



Ospedale Evangelico Internazionale

Ente Ecclesiastico Civilmente Riconosciuto

Sede Legale: Sal. Sup. S. Rocchino, 31a - 16122 Genova

Presidio Ospedaliero di Genova Voltri,

Piazzale Gianasso, 4 - 16158 - Genova

TECNOBIOS[®]
PROCREAZIONE

G. Orlando

Optimizing Human Embryo Care



Sede dell'Evento

Ospedale Evangelico Internazionale

Sala Formazione

S.S. Medicina della Riproduzione

Sal. Sup. S. Rocchino, 31/a

16122 - Genova

10 maggio 2013

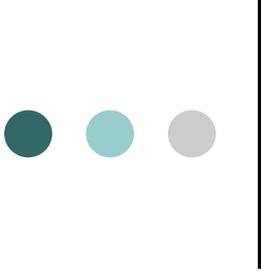


**“CULTURE
MEDIA”**

... BUON SISTEMA DI COLTURA...

- ✓ Alto tasso di fertilizzazione
- ✓ Clivaggio corretto e buona morfologia embrionale
- ✓ Alto numero di embrioni con buona morfologia
- ✓ Elevata pregnancy rate
- ✓ Basso tasso di aborti
- ✓ Alto cumulative delivery rate (fresh+frozen)
- ✓ Basso tasso di gravidanze multiple

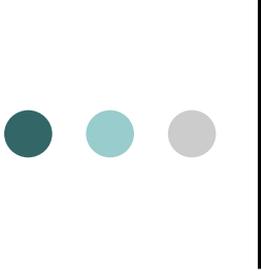




LA VITALITA' EMBRIONALE IN VITRO...

- ✓ Composizione dei terreni di coltura
- ✓ Qualità dei terreni di coltura
- ✓ Caratteristiche fisico-chimiche dei terreni di coltura
(PH, osmolarità, temperatura, ambiente gassoso)
- ✓ Condizioni di coltura

(Van den Abbel, 2010)



COMPOSIZIONE DEI TERRENI DI COLTURA

- ❖ Semplice
- ❖ Complesso
- ❖ Definito per embrioni pre-impianto
- ❖ Sequenziale

TERRENO SEMPLICE

- ✓ Soluzioni saline di base (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+})
- ✓ Substrati energetici (Piruvato-lattato-glucosio)
- ✓ Siero materno/Albumina
- ✓ Tamponi di bicarbonato/tamponi di fosfato/HEPES

Ringer's, Earl's, Balanced salt Solution (BSS),
Whittingham's T6



TERRENO COMPLESSO

- ✓ Aminoacidi
- ✓ Vitamine
- ✓ Nucleotidi
- ✓ Ioni metallici
- ✓ Antibiotici (penicillina, streptomycina, gentomicina)

Essential Medium (MEM), Ham's F-10, BWW,
TC199, KSOM



TERRENO EMBRIONE PRE-IMPIANTO

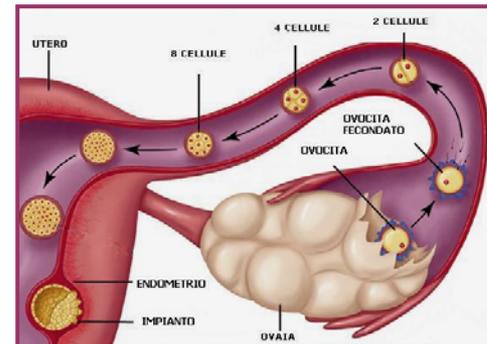
Principi per la formulazione

- Studi sviluppo e metabolismo embrionale

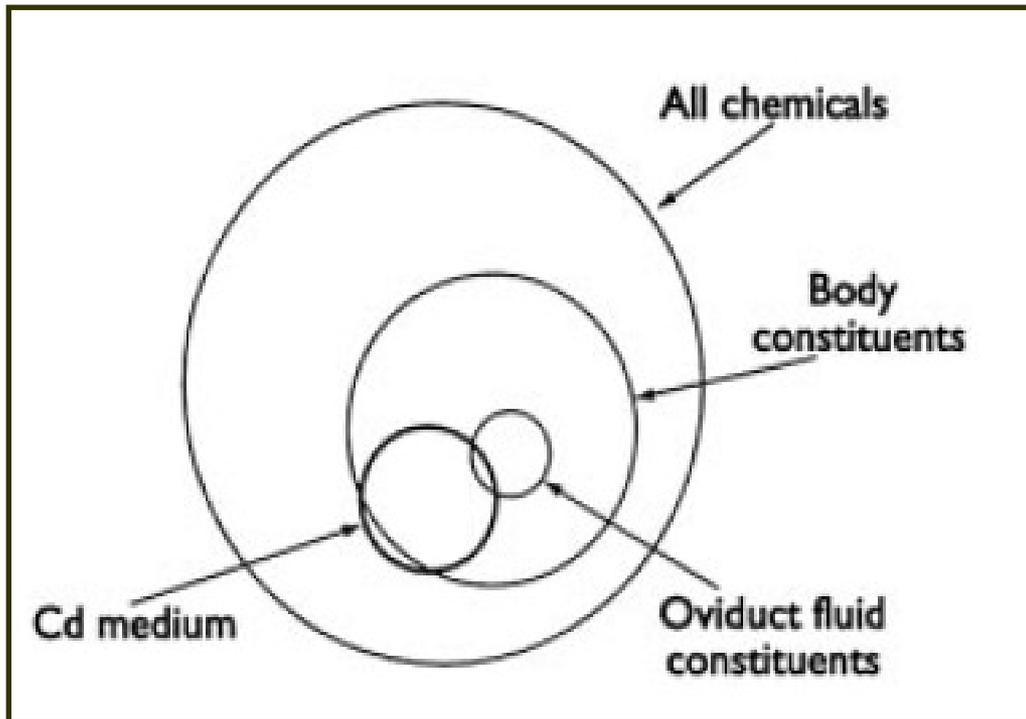


- Studi timing di attivazione genomica

- Studio composizione fluidi tubarico ed uterino



DESIGN DEI MEZZI CHIMICAMENTE DEFINITI



Selezione e concentrazione dei reagenti

2 teorie:

-LET THE EMBRYO CHOOSE

-BACK TO NATURE

TERRENO EMBRIONE PRE-IMPIANTO

- ✓ Rimozione o riduzione concentrazione glucosio e fosfato
- ✓ Addizione di piruvato e lattato
- ✓ Addizione di EDTA
- ✓ Addizione di Aminoacidi
- ✓ Addizione di HSA o SSS o ialuronato

Menezo B2; HTF; P1; HTF-12; G1-S1 e G2-S2;
basal XI HTF



TERRENI SEQUENZIALI



TABLE 1

Commercial systems for the culture of human preimplantation embryos.

Commercial sequential two-media systems:

Company	Sequential media
Cook IVF	Sydney IVF cleavage medium/ Sydney IVF blastocyst medium
CooperSurgical	Quinn's Advantage cleavage medium/Quinn's Advantage blastocyst medium
FertiPro N.V.	FERTICULT/FERTICULT G3
InVitro Care Inc.	IVC-ONE/IVC-TWO
Irvine Scientific	ECM/MultiBlast Medium
MediCult	EmbryoAssist/BlastAssist
Vitrolife	G-1 v5 PLUS/G-2 v5PLUS

Commercial single-medium system:

Company	Medium
IVFonline	Global

Biggers. Preimplantation embryo culture. Fertil Steril 2008.

✓ Risorse energetiche

- piruvato e glucosio

✓ EDTA

✓ Aminoacidi

- NEAA e EAA



TERRENI SEQUENZIALI

o

A FORMULAZIONE SINGOLA



✓ TERRENI SEQUENZIALI

Composizione variabile in relazione allo stadio di sviluppo embrionale

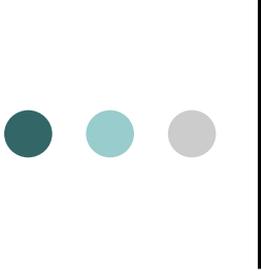
✓ TERRENI A FORMULAZIONE SINGOLA

Composizione fissa

Dosaggi substrati energetici in fluidi tubarico ed uterino

TUBA	<u>Glucosio</u>	<u>Lattato</u>	<u>Piruvato</u>
Fase follicolare	3.1 mmol/L	0.49 mmol/L	0.24 mmol/L
Fase ovulatoria	0.5 mmol/L	10.5 mmol/L	0.24 mmol/L
Fase luteale	2.3 mmol/L	6.2 mmol/L	0.24 mmol/L
UTERO	3.2 mmol/L	5.9 mmol/L	0.1 mmol/L

(Gardner, 1996)



Richiesta energetica ed effetti inibitori del glucosio

- ✓ L'ovidutto contiene una quantità significativa di glucosio (*Tay et al, 1997*)
- ✓ Presenza di trasportatori di glucosio sia in ovociti che in embrioni (*Pantaleon and Kaye, 1998*)
- ✓ L'effetto inibitorio del glucosio in coltura può essere determinato dalla concentrazione di altri componenti e dalle loro interazioni (*Biggers et al, 2001*):
 - Il glucosio può ridurre la funzione mitocondriale se in concentrazioni elevate in presenza di fosfato (*Quinn 1995*)
 - L'effetto inibitorio del glucosio è reversibile in presenza di aa, EDTA, vitamine (*Lane and Gardner, 1998*)

IL GLUCOSIO DOVREBBE ESSERE INCLUSO NEL TERRENO DI COLTURA ALLA CONCENTRAZIONE FISIOLÓGICA TROVATA NELL'OVIDUTTO UMANO

Ruolo dell'EDTA

1st 72 hr of culture	2nd 72 hr of culture	Total oocytes	Cleaved (%)	Morula/ Blastocyst (%) ^d	Total blastocyst (%) ^d
SOFaa	SOFaa	312	214 (68.6)	100 (46.7) ^{ab}	79 (36.9) ^{ab}
EDTA	SOFaa	332	220 (66.3)	125 (56.8) ^{ac}	95 (43.2) ^{ac}
EDTA	EDTA	252	184 (73.0)	46 (25.0) ^{bc}	35 (19.0) ^{bc}

Gardner et al, 2000

✓ L'aggiunta al terreno di coltura di EDTA ad una concentrazione 0,01 mmol/L non ha effetti deleteri sullo sviluppo dell'embrione pre-impianto o post-impianto (*Biggers et al, 2005; 2006*)

**L'EDTA DOVREBBE ESSERE AGGIUNTO A BASSE
CONCENTRAZIONI NEL TERRENO DI COLTURA**

Ruolo degli Aminoacidi

TABLE 2. Effect of culture of the early bovine embryo with different groups of amino acids for the first 72 h and their effect on subsequent developmental competence.

Media* 1st 72 h	Media† 2nd 72 h	Cleaved ova	Development [‡] to various stages after		
			72 h culture ≥8-cell	144 h culture	
				Morula and blastocyst	Blastocyst
SOF	20aa	161	35.4 ^{ac}	32.3 ^{abc}	20.9 ^{ab}
Gln	20aa	200	44.8	53.8 ^a	28.7 ^e
NeGln	20aa	178	62.7 ^{ab}	57.5 ^b	41.5 ^{ace}
EssGln	20aa	196	43.4 ^b	46.1	24.6 ^{cd}
20aa	20aa	187	55.3 ^c	57.7 ^c	39.2 ^{bd}

Steeves and Gardner, 1999

- ✓ I fluidi follicolare e uterino contengono tutti i 20 naturali aminoacidi (Tay et al, 1997; Jozwik et al, 2006)
- ✓ Elevato turnover di aa essenziali nelle prime fasi dello sviluppo embrionario (Houghton et al, 2002; Brison et al, 2004)

**GLI AMINOACIDI DOVREBBERO ESSERE ADDIZIONATI TUTTI AD
UNA CONCENTRAZIONE OTTIMALE**

TERRENI SEQUENZIALI O A FORMULAZIONE SINGOLA?

TABLE 4

Comparison of some general characteristics of a nonrenewal single medium, a renewal single medium, and a sequential medium.

Characteristic	Single medium (nonrenewed)	Single medium (renewed)	Sequential media
Leaves embryos undisturbed	Yes	No	No
Accumulated endogenous growth factors	Left in place	Lost	Lost
Replacement of essential nutrients	No	Yes	Yes
Accumulated toxins	Left in place	Removed	Removed
Relative environmental stress to embryos	Low	Moderate	High
Required quality control	One medium	One medium	Two media
Relative labor intensity	Low	Moderate	High
Relative cost	Low	Low	High

Biggers. Preimplantation embryo culture. Fertil Steril 2008.

TERRENI SEQUENZIALI O A FORMULAZIONE SINGOLA?

TABLE 2

The percentage human zygotes that develop into blastocysts over 5 to 6 days in global medium and in several sequential media observed in several clinics.

Reference	Single medium (Global)		Sequential media		P
	Protocol	Blastocysts	Protocol	Blastocysts	
Freeman and Rieger ^a	Renewed	36% (71/198)	IVC-1/G2	26% (52/199)	.036
Greenblatt et al. ^b	Renewed	53% (29/55)	G1/G2	38% (21/55)	.180
Angus et al. ^c	Renewed	58% (197/337)	GIII	50% (131/261)	.047
Kumagai et al. ^d	Renewed	54% (79/149)	Quinn's cleavage/Multiblast Irvine	48% (71/147)	.486
Matsubara et al. ^e	Renewed	46% (73/187)	BAS Medicult	39% (90/195)	.179
Sepulveda et al. ^f	Renewed	44% (117/268)	IrvineECM/Multiblast	33% (93/283)	.011
Zech et al. ^g	Renewed	44% (290/667)	G1.3/G2.3	35% (170/491)	.003

TABLE 3

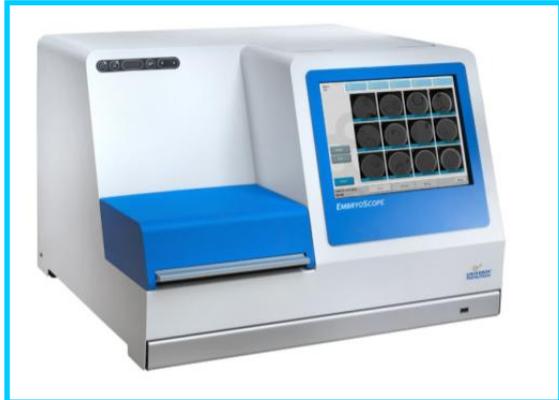
The percentage of ongoing pregnancies that arise from blastocysts cultured from human zygotes.

Reference ^a	Single medium (Global)		Sequential media		P
	Protocol	Pregnancies	Protocol	Pregnancies	
Greenblatt et al. ^b	Renewed	43% (?)	G1/G2	42% (?)	—
Angus et al. ^c	Renewed	40% (12/30)	GIII	28% (8/29)	.412
Matsubara et al. ^e	Renewed	41% (7/17)	BAS Medicult	40% (6/15)	1
Zech et al. ^g	Renewed	49% (21/43)	G1.3/G2.3	40% (9/22)	.606

^a For reference numbers, see Table 2.

Biggers. Preimplantation embryo culture. Fertil Steril 2008.

TERRENI SEQUENZIALI O A FORMULAZIONE SINGOLA?



Human Reproduction, Vol.28, No.3 pp. 634–641, 2013

Advanced Access publication on January 12, 2013 doi:10.1093/humrep/des462

human
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Embryology*

Type of culture media does not affect embryo kinetics: a time-lapse analysis of sibling oocytes

Natalia Basile^{1,*}, Dean Morbeck², Juan García-Velasco¹,
Fernando Bronet¹, and Marcos Meseguer³

¹Instituto Valenciano de Infertilidad, Av. Del Tálago 68 (28023), Madrid, Spain ²Department of Obstetrics and Gynecology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA ³Instituto Valenciano de Infertilidad, Universidad de Valencia, Valencia, Spain

Table II Mean for the different variables according to the media utilized.

Variable	Culture media	N	Mean	CI 95%		Minimum	Maximum
				Lower limit	Upper limit		
2PN	Sage	269	8.35	8.04	8.65	4.72	30.14
	Global	263	8.16	7.82	8.51	4.43	30.14
PNF	Sage	269	23.41	22.77	24.04	6.16	54.02
	Global	263	23.56	22.92	24.21	6.84	51.34
t2 (h)	Sage	269	27.26	26.60	27.91	19.18	57.35
	Global	263	26.71	26.12	27.30	18.52	53.19
t3 (h)	Sage	269	38.08	37.32	38.83	22.40	64.12
	Global	263	37.84	37.08	38.61	23.05	65.29
t4 (h)	Sage	269	40.15	39.39	41.91	24.44	68.07
	Global	263	40.20	39.36	41.04	25.45	74.85
t5 (h)	Sage	239	51.27	50.15	52.39	27.18	101.69
	Global	242	51.14	50.15	52.13	32.71	77.53
cc2 (h)	Sage	269	10.91	10.37	11.45	.00	26.88
	Global	263	11.17	10.61	11.74	.00	37.19
s2 (h)	Sage	269	2.19	1.73	2.64	.00	18.67
	Global	263	2.70	2.13	3.27	.00	25.51

2PN time of pronuclear appearance, PNF time of pronuclear fading, t2 (time to 2 cells), t3 (time to 3 cells), t4 (time to 4 cells), t5 (time to 5 cells), cc2 (t3 – t2), s2 (t4 – t3).

TERRENI SEQUENZIALI O A FORMULAZIONE SINGOLA?

Table III Percentage of embryos falling within optimal ranges for t5, s2 and cc2 according to the media utilized.

Culture media	t5			s2			cc2		
	N	Out of range (%)	48.8–56.6 h (%)	N	Out of range (%)	<0.75 h	N	Out of range (%)	<12 h
Global	242	62.0 (150/242)	38.0 (92/242)	263	49.0 (129/263)	51.0 (134/263)	269	46.8 (126/269)	53.2 (143/269)
Sage	239	59.8 (143/239)	40.2 (96/239)	269	49.4 (133/269)	50.6 (136/269)	274	47.8 (131/274)	52.2 (143/274)
P			NS			NS			NS

t5 (time to 2 cells), cc2 (t3 – t2), s2 (t4 – t3).

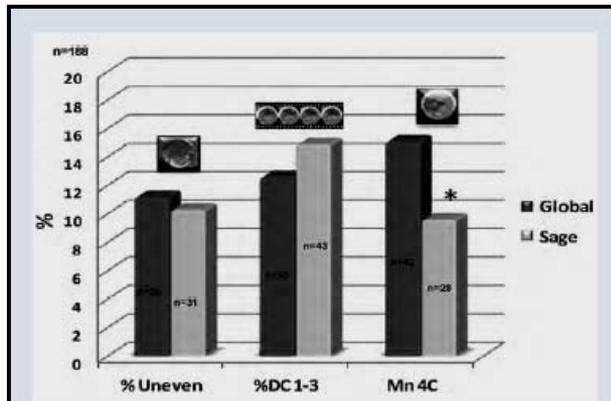
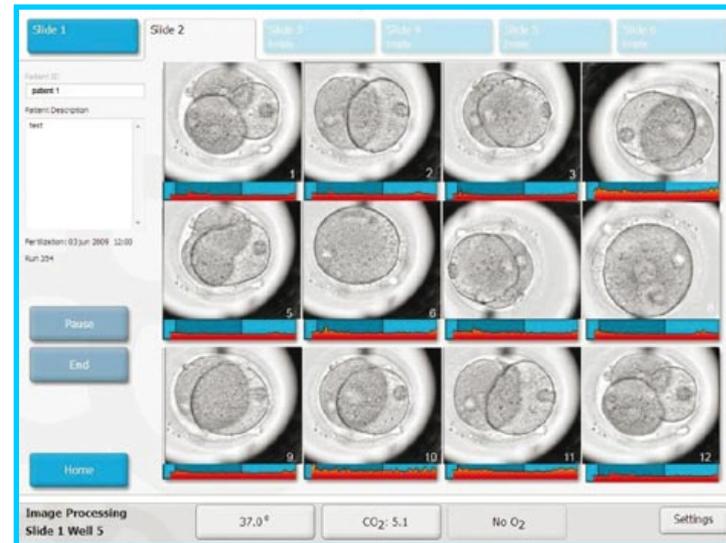


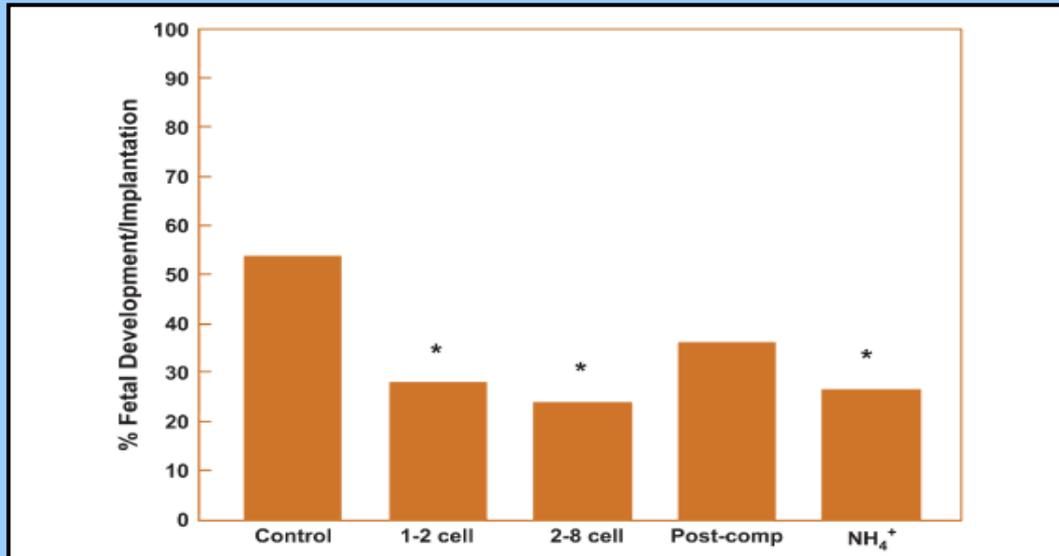
Figure 1 Percentage of embryos presenting exclusion criteria. (a) Uneven blastomere size at the two-cell stage (%Uneven), (b) DC: direct cleavage from 1 to 3 cells (<5 h) (%DC 1–3) and (c) Mn: multinucleation at the four-cell stage (Mn 4C).





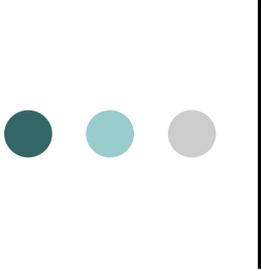
RINNOVO TERRENI

L-Glutamina ed accumulo di Ammonio



Lane and Gardner, 2007

LA Gln POTREBBE ESSERE SOSTITUITA DA UN DIPEPTIDE STABILE COME L-alanil-L-Glutamina (AlaGln) O Glicil-L-Glutamina (Gly-Gln)



TERRENI SEQUENZIALI VS TERRENI A COMPOSIZIONE SINGOLA NON RINNOVATI

[Reprod Biomed Online](#). 2002 Sep-Oct;5(2):133-40.

The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM(AA) medium: is a two-step protocol necessary?

[Biggers JD](#), [Racowsky C](#).

Department of Cell Biology, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA.
john_biggers@hms.harvard.edu

[Fertil Steril](#). 2009 Nov;92(5):1783-6. Epub 2009 Jun 12.

Continuous uninterrupted single medium culture without medium renewal versus sequential media culture: a sibling embryo study.

[Reed ML](#), [Hamic A](#), [Thompson DJ](#), [Caperton CL](#).

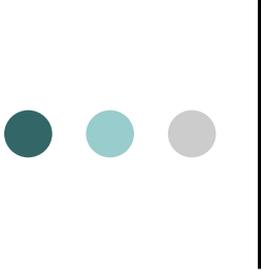
Center for Reproductive Medicine of New Mexico, Albuquerque, New Mexico 87106, USA. mleroyreed@yahoo.com



CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE DEI TERRENI DI COLTURA

e

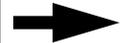
CONDIZIONI DI COLTURA



CHALLENGES *IN VITRO*

PROBLEMA:

- Temperatura
- PH
- Osmolarità
- Luce
- Contaminanti chimici
- Volatile organic components (VOC)
- Microrganismi
- Concentrazione O₂



SOLUZIONE:

- Controllo T, coltura con olio
- Buffers, coltura con olio, controllo PH
- Osmoliti, coltura con olio
- Ridurre esposizioni alla luce
- Usare terreni con certificazioni di qualità
- Air quality, pulizia e sterilizzazione
- Antibiotici
- Incubatori a bassa tensione di ossigeno

QUALITA' DEL TERRENO DI COLTURA

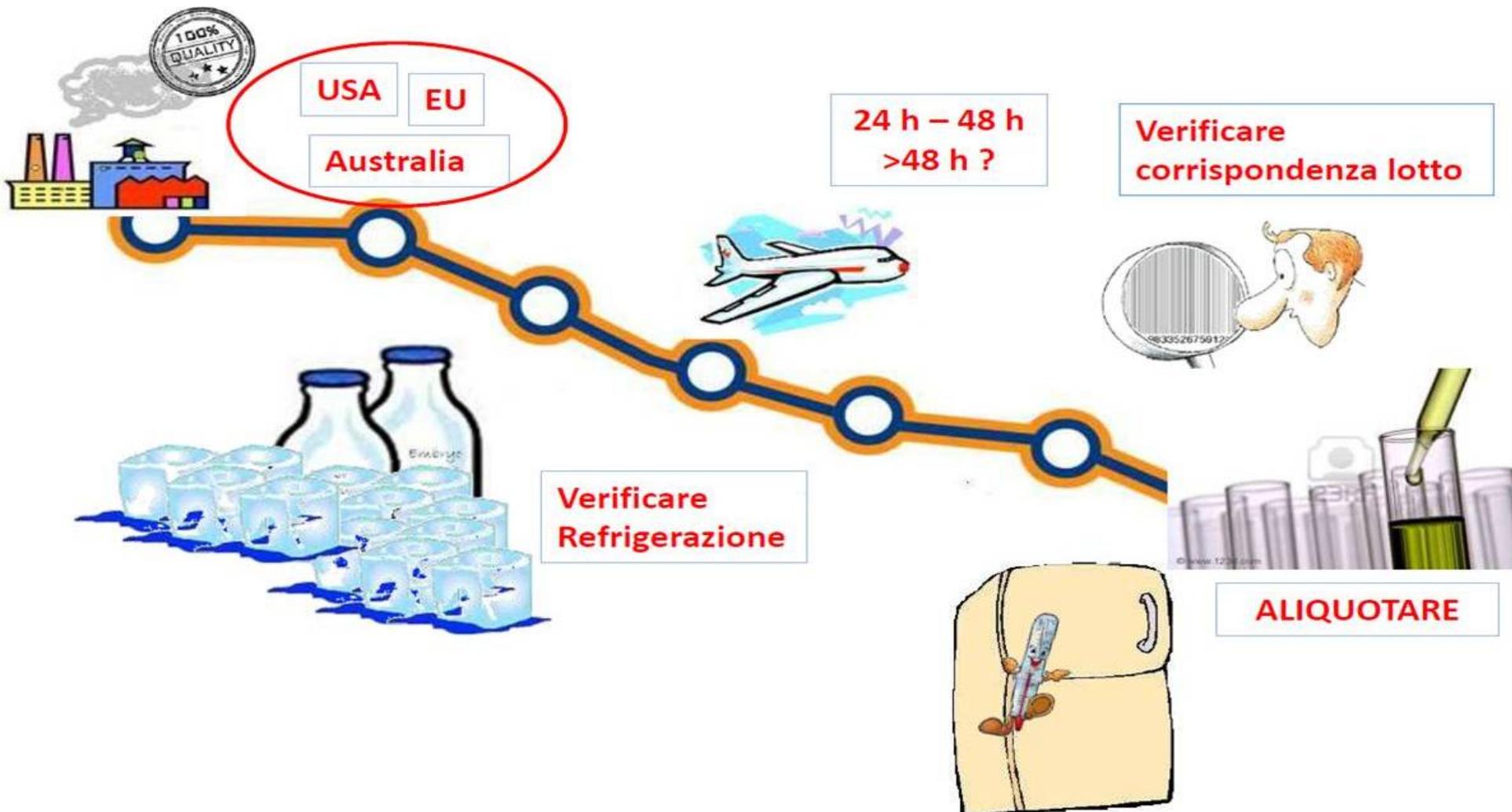
- ✓ PERFORMANCE:
 - risultati clinici
 - sicurezza

- ✓ PRODUTTORE:
 - documentazione
 - design philosophy
 - affidabilità e convenienza
 - distribuzione e trasporto
 - scadenza



(Sunde, 2010)

Mantenimento della qualità



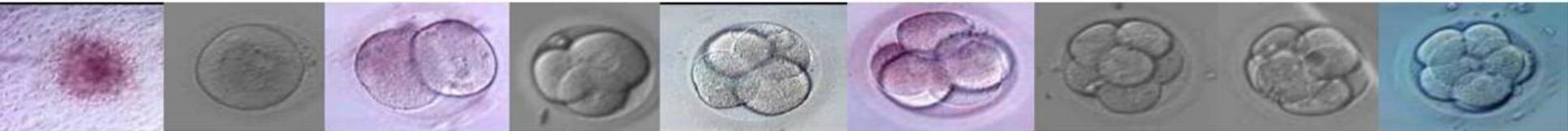
SCELTA DEL TERRENO DI COLTURA



PERFORMANCE

OUTCOMES

COSTI/BENEFICI



TAKE HOME BABY



...COSTI...

CONSEGUENZE DELLO STRESS IN VITRO

- ✓ Ritardi o arresti nello sviluppo embrionale
- ✓ Alterazione della fisiologia embrionale, in particolare del metabolismo
- ✓ Alterazioni dell'espressione genica
- ✓ Alterazioni dell'imprinting di alcuni geni
- ✓ Alterazione della vitalità



...COSTI....

Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review

E. Mantikou¹, M.A.F.M. Youssef^{1,2,3}, M. van Wely¹, F. van der Veen¹,
H.G. Al-Inany², S. Repping¹, and S. Mastenbroek^{1,*}

¹Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 9 1105AZ Amsterdam, The Netherlands

²Department of Obstetrics & Gynecology, Cairo University, Giza, Egypt ³Egyptian International Fertility IVF center (EIFC-IVF), Cairo, Egypt

Correspondence address. E-mail: s.mastenbroek@amc.uva.nl

Submitted on February 28, 2012; resubmitted on December 11, 2012; accepted on December 17, 2012

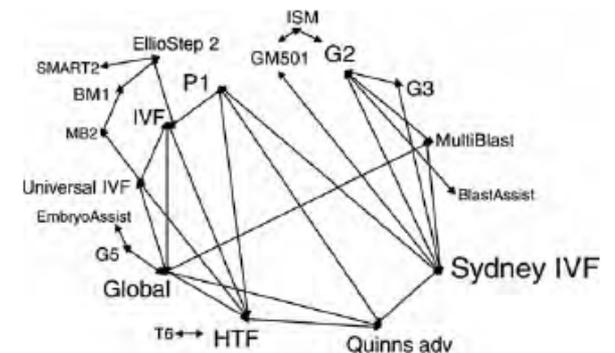


Figure 2 Schematic representation of the comparisons made in the included studies. The font size represents the number of studies on each medium.

GRAZIE...



Quality is never an accident;
it is always the result of high intention, sincere effort,
intelligent direction and skilfull execution;
it represents the wise choice of many alternatives”

(William A. Foster)