada para absorção de toxinas e regulação da osmolaridade. As vitaminas são importantes por atuar como antioxidantes. Os antibióticos, como gentamicina, penicilina ou estreptomicina fornecem proteção ao embrião durante o período de cultivo. Além desses componentes, o EDTA, caracterizado por ser um agente quelante de metais como cálcio e ferro, atua na diminuição do estresse oxidativo, sendo importante nos estágios iniciais de desenvolvimento (11). Além disso, os aminoácidos presentes no meio de cultura atuam na proliferação e diferenciação celular, principalmente nos estágios mais avançados de desenvolvimento dos embriões.

A utilização de diferentes cultivos embrionários difere nos laboratórios, podendo variar desde cultivos curtos até o segundo dia, a cultivos prolongados até o quinto dia de desenvolvimento (12). Dependendo do sistema de cultivo empregado, um meio de cultura diferente pode ser utilizado. Atualmente, os meios para o cultivo embrionário são classificados como simples, complexos ou sequenciais.

Consideram-se meios simples aqueles que suportam o desenvolvimento embrionário até o terceiro dia, caracterizado principalmente pela ausência de aminoácidos e presença ou ausência de EDTA em sua composição. Por outro lado, meios complexos, que apresentam aminoácidos e ausência de EDTA, permitem o desenvolvimento *in vitro* até o quinto dia (3). Ambos são considerados monofásicos, por não necessitarem de outros meios durante todos os dias de cultivo. Além desses meios, existem os sequenciais, que são destinados a cultivos prolongados. Na realidade, um meio sequencial é composto por dois meios de

cultura com diferentes composições, um para cada fase do desenvolvimento embrionário (13).

Contudo, para cada tipo de cultivo pode ser empregado um meio de cultura diferente; em cultivos curtos, a utilização de meios simples é geralmente empregada, enquanto que para culturas prolongadas usualmente são empregados meios complexos ou sequenciais. Sendo assim, os meios de cultura disponíveis no mercado variam sua composição de acordo com a finalidade de cultivo.

Independentemente do sistema de cultivo ou meio de cultura utilizados, estudos recentes demonstraram que as taxas de gestação não apresentam aumento com a transferência de blastocistos no dia 5, principalmente porque muitos ciclos acabam sendo cancelados por não apresentarem embrião viável (14).

As variações nas composições dos meios parecem não diferir quanto à habilidade de promover o suporte para o desenvolvimento dos embriões. Porém, ainda existe a preocupação em tornar os sistemas de cultivos existentes em cultivos mais complexos, com a finalidade de oferecer o devido suporte ao embrião nas diferentes etapas do desenvolvimento (15). Isso tem levantado alguns questionamentos relacionados à formulação e composição dos meios, bem como a dificuldade de definir a função e importância exata de cada componente para o desenvolvimento embrionário (12;16).

Diante da variedade de meios, a escolha do protocolo de cultivo deve considerar que o sistema empregado nessa etapa necessita proporcionar condições adequadas para as primeiras clivagens, ativação do genoma embrionário e

consequente desenvolvimento embrionário. Além disso, esses sistemas de cultivo permitem a manutenção da fisiologia celular, a regulação da expressão gênica e o controle do desenvolvimento embrionário (17).

Atualmente, os meios de cultura podem ser adquiridos comercialmente ou produzidos em laboratórios de pesquisa. A maioria dos meios adquiridos já se encontra pronto para utilização e tem a vantagem de possuir o controle de qualidade e a segurança necessária para a aplicação das culturas em embriões humanos (18).

Os meios comerciais largamente utilizados no cultivo embrionário são representados no Brasil principalmente pelos laboratórios Irvine, Medicult, LifeGlobal e Vitrolife. Cada laboratório apresenta diferentes meios de cultura que são empregados em sistemas de cultivos distintos, desde cultivos simples a cultivos com meios sequenciais. O principal meio representado pela empresa LifeGlobal, chamado Global, se diferencia por ser um meio complexo, que permite o desenvolvimento embrionário desde o estágio de zigoto até blastocisto. A utilização dos meios da Irvine, Medicult e Vitrolife está baseada no cultivo simples até o terceiro dia de desenvolvimento ou no cultivo com meios sequenciais, caracterizado pela existência de meios com diferentes componentes para cada estágio de desenvolvimento embrionário.

Diante da grande diversidade de meios para o cultivo embrionário disponíveis no mercado, a divergência quanto ao meio de cultura a ser empregado

durante o cultivo *in vitro*, constitui um dos grandes desafios práticos dos laboratórios de reprodução assistida.

Paralelamente ao protocolo escolhido para a cultura do embrião, a estimulação ovariana e os demais procedimentos que ocorrem no laboratório da embriologia são elementos de grande importância que influenciam na eficácia do método de fertilização *in vitro*.

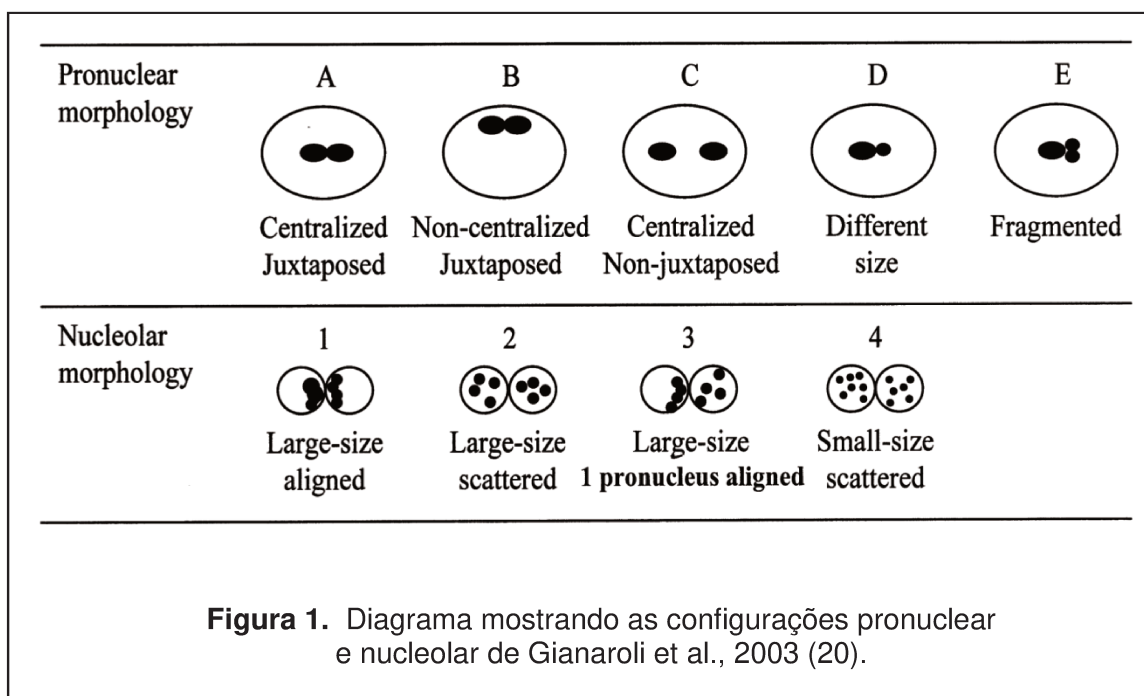
Atualmente, os parâmetros empregados para avaliar a qualidade embrionária são embasados na análise morfológica dos embriões desde o estágio de zigoto até estágios mais avançados de desenvolvimento (19). A produção de embriões com boa qualidade morfológica pode ser, em parte, atribuída à eficácia do meio de cultura, podendo ser um excelente critério para avaliação dos meios utilizados.

1.2. Classificação dos pronúcleos

Após a fusão do espermatozoide com o oócito, ocorre a ativação oocitária, evenciada pela retomada da meiose e extrusão do segundo corpúsculo polar. A partir dessa fase, forma-se então o pronúcleo masculino, oriundo da descondensação do DNA espermático, seguido pela formação do pronúcleo feminino localizado próximo ao corpúsculo polar. Os dois pronúcleos, inicialmente com tamanhos distintos e compostos por *nuclear precursor bodies* (NPBs) movem-se no interior do oócito durante o processo de fertilização. Sendo assim, a aparência e a localização dos pronúcleos no interior do oócito e a migração dos NPBs que compõem os pronúcleos (PN) podem ser observadas e avaliadas em

diferentes momentos até aproximadamente 25 horas após a ICSI (20). Estudos prévios mostraram a importância da utilização de escores embasados na morfologia dos PN e NPBs diante do desenvolvimento embrionário e potencial de implantação (21;22;23). Esses estudos sugeriram que a disposição dos pronúcleos pode variar dependendo da constituição cromossômica dos zigotos (24).

Através de um estudo baseado nesses princípios, Gianaroli et al., 2003 propuseram uma classificação de acordo com as configurações das morfologias pronuclear e nucleolar (20). Cinco padrões de pronúcleos foram estabelecidos: (A) justapostos e centralizados, (B) justapostos e periféricos, (C) centralizados e separados, (D) diferentes tamanhos, (E) fragmentados. A morfologia nucleolar foi avaliada de acordo com a posição e o número dos NPBs: (1) grandes e alinhados, (2) grandes e dispersos, (3) grandes, alinhados em somente um dos pronúcleos, (4) pequenos e espalhados (Figura 1).



Devido à baixa frequência dos formatos B, C, D e E foram avaliados somente os embriões derivados de zigotos com pronúcleo A, observando que os padrões A1 e A2 apresentaram maior probabilidade de resultar em embriões euploides (42% e 40% respectivamente) (20).

1.3. Qualidade embrionária

Uma das etapas mais intrigantes dos laboratórios de fertilização *in vitro* é a escolha dos embriões com maior potencial de implantação, com a finalidade de reduzir o número de embriões a serem transferidos e mesmo assim manter taxas adequadas de gravidez, mas com menor risco de gestação múltipla.

Historicamente, a avaliação morfológica foi o método preliminar usado para a avaliação do embrião (25;26) e, apesar de suas limitações reconhecidas (27), o método ainda permanece como a abordagem mais usual para seleção. Sendo assim, diversas características embrionárias, além da avaliação dos pronúcleos nos zigotos, têm sido consideradas para decidir a escolha do embrião para transferência.

A primeira delas está baseada na velocidade de clivagem dos embriões, que, quando muito rápida ou muito lenta, representa um impacto negativo na taxa de implantação (28;29). Outra avaliação é a divisão celular, que quando inicialmente apresenta-se irregular, produz embrião com dois blastômeros de tamanhos desiguais ou fragmentados, o que acaba por apresentar um efeito negativo na capacidade de desenvolvimento embrionário (30;31). A presença

de blastômeros multinucleados, que ocorre entre 11,9% a 33,6%, geralmente está associada à formação de embriões com alterações cromossômicas e à diminuição na capacidade de formação de blastocistos (32;33), embora existam relatos de bebês saudáveis nascidos a partir desses embriões (34). Além disso, a porcentagem de fragmentação é relatada como tendo um valor importante na previsão do potencial de implantação do embrião (35).

Observa-se uma grande proporção de embriões humanos pré-implantacionais que sofrem desvios de desenvolvimento *in vitro*, deixando de seguir a rotina de desenvolvimento normal e frequentemente exibindo altos níveis de fragmentação e assimetria dos blastômeros.

A fragmentação é um achado comum que limita o desenvolvimento *in vitro* do embrião. Uma das influências negativas da fragmentação na qualidade do embrião é que esses fragmentos impediriam o perfeito contato espacial entre os blastômeros, levando à compactação, cavitação e formação de blastocistos anormais. Esses fragmentos poderiam provocar uma degeneração secundária devido à presença de detritos celulares próximos aos blastômeros sadios (36). Os fragmentos celulares contêm, além do citoplasma, organelas citoplasmáticas intactas, e ocasionalmente, parte de cromatina condensada. Esses fragmentos podem ser uma consequência de morte celular programada em estádios precoces de desenvolvimento embrionário, com efeitos prejudiciais que podem levar à morte celular em alguns blastômeros, ou, em alguns casos, à morte ou parada do desenvolvimento embrionário (37).

A fragmentação - eliminação de parte dos blastômeros pelo embrião - parece ser um esforço deste em restaurar ou manter a viabilidade quando certas anomalias afetam algum blastômero em particular. Essa eliminação precoce de células afetadas previne uma contribuição alterada dessas células para a massa celular interna ou o trofoectoderma do blastocisto (38).

Diante dos dados conflitantes relacionados ao dia ideal para a transferência embrionária, o cultivo pode variar do segundo ao quinto dia de desenvolvimento (39). Sendo assim, o embrião será avaliado quanto à sua morfologia nos diferentes dias de desenvolvimento.

Rotineiramente, após a realização das avaliações morfológicas em diferentes estágios do desenvolvimento, os embriões que apresentarem pronúcleos centrais com NPB alinhados ou dispersos, tempo de clivagem compatível ao dia de desenvolvimento, blastômeros regulares e menos de 20% de fragmentação, serão eleitos para transferência uterina (19).

Quando a morfologia embrionária é avaliada no segundo dia de desenvolvimento, os embriões de melhor qualidade morfológica, classificados como *top*, devem apresentar quatro blastômeros regulares, fragmentação menor que 20% do volume embrionário e blastômeros não multinucleados (19).

Sendo a morfologia um dos critérios usualmente estabelecidos para a classificação dos zigotos e embriões, a preocupação em oferecer condições ideais de cultivo embrionário com a finalidade de obter embriões *top* no dia da transferência, instiga a embriologia a buscar melhores protocolos de cultivo.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar os efeitos de quatro meios de cultura diferentes na qualidade dos zigotos e na formação de embriões de boa qualidade morfológica (embriões *top*).

2.2. Objetivos específicos

- Comparar a qualidade dos zigotos através da classificação dos pronúcleos estabelecida por Gianaroli et al., 2003 (20) nos quatro meios de cultura diferentes.
- Comparar o número de embriões de boa qualidade morfológica (embriões *top*) obtidos nos quatro meios de cultura diferentes.
- Definir qual meio de cultura produz melhores embriões de acordo com a classificação morfológica.

3. Publicação

Thank you for submitting your article to Reproductive BioMedicine Online entitled: Morphological differences in human zygotes and embryos cultured in different media.

Abstract:

Objective: To compare the effects of four culture media on the quality of zygotes and embryos. **Methods:** Retrospective study analyzing 2,289 embryos cultivated in two different culture media: HTF, the default medium, with Universal IVF, LGGG-20 and IVF-30 as the secondary media. The sibling oocytes were divided between the two culture media following ICSI. Fertilization and classification were confirmed 18-20 hours after ICSI. On day 2, embryos were evaluated according to the number of cells, percentage of fragmentation and number of nuclei. Z-test and odds ratios were used in the statistical analysis. **Results:** There was a higher percentage (55.2%) of class A1+A2 zygotes with IVF-30 compared to HTF, Global or Universal IVF media (49.1%, 44.7% and 44.2%, respectively). The percentage of Top embryos was significantly higher with Global (40.4%) compared to HTF (21.1%), IVF-30 (25.0%) or Universal IVF media (11.1%). On day 2, Universal IVF produced more embryos with three blastomeres compared to the other media, which produced more embryos with four blastomeres. **Conclusions:** Use of IVF-30 resulted in more zygotes with centralized pronuclei and juxtaposed or scattered nucleoli. Nonetheless, Global medium produced more Top embryos and higher cleavage rate on the second day of development.

Keywords:

culture media, pronuclei, embryo quality

Authors:

MSc Raquel Cossello (Universidade Estadual de Campinas)
embriologist, develop protocol, data collection. interpretation of results,
preparation of manuscript

PhD Alexandros Aggelis (Centro de Reprodução Humana de Campinas)
embriologist, interpretation of results, preparation of manuscript

MD, PhD Daniel Faúndes (Centro de Reprodução Humana de Campinas)
Reproductive endocrinologist, interpretation of results, preparation of manuscript

MD, PhD Carlos Alberto Petta (Universidade Estadual de Campinas, Centro de
Reprodução Humana de Campinas)

Reproductive endocrinologist, developed protocol, data collection, interpretation of results, preparation of manuscript

Submitted by: cpetta@attglobal.net

Your submission will now be processed and you will be contacted by RBMOnline in due course.

Yours sincerely,
RBMOnline

--

Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK
<http://www.rbmonline.com>
Tel. +44 (0) 1954 781812; Fax. +44 (0) 1954 781816

Morphological differences in human zygotes and embryos cultured in different media

Raquel Di Falco Cossello¹, Alexandros Aggelis¹, Daniel Faúndes¹, Carlos A. Petta^{1,2}

¹ Campinas Center of Human Reproduction, Campinas, São Paulo, Brazil.

² Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

Correspondence to:

Carlos A. Petta MD

Rua Eduardo Lane 380

13073-002 Campinas SP, Brazil.

E-mail: cpetta@attglobal.net

Abstract

Objective: To compare the effects of four culture media on the quality of zygotes and embryos. **Methods:** Retrospective study analyzing 2,289 embryos cultivated in two different culture media: HTF, the default medium, with Universal IVF, LGGG-20 and IVF-30 as the secondary media. The sibling oocytes were divided between the two culture media following ICSI. Fertilization and classification were confirmed 18-20 hours after ICSI. On day 2, embryos were evaluated according to the number of cells, percentage of fragmentation and number of nuclei. Z-test and odds ratios were used in the statistical analysis. **Results:** There was a higher percentage (55.2%) of class A1+A2 zygotes with IVF-30 compared to HTF, Global or Universal IVF media (49.1%, 44.7% and 44.2%, respectively). The percentage of Top embryos was significantly higher with Global (40.4%) compared to HTF (21.1%), IVF-30 (25.0%) or Universal IVF media (11.1%). On day 2, Universal IVF produced more embryos with three blastomeres compared to the other media, which produced more embryos with four blastomeres. **Conclusions:** Use of IVF-30 resulted in more zygotes with centralized pronuclei and juxtaposed or scattered nucleoli. Nonetheless, Global medium produced more Top embryos and higher cleavage rate on the second day of development.

Keywords: culture media; pronuclear stage; embryonic development.

Summary

Embryo culture is an important step in *in vitro* fertilization. The objective of this study was to compare the effects of four culture media on the quality of zygotes and embryos.

Methods: A retrospective study analyzed 2,289 embryos cultivated in two different culture media: HTF, the default medium, with Universal IVF , LGGG-20 and IVF-30 as the secondary media. The sibling oocytes were divided between the two culture media following ICSI. Fertilization and classification were confirmed 18-20 hours after ICSI. On day 2, embryos were evaluated according to the number of cells, percentage of fragmentation and number of nuclei. Z-test and odds ratios were used in the statistical analysis. Morphologic classification is used to identify better embryos and consequently those that theoretically have a higher chance of resulting in pregnancy. **Results:** There was a higher percentage (55.2%) of class A1+A2 zygotes with IVF-30 compared to HTF, Global or Universal IVF media (49.1%, 44.7% and 44.2%, respectively). The percentage of Top embryos was significantly higher with Global (40.4%) compared to HTF (21.1%), IVF-30 (25.0%) or Universal IVF media (11.1%). On day 2, Universal IVF produced more embryos with three blastomeres compared to the other media, which produced more embryos with four blastomeres. **Conclusions:** Use of IVF-30 resulted in more zygotes with centralized pronuclei and juxtaposed or scattered nucleoli. Nonetheless, Global medium produced more Top embryos and higher cleavage rate on the second day of development. Top embryos are considered the best embryos based on their morphological classification.

Introduction

Since the advent of *in vitro* fertilization (IVF), a large number of different media formulations and culture systems have been proposed for the development of human zygotes and embryos. Culture media range from simple balanced saline solutions to more complex media. Simple culture media were used in assisted reproductive technology (ART) until the mid-1990s. These media, consisting basically of saline solutions, glucose, pyruvate, lactate and carbohydrates supplemented with protein, were effective for culture up to the third day of development. However, the introduction of more complex media (Fissore *et al.*, 1989) containing amino acids presented new alternatives for *in vitro* culture.

The capacity to simulate natural conditions in the laboratory became fundamental, since the culture of embryos in suboptimal or distressing conditions compels the embryo to undergo physiological adaptations. The features presented by embryos thus affected include delayed cell division (Bowman, 1970), poorer incorporation of amino acids (Jung *et al.*, 1987), a reduction in oxidative metabolism and an increase in lactate production (Gardner, 1990; Gott *et al.*, 1990; Leese *et al.*, 1993). Such factors may lead to consequences that include low pregnancy rates, significantly greater fetal loss (Lane, 2007) and low birth weight (Pool, 2005).

Several mechanisms are involved in the development process from oocyte retrieval until embryo transfer to the uterus, with modifications occurring at each stage; however, the embryologist is able to observe and analyze only a few of these steps, one of these being embryo development.

In IVF laboratories, the parameters generally used to evaluate embryo quality and consequently the effectiveness of the culture media are based on analysis of the morphologic criteria between days 1 and 5 following fertilization.

For analyses on day 1, embryo pronuclear (PN) classification and morphology represent important variables for assessing different culture media. Evaluation of the pronucleated zygote is based on analysis of the morphology and position of the pronuclei. Alterations in the appearance or numbers of nuclear precursor bodies (NPBs) (Tesarik, 1989) may cause abnormalities in embryo division and lead to uneven cleavage or fragmentation. Based on these considerations, the morphology of the pronuclei and NPBs has been proposed as a scoring system and a correlation has been suggested between the different patterns observed, embryo development and implantation potential (Montag, 2001).

On day 2 and 3 of development, embryos are graded according to blastomere morphology, cleavage stage and fragmentation, and there appears to be a clear relationship between these parameters and implantation and pregnancy rates after IVF. This procedure can also be used to select the best embryos and test the effectiveness of culture media (Ziebe *et al.*, 1997).

The aim of this study was to assess and compare the effects of four different culture media on human zygote and embryo morphology on day 2 of culture.

Material and methods

This retrospective study was conducted at the Human Reproduction Center, Campinas, Brazil, where 2,289 embryos were assessed between September 2006 and September 2008 in 319 ICSI cycles. The exclusion criteria consisted of embryos obtained from spermatozoa that were recovered using testicular or epididymal aspiration. The study was approved by the Institutional Review Board of the University of Campinas (UNICAMP). All patients were informed with respect to the laboratory procedures to which they would be submitted and signed an informed consent form prior to the initiation of treatment.

Ovulation induction and oocyte recovery

Ovarian stimulation was initiated following pituitary blockade by leuprolide acetate (Lupron, TAP Pharmaceutical, Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA), 0.15 mL/day, beginning on the 21st or 23rd day of the menstrual cycle and maintained until the beginning of the following cycle. On the 3rd day of bleeding, leuprolide was reduced to 0.05 mL/day and ovarian stimulation was initiated with recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) (Gonal F, Serono, São Paulo, SP, Brazil) at a dose of 150-225 IU/day, or highly purified human menopausal gonadotropin (hphMG) (Menopur, Ferring, São Paulo, SP, Brazil) at a dose of 75-225 IU/day. Follicular development was monitored by transvaginal ultrasonography and the dose of medication was adjusted according to ovarian response.

When at least 2 follicles ≥ 18 mm in diameter were observed, a single dose of recombinant human chorionic gonadotropin (r-hCG, 250 μ g, Ovidrel, Serono, São Paulo, SP, Brazil) was given. Oocytes were aspirated 34-36 hours after injection of r-hCG. The oocytes were separated from the follicular fluid under a stereoscope and washed in a modified HTF medium with Hepes (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), supplemented with 10% synthetic serum substitute (SSS - Irvine Scientific). All the oocytes were placed in HTF medium (Irvine Scientific) supplemented with 10% SSS and incubated at 37°C in 5% CO₂.

The cumulus oophorus cells were removed by exposing them to hyaluronidase (H-4272, Sigma, Saint Louis, Missouri) at a concentration of 80 IU/mL in modified HTF medium with Hepes, supplemented with 10% SSS, for 30 seconds. The cells were removed with the use of fine hand-drawn glass pipettes. After denudation, the oocytes were washed with HTF culture medium supplemented with 10% SSS and incubated until ICSI was performed (Palermo *et al.*, 1992).

Sperm collection

Semen samples were collected by masturbation immediately after oocyte pickup, evaluated in a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) and then processed through a discontinuous density gradient (Isolate Lower / Isolate Upper, Irvine Scientific) in accordance with the manufacturer's protocol.

In vitro fertilization and embryo culture

All sibling oocytes were cultured in two different media: Human Tubal Fluid (HTF [Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA]), which was used as the default medium for all the patients, and one of the secondary media (Universal IVF Medium [Medicult, Denmark]; LGGG Global [LifeGlobal, Guelph, ON, Canada]; or IVF-30 [Vitrolife, CO, USA]). The secondary media used in each case were determined by local availability.

Following ICSI, the oocytes were separated into the different media. Injected oocytes were transferred alternately to HTF medium or to one of the secondary media until all presumed zygotes were divided between two types of media. Embryo culture conditions were 37°C with 5% CO₂ to maintain pH within an optimal range (7.20-7.40) according to the manufacturers' instructions.

Assessment of zygotes

An inverted microscope equipped with Hoffman modulation optics was used to check for the presence of pronuclei and the position of NPBs 18-20 hours after ICSI. Based on the classification established by Gianaroli *et al.* (2003), the zygotes were found to be juxtaposed with large centralized pronuclei and aligned NPBs, classified as "A1", or juxtaposed with centralized pronuclei and large, scattered NPBs, classified as "A2" (Figure 1). After fertilization was verified and pronuclei classified, the zygotes were transferred to fresh drops of culture media.

Embryo Quality

The individually cultured embryos were evaluated 44–46 hours after ICSI on the basis of the number of blastomeres, percentage of fragmentation and presence of multinucleated blastomeres. Embryos were considered to be of top quality (Top) when they had four regular blastomeres, fragmentation in less than 20% of the volume of the embryo and no multinucleated blastomeres (Guerif *et al.*, 2007).

Statistical analysis

Quantitative data were assessed for normality and homoscedasticity using the Kolmogorov-Smirnov and F-tests, respectively. The number of mature oocytes (MII) was compared using analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test for means. The number of blastomeres of the embryos on day 2 was evaluated using the Kruskal-Wallis test followed by a group by group comparison using the Mann-Whitney test. Frequencies of zygotes with A1 and A2 pronuclear morphology and embryos with top quality morphology in each group were compared using the Z-test for two proportions. Parametric data were presented as means $\pm$ standard deviations (SD) and non-parametric data were presented as medians and ranges. The Bonferroni correction was used to determine statistically significant differences and significance was defined at $p < 0.008$.

Results

There was no difference in the age of the woman between the cycles in which the embryos were cultured in different media nor was there any difference in the number of mature oocytes (MII) between cycles (Table I).

A total of 2,289 embryos were included in the analysis: 1,170 were cultivated in HTF medium; 199 in Global medium; 260 in Universal IVF medium; and 660 in IVF-30 medium. When both the pronuclei and the position of the NPBs were taken into consideration, the percentage of A1 + A2 zygotes was found to be higher with the IVF-30 medium. The frequency of the A1 + A2 pattern was 55.2% in zygotes cultured in IVF-30 medium compared to 49.1%, 44.7% and 44.2% in HTF, Global and Universal IVF media, respectively. The results found with IVF-30 were significantly higher when compared with those of the other media; however, the differences between the Global, HTF and Universal IVF media were not statistically significant (Table II).

When the number of blastomeres was compared after two days of culture, the HTF, Global and IVF-30 media produced more 4-cell embryos, while Universal IVF medium produced more 3-cell embryos. In embryos cultivated in Global medium, the variation in blastomere numbers on day 2 was less than that found with embryos cultivated in HTF or IVF-30 media, in which there were a significant number of embryos with fewer than four cells (Figure 2).

The presence of Top embryos was evaluated in all the different media between 44 and 46 hours after ICSI. The percentage of embryos with four regular blastomeres, fragmentation in less than 20% of the volume of the embryo and no multinucleated

blastomeres was significantly higher in Global medium (40.4%) compared with HTF (21.1%), IVF-30 (25.0%) or Universal IVF media (11.1%) (Table III).

Discussion

In this study, use of the IVF-30 medium resulted in good morphology in a substantial number of zygotes on day one; however, embryo morphology was found to be better when the embryos were cultivated in Global medium. When the pronuclear and nucleolar parameters were analyzed, Universal IVF medium was found to be associated with fewer zygotes with good (A1+A2) PN morphology (44.2%) compared to the other culture media, and with fewer top quality day-2 embryos. This finding confirms that these parameters should be analyzed together and not individually.

Our results are in agreement with previous studies showing that pronuclear morphology was not directly associated with embryo quality on day 2 (James *et al.*, 2006). Although the IVF-30 culture medium produced a high number of zygotes with good (A1+A2) PN morphology (55.2%), the number of good quality embryos produced with this medium was low. On the other hand, Global medium produced the highest percentage (40.4%) of good quality embryos on day 2; however, this medium produced fewer good PN on day one. Universal IVF medium produced the smallest percentage of good quality embryos compared to the other culture media used in this study; nevertheless, there were no differences in the percentage of good PN obtained with this medium compared to the HTF and Global media. With respect to the formation of zygotes with A1+A2 pronuclear patterns, no difference was found between the HTF medium and the Global and Universal IVF media, and when the production of good

quality embryos was compared, results achieved with the HTF medium were found to be similar to those obtained with the IVF-30 medium.

The correlation between zygote and embryo morphology has already been demonstrated (Scott *et al.*, 1998; Tesarik *et al.*, 1999; Ludwig *et al.*, 2000; Scott *et al.*, 2000); however, this correlation was not linear, suggesting that some degree of predictability is lost when considering either zygote or embryo morphology alone (Rijnders *et al.*, 1998). One study compared the predictive value of different morphological parameters using a score system for human zygotes and preimplantation embryos and showed that zygote and embryo morphology were independent variables predictive of IVF outcome, and that both may be used as criteria to select the best embryos for transfer (De Placido *et al.*, 2002).

Nowadays, most IVF laboratories select the best embryo according to embryo morphology parameters on the day of transfer. However, there are additional criteria that may be used to select the best embryo such as evaluation of the pronuclear morphology, NPB size and distribution, cytoplasmic halo and early cleavage (Rienzi *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007). It is important to determine the pronuclear and NPB morphology of zygotes on day one and embryo quality on day two of development, since this represents a non-invasive instrument for performing a quick, precise and reproducible analysis that does not interfere with the daily clinical work of the IVF laboratory (Gianaroli *et al.*, 2003).

The development of good-quality embryos was shown to be related to the pronuclear pattern and was better in the case of zygotes with centralized, juxtaposed pronuclei (pattern A, 96%) compared with the other patterns. Moreover, embryo development was similar in the four patterns of zygotes, whereas chromosomal condition varied depending on nuclear morphology (Gianaroli *et al.*, 2003).

Differences found in the composition of the culture media may explain the variation in Top embryo formation. Global medium was the only monoculture medium used in this study. The formulation used in Global medium is capable of supporting embryo development from pronuclear formation to blastocyst stage. The addition of amino acids is the principal difference between Global medium and the other simple media used in the present study. This feature may explain the higher formation of top quality embryos found with this medium. Previous studies have confirmed that the addition of amino acids to culture media enhances embryo development, while when mouse zygotes were exposed to medium without amino acids their subsequent potential for development was impaired (Gardner *et al.*, 1996; Lane *et al.*, 2007).

The addition of EDTA is another characteristic that differentiates some media from others used in the present study. The beneficial effects of EDTA are confined to the early cleavage stage embryo (Gardner *et al.*, 1996). Of all the media used in this study, only IVF-30 contained EDTA in its composition and this may explain the difference in the location and distribution of the pronuclei and NPBs. It has already been shown that human zygote pronuclei are formed in different locations in the oocyte, both migrating towards the center through time. During this movement, cytoplasmic rotation and cytoskeleton structures are probably involved, possibly coordinated by calcium levels. The presence of EDTA in the culture medium may affect the efficiency of the migration of the pronuclei and result in different pronuclear patterns in the zygotes.

In the present study, Global medium produced more top quality embryos (40.4%) with four regular blastomeres, fragmentation of less than 20% of the embryo and no multinucleated blastomeres. This was followed by IVF-30 (25.0%), HTF (21.2%) and

Universal IVF (11.1%) media according to the morphological analysis of the embryo on the second day of development.

Several studies comparing different commercial culture media for IVF have been published in the literature. Xella *et al.* (2009) showed that IMS1 (Medicult) culture medium appears to improve the performance of embryonic growth and development and increase pregnancy rates when compared to Universal IVF medium (Medicult). One study compared four media and found better embryo quality with Global medium rather than with Cleavage medium, HTF or G1.2 (Aoki *et al.*, 2005). However, no differences were found in day-2 embryo score or pregnancy, implantation or abortion rates between the P-1 and IVF-50 media (Mauri *et al.*, 2001) or in the implantation rates achieved with the different media (Zollner *et al.*, 2004).

This comparison between different media for the culture of sibling oocytes has proven to constitute a valuable tool for the assessment of embryo quality. Traditional studies comparing culture media have evaluated different patients; however, in the present study the same patient received transferred embryos that had been cultivated in different media. Nevertheless, the assessment of implantation and pregnancy rates is problematic due to a high frequency of “mixed” transfers, resulting in a reduced number of cases in which the embryos transferred were grown exclusively in one type of medium.

Zygote score is a good predictor of embryo quality, but should be used in combination with the evaluation of embryo morphology on the day of transfer. A1 + A2 zygote morphology is associated with chromosomally normal embryos; however, not all chromosomally normal embryos are morphologically normal as well. Top embryos cannot have blastomeres with more than one nucleus or a high percentage of

fragmentation, and these characteristics are not directly dependent on pronuclear morphology (Gianaroli *et al.*, 2007).

One of the principal strengths of the present study is that it is entirely independent, having received no financial support from any of the manufacturers of the different types of media. The experience described here of a single clinic in which two types of culture medium were used concurrently in each cycle may help other services decide which media should be used and also stimulate them to implement this strategy to prevent the unlikely but feasible occurrence that an alteration in one of the media could compromise the whole treatment. Nevertheless, not being able to establish a correlation between the different culture media and pregnancy rate constitutes a limitation to this study. This limitation, however, was unavoidable, since each patient received embryos from different culture media.

In conclusion, the present data show significant differences between the four culture media with respect to pronuclear, NPB and embryo morphology. The use of IVF-30 medium resulted in a higher number of zygotes with centralized pronuclei and juxtaposed or scattered nucleoli, while Global culture medium resulted in the formation of more top quality embryos on day 2 of development. In addition, cleavage rates were lower with the HTF, Universal IVF and IVF-30 media compared to Global medium. More studies with larger sample sizes are needed to permit evaluation of implantation and pregnancy rates following the culture of sibling embryos in different media.

References

- Aoki VW, Wilcox AL, Peterson CM *et al.* 2005 Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reprod Biomed Online* **10**, 600-606.
- Bowman P, McLaren A 1970 Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *J Embryol Exp Morphol* **24**, 203-207.
- De Placido G, Wilding M, Strina I *et al.* 2002 High outcome predictability after IVF using a combined score for zygote and embryo morphology and growth rate. *Hum Reprod* **17**, 2402-2409.
- Fissore RA, Jackson KV, Kiessling AA 1989 Mouse zygote development in culture medium without protein in the presence ethylenediaminetetraacetic acid. *Biol Reprod* **41**, 835-841.
- Gardner DK, 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. *Hum Reprod* **11**, 2703-2712.
- Gardner DK, Leese HJ 1990 Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* **88**, 361-368.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP *et al.* 2003 Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril* **80**, 341-349.
- Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP *et al.* 2007 Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and chromosomal complement. *Hum Reprod* **22**, 241-249.

- Gott AL, Hardy K, Winston RM *et al.* 1990 The nutrition and environment of early human embryos. *Proc Nutr Sci* **49**, Abstract 2A.
- Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B *et al.* 2007 Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: A prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod* **22**, 1973–1981.
- James AN, Hennessy S, Reggio B *et al.* 2006 The limited importance of pronuclear scoring of human zygotes. *Hum Reprod* **21**, 1599-1604.
- Jung T, Fischer B, Beier HM 1987 Quantitative aspects of protein synthesis in non-cultured and cultured rabbit blastocysts. *Hum Reprod* **2**, 23-27.
- Lane M, Gardner DK 2007 Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* **21**, 83-100.
- Leese HJ, Conaghan J, Martin KL *et al.* 1993 Early human embryo metabolism. *Bioessays* **15**, 259-264.
- Ludwig M, Schöpfer B, Al-Hasani S *et al.* 2000 Clinical use of a pronuclear stage score following intracytoplasmic sperm injection: impact on pregnancy rates under the conditions of the German embryo protection law. *Hum Reprod* **15**, 325–329.
- Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL *et al.* A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. *J Assist Reprod Genet* **18**, 378-381.
- Montag M, van der Ven H; German Pronuclear Morphology Study Group 2001 Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicenter study. *Hum Reprod* **16**, 2384–2389.

Palermo G, Joris H, Devroey P et al. 1992 Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**, 17-18.

Pool TB 2005 An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance and safety. *Semin Reprod Med* **23**, 309-318.

Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M et al. 2005 Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online* **10**, 669-681.

Rijnders PM, Jansen CA 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.

Scott L, Alvero R, Leondires M et al. 2000 The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* **15**, 2394-2403.

Scott L, Finn A, O'Leary T et al. 2007 Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum Reprod* **22**, 230-240.

Scott LA, Smith S 1998 The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* **13**, 1003-1013.

Tesarik J, Greco E 1999 The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* **14**, 1318-1323.

Tesarik J, Kopecny V 1989 Development of human male pronucleus: ultrastructure and timing. *Gamete Res* **24**, 135–149.

Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D *et al.* 2009 Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril* Correct proof.

Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S *et al.* 1997 Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* **12**, 1545-1549.

Zollner KP, Zollner U, Schneider M *et al.* 2004 Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit* **10**, CR1-7.

Figure Legends:

Figure 1. Diagram showing the configurations that identify pronuclear morphology and NPB morphology. Adapted from Gianaroli *et al*, 2003 (with permission).

Figure 2. Boxplot showing the variation in the number of blastomeres between the HTF, Global, IVF-30 and Universal IVF media.

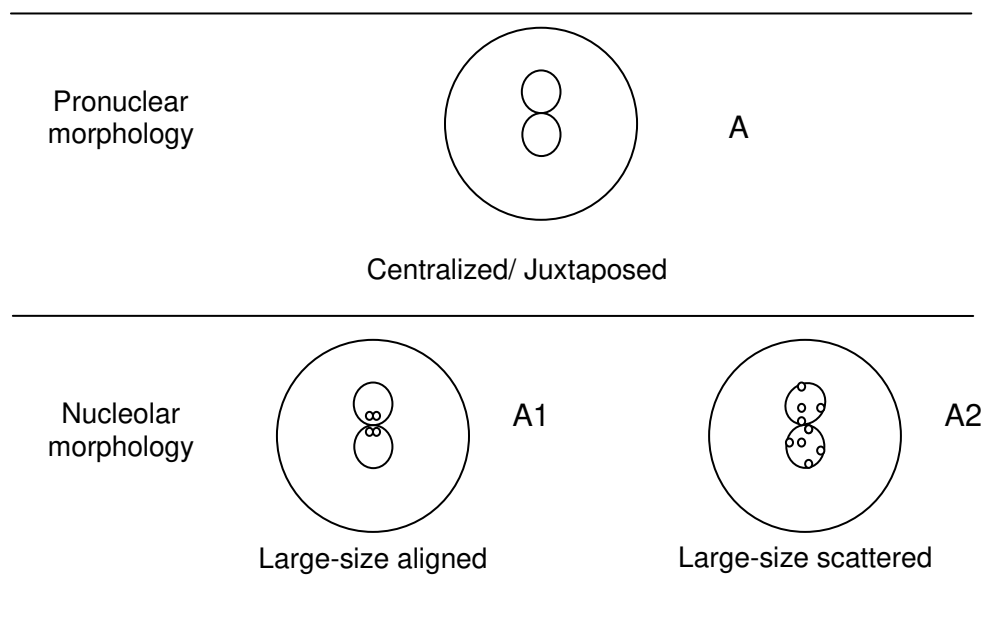
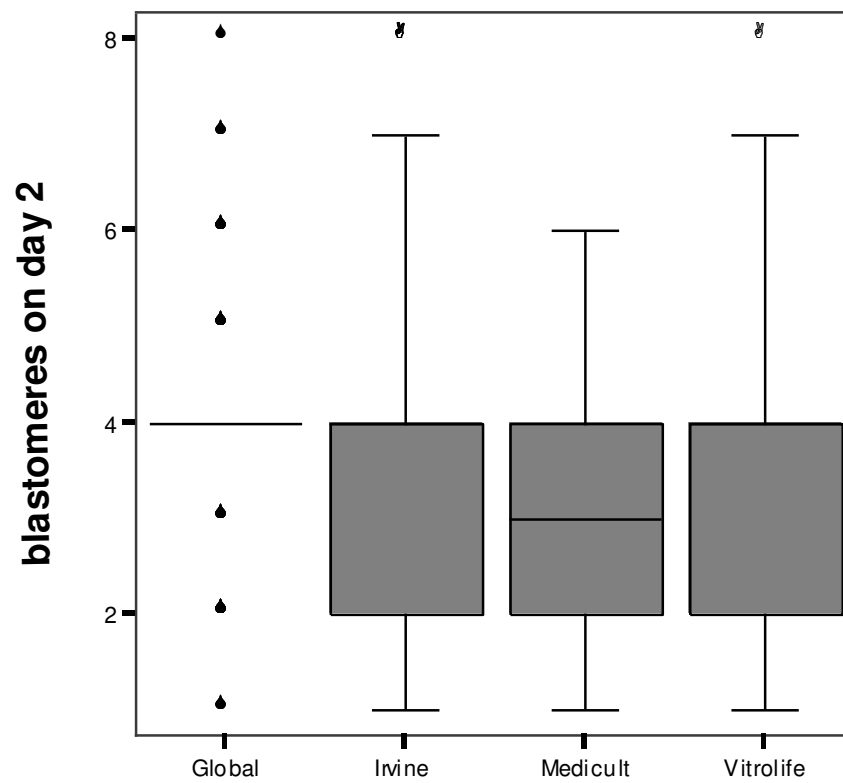


Figure 1



*Global vs HTF, IVF-30 and Universal IVF = $p < 0.008$

HTF vs IVF-30 = p NS

Figure 2

Table I. General characteristics of ICSI cycles

	HTF	Global	IVF-30	Universal IVF
Age (mean±SD)	33.6±4.6	32.7±4.4	33.3±4.6	34.6±4.6
Number of MII median (range)	12(1-32)	11(2-17)	12(2-32)	16(3-27)
Number of blastomeres on Day 2	4(1-8 ^A)	4(1-8 ^B)	4(1-8 ^A)	3(1-8 ^C)

Different letters indicate $p < 0.008$

Table II. Comparison of frequencies of pronúcleolar and NPBs among HTF, Global, IVF-30 and Universal IVF media

Total	HTF		Global			Universal IVF			IVF-30		
	n	%	n	%	OR(CI 95%)	n	%	OR(CI 95%)	n	%	OR(CI 95%)
	1170		199			260			660		
Control vs HTF					p<0.2486			p<0.1514			p<0.0007
A1+A2	575	49.1	89	44.7	0.84(0.62–1.13)	115	44.2	0.82(0.63-1.08)	364	55.2	1.27(1.05-1.54)
Control vs Global								p<0.9161			p<0.0098
A1+A2						115	44.2	0.98(0.68-1.42)	364	55.2	1.52(1.11-2.09)
Control vs Universal IVF											p<0.0028
A1+A2									364	55.2	1.55(1.16-2.07)

OR= Odds Ratio;
CI= Confidence interval
p value<0.008

Table III. Comparison of frequencies of good quality (TOP) embryos among HTF, Global, IVF-30 and Universal IVF media

Total	HTF		Global			Universal IVF			IVF-30		
	n	%	n	%	OR(CI 95%)	n	%	OR(CI 95%)	n	%	OR(CI 95%)
	1170		199			260			660		
Control vs HTF					p<0.00001			p<0.00001			p<0.071
Top embryos	249	21.3	80	40.2	2.49(1.81–3.41)	29	11.2	0.46(0.31-0.70)	165	25.0	1.23(0.98-1.54)
Control vs Global								p<0.00001			p<0.00001
Top embryos						29	11.2	0.19(0.12-0.30)	165	25.0	0.50(0.36-0.69)
Control vs Universal IVF											p<0.00001
Top embryos									165	25.0	2.66(1.74-4.06)

4. Conclusões

- A formação de zigotos com pronúcleos centrais e nucléolos alinhados (A1+A2) foi maior no meio IVF-30 quando comparado aos meios HTF, Global e Universal IVF.
- Quanto à qualidade embrionária no segundo dia de desenvolvimento, o meio Global obteve a maior porcentagem de embriões de boa qualidade (*top*).
- O uso do meio Global esteve relacionado à maior formação de embriões de boa qualidade no dia 2 e a maiores taxas de clivagem em relação aos demais meios.

5. Referências Bibliográficas

1. Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution Reproductive BioMedicine Online. 2004;8(6):695-700.
2. Gardner DK, Lane M. Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? Hum Reprod Update. 1997;3(4):367-82.
3. Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. Fertil Steril. 1996; 65(2):349-53.
4. Casslen B, Nilsson B. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose and urea. Am J Obstet Gynecol.1984;150(7):877-81.
5. Bavister BD. Glucose and culture of human embryos. Fertil Steril. 1999; 72(2):223-4.
6. Martin KL. Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts. Hum Fertil. 2000;3(4):247-54.

7. Gardner DK, Lane M, Batt P. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. *Mol Reprod Dev.* 1993;36(3):313-9.
8. Lane M, Gardner DK. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.* 2000;62(1):16-22.
9. Leese HJ, Conaghan J, Martin KL, Hardy K. Early human embryo metabolism. *BioEssays.* 1993;15(4):259-64.Review.
10. Lane M, Gardner DK. Embryo culture medium: which is the best? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007;21(1):83-100.
11. Gardner DK, Lane M. Alleviation of the '2-cell-block' and development to the blastocyst of CFI mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod.* 1996;11 (12):2703-12.
12. Aoki VW. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. *Reproductive BioMedicine Online.* 2005,10(5):600-6.
13. Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod BioMed Online.* 2003;6(4):470-81.
14. Blake DA, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M. Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;19(4):CD00218.Review.
15. Balaban B, Urman B. Embryo culture as a diagnostic tool. *Reproductive BioMedicine Online.* 2003;7(6):671-82.Review.
16. Xella S, Marsella T, Tagliasacchi D, Giulini S, Marca A, Tirelli A et al.Embryo quality and implantation rate in two different culture media: ISM1 versus Universal IVF Medium. *Fertil Steril.* 2009; [Epub ahead of print].

17. Van Langendonckt A, Demylle D, Wyns C, Nisolle M, Donnez J.
Comparasion of G1.2/G2.2 and Sidney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertil Steril*. 2001;76(5):1023-31.
18. Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Franco JG Jr. A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. *J Assist Reprod Genet*. 2001; 18(7):378-81.
19. Rienzi L, Ubaldi F, Iacobelli M, Romano S, Minasi MG, Ferrero S et al.
Significance of morphological attributes of the early embryo. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(5):669-81.Review.
20. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fortini D, Grieco N. Pronuclear morphology and chromosomal abnormalities as scoring criteria for embryo selection. *Fertil Steril*. 2003;80(2):341-9.
21. Tesarik J, Junca AM, Hazout A, Abriot FX, Nathan C, Cohen-Bacrie P et al.
Embryos with high implantation potencial after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, noninvasive examination of PN morphology. *Hum Reprod*. 2000;15(6):1396-9.
22. Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod*. 2000;15(11):2394-403.
23. Montag M, van der Ven H. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicenter study. *Hum Reprod*. 2001;16(11): 2384–9.
24. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Lappi M, Borghi E, Ermini B. Oocyte euploidy, pronuclear zygote morphology and embryo development. *Hum Reprod*. 2007;22(1):241-9.

25. Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryo in vitro. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;141(4):408-16.
26. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in in vitro fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *In Vitro Fert Embryo Transf.* 1986;3(5):284-95.
27. Guerif F, Le Gouge A, Giraudeau B, Poindron J, Bidault R, Gasnier O et al.. Limited value of morphological assessment at days 1 and 2 to predict blastocyst development potential: a prospective study based on 4042 embryos. *Hum Reprod.* 2007;22(7):1973-81.
28. Steer CV, Mills CL, Tan SL, Campbell S, Edwards RG. The cumulative embryo score: a predictive embryo scoring technique to select the optimal number of embryos to transfer in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Hum Reprod.* 1992;7(1):117-9.
29. Ziebe S, Petersen K, Lindenberg S, Andersen AG, Gabrielsen A, Andersen AN. Embryo morphology or cleavage state: how to select the best embryos for the transfer after in vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1997;12(7):1545-9.
30. Giorgetti C, Terriou P, Auquier P, Hans E, Spach JL, Salzmann J et al. Embryo score to predict implantation after in vitro fertilization: based on 957 single embryo transfers. *Hum Reprod.* 1995;10(9):2427-31.
31. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Rep.* 2001;16(2):313-8.

32. Pelinck MJ, De Vos M, Dekens M, Van der Elst J, De Sutter P, Dhont M. Embryos cultured in vitro with multinucleated blastomeres have poor implantation potencial in human in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1998;13(4):960-3.
33. Alikani M, Calderon G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture in vitro. *Hum Reprod.* 2000;15(12):2634-43.
34. Balakier H, Cadesky K. The frequency and developmental capability of human embryos containing multinucleated blastomeres. *Hum Reprod.* 1997; 12(4):800-4.
35. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Hum Reprod.* 1999;71(5):836-42.
36. Dozortsev D, Ermilov A, El-Mowafi DM, Diamond M. The impact of cellular fragmentation induced experimentally at different stages of mouse preimplantation development. *Hum Reprod.* 1998;13(5):1307-11.
37. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell deth and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod.* 1996;2(2):93-8.
38. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2006; 12(2):234-53.
39. Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008;23(1):91-9.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Carta de aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/Unicamp



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 24/03/09.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 192/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0143.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “EFEITO DE QUATRO DIFERENTES MEIOS DE CULTURA NA QUALIDADE DE ZIGOTOS E PRÉ-EMBRIÕES”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Raquel Di Falco Cossello

INSTITUIÇÃO: Centro de Reprodução Humana de Campinas - CEMICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/03/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/03/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Comparar os efeitos de quatro diferentes meios de cultura na qualidade dos zigotos e na formação de pré-embriões TOP (os melhores pré-embriões morfológicamente Veeck, 1986). O melhor meio de cultura será definido como aquele que apresentar uma maior quantidade de pré-embriões com quatro células mononucleadas e menos de 20% de fragmentação no segundo dia de desenvolvimento.

III - SUMÁRIO

Será realizado um estudo retrospectivo que avaliará 400 ciclos com aproximadamente 2950 pré-embriões durante o período de setembro de 2006 a junho de 2008 no Centro de Reprodução Humana de Campinas. Após o processo da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), os oócitos serão divididos em dois grupos e cultivados em diferentes meios para posterior análise dos zigotos e pré-embriões produzidos. O parâmetro para definir o melhor zigoto será a presença de pró-núcleos centrais com nucléolos alinhados ou dispersos, sendo que os melhores pré-embriões deverão apresentar quatro células iguais, mononucleadas e menos de 20% de fragmentação no segundo dia de desenvolvimento. Análise dos dados: Será utilizado Odds ratio simples e múltiplo através de regressão logística. Após a tabulação dos dados, será avaliado o poder do teste, considerando-se um nível de significância de 5%.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão, exclusão e descontinuação dos sujeitos estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística muito bem embasados. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto e solicita dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O orçamento é detalhado.



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de março de 2009.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP