

Muy alta tasa de embarazos con transferencia de blastocistos por medios secuenciales. Primeros embarazos en Venezuela

Drs. Jorge Lerner, María Teresa Urbina, Randolpho Medina, Isaac Benjamín

Unidad de Fertilidad UNIFERTES. Clínica El Ávila. Caracas, Venezuela

RESUMEN

Objetivo: Mejorar las tasas de embarazo clínico y de implantación en fecundación *in vitro* mediante el cultivo y transferencia de blastocistos.

Método: Se controló la estimulación ovárica con ultrasonografía transvaginal y estradiol sérico. Los ovocitos aspirados por vía transvaginal, fueron incubados en medios secuenciales e inseminados con 20 000 espermatozoides móviles por ovocito. La presencia de pronúcleos se evaluó a las 16 horas posinseminación, y se revisó la división celular a intervalos de 24 horas. Al quinto o sexto día posinseminación se realizó la transferencia con embriones que se desarrollaron hasta el estadio de blastocisto.

Ambiente: Programa de Fecundación *in vitro* de UNIFERTES, Clínica El Ávila.

Resultados: De 37 óvulos, hubo una tasa de fecundación de 64,5%, de clivaje 100%, y de estos, hubo 87,5% blastocistos, se obtuvo una tasa de embarazos clínicos del 100% y una tasa de implantación del 50%.

Conclusión: Los medios secuenciales soportan bien el desarrollo de los embriones y la formación de blastocistos viables, mejorar la tasa de implantación y embarazo clínico de la fecundación *in vitro*.

Palabras clave: Blastocisto. Medios secuenciales. Fecundación *in vitro*. Transferencia de embriones.

SUMMARY

Objective: To improve clinical pregnancy and implantation rates of *in vitro* fertilization through blastocyst culture and transfer.

Method: We followed ovarian response through ultrasonography and serum estradiol determinations and later incubated transvaginally aspirated oocytes in sequential media and inseminated them with 20 000 spermatozoa per oocyte. We evaluated the presence of pronuclei 16 hours after insemination and checked for cleavage at 24 hour intervals. On day five or six after insemination we transferred the blastocysts.

Setting: UNIFERTES *in vitro* Fertilization Program.

Results: Of 37 oocytes, 64.8% fertilized, 100% cleavage, and of them 87.5% developed into blastocyst, clinical pregnancy rate was 100%, and implantation rate was 50%.

Conclusion: Even though the number of patients is very low, our results are very encouraging and support the findings of Gardner. We conclude that sequential media are able to support blastocyst development and improve implantation and clinical pregnancy rates of *in vitro* fertilization procedures.

Key words: Blastocyst. Sequential media. *In vitro* fertilization. Embryo transfer.

INTRODUCCIÓN

En fecundación *in vitro* (FIV), comúnmente la transferencia de embriones se realiza a los dos o tres días posinseminación. En condiciones naturales, los embriones de dos o tres días residen en la trompa, y al quinto día es cuando llegan al útero, en el momento de la ventana de la implantación. El cultivo de blastocistos permite que la transferencia

de embriones obtenidos *in vitro*, se realice el quinto o sexto día lo que asemeja las condiciones naturales y es más fisiológico, además posibilita la identificación de aquellos embriones con poco o ningún potencial de desarrollo.

Se conoce por experimentos con animales que la tasa de embarazos e implantación son mucho mayores si las transferencias se hacen con blastocistos. Los blastocistos son embriones mucho más grandes, con muchas más células, metabolismo diferente y con

Recibido: 11-05-99

Aceptado para publicación: 09-08-99

mayor capacidad de implantación que los embriones de dos o tres días (1).

El cultivo de blastocistos no es nuevo, lo que es nuevo es la forma de cultivarlos con medios secuenciales. Antes, en animales, los blastocistos se obtenían por cocultivo (1), y esta técnica fue estandarizada para humanos (2), desde entonces los embriones se han cocultivado con células Vero (de riñón de mono), oviducto de vaca, cúmulo, granulosa, oviducto y endometrio humano. La monocapa celular donde se cultivan los embriones, puede aportar condiciones bioquímicas y biofísicas similares a aquellas que encuentra el embrión en el estadio de preimplantación en el oviducto y útero, y las células pueden secretar factores “embriotróficos” que proporcionan una embriogénesis normal *in vitro*. Además, el cocultivo puede detoxificar el medio, elimina (absorbe o metaboliza) cationes metálicos pesados que son inhibidores metabólicos (3).

Más recientemente surgió la utilización clínica de los medios secuenciales, luego de haber sido probados intensivamente en modelos animales. Aunque, algunos investigadores consideran que la fórmula de los medios sintéticos, incluyendo aquellos diseñados para aproximarse a la bioquímica de las trompas, aun con suplementos complejos (suero materno o suero del cordón umbilical humano) son subóptimos para la embriogénesis preimplantacionaria humana y continúan usando la técnica de cocultivo (3), los resultados obtenidos con medios secuenciales en cuanto a tasa de formación de blastocistos, tasa de implantación y de embarazos clínicos son superiores a los conseguidos con cocultivo y demuestran que los blastocistos obtenidos son perfectamente viables (4).

Desarrollo de los medios secuenciales

Hasta ahora, los embriones han sido transferidos en estadios más tempranos porque los medios eran demasiado simples, preparados sólo con sales balanceadas y carbohidratos como fuente de energía. Al problema de la composición de los medios, se suma el hecho que se usa un solo medio, para soportar todos los estadios de desarrollo.

El cigoto y el blastocisto difieren en cuanto a fisiología y metabolismo y por tanto tienen diferentes requerimientos en cultivo. Entonces se formularon medios secuenciales para soportar los distintos estadios de desarrollo embrionario y los nutrientes secuenciales claves fueron carbohidratos y aminoácidos.

Carbohidratos

Se ha observado que el piruvato es el nutriente más importante para el embrión que está clivando, y que a medida que se desarrolla el blastocisto la glucosa se hace necesaria (5). También se encontró que el piruvato y el lactato se encuentran en altas concentraciones en el oviducto, mientras que la concentración de glucosa es baja. En contraste, en el útero, la concentración de piruvato y lactato son bajas y la de glucosa es alta.

En embriones humanos se ha demostrado que los medios con glucosa pueden alterar el desarrollo temprano del embrión (6-9), mientras que en animales, se demostró que la glucosa puede ser usada por el embrión temprano a expensas de la oxidación (10-15). Esta alteración de la función metabólica no se evidencia cuando aminoácidos específicos y etilén diamino tetra acético (EDTA) están presentes en el medio, porque actúan a través de mecanismos independientes para suprimir la actividad glicolítica del cigoto (14,16,17). También, ambos actúan para minimizar cualquier efecto adverso de la glucosa. Mientras que el blastocisto puede usar la glucosa como fuente de energía oxidativa y glicolítica (11,18-20).

Después de la compactación, la glucosa tiene un importante rol en biosíntesis de ácidos nucleicos, lípidos y otras macromoléculas y la masa interna de células genera su energía principalmente de la glicólisis. Por tanto, una supresión de la glicólisis puede interferir con el desarrollo de la masa interna celular y alterar el subsecuente desarrollo fetal, de hecho se ha observado que con embriones de ratón cultivados en ausencia de glucosa, la pérdida fetal es mayor (21); y se encontró que embriones de ratón expuestos a EDTA continuo, tuvieron un desarrollo fetal inferior que aquellos que sólo fueron expuestos a EDTA por las primeras 48 horas (21). Garner y col. (22) demostraron que la presencia de EDTA las primeras 72 horas mejoraba el desarrollo de embriones bovinos al estadio de 8 células, y si eran dejados en medio con EDTA la masa interna celular era significativamente más pequeña, mientras que el desarrollo del trofoectodermo permanecía inalterado. Estos hallazgos resaltaron que los estadios de clivaje y compactación tienen metabolismos diferentes (23).

Aminoácidos

Recientemente se reconoce la importancia de los aminoácidos como reguladores del crecimiento embrionario. Se observó que los aminoácidos se encuentran abundantemente en los fluidos del tracto

reproductivo femenino (12,24,25), y que el ovocito y el embrión mantienen una reserva endógena de aminoácidos a través de transportadores específicos de la membrana plasmática (24,26,27). Los aminoácidos más abundantes en el oviducto resultaron ser los más beneficiosos en el crecimiento del embrión (28,29). Estos son: alanina, glutamato, glutamina, glicina, prolina y serina. Estos aminoácidos juntos han demostrado disminuir el tiempo que le toma al embrión llegar a compactarse y convertirse en blastocisto (29,30). De la misma manera que hay un cambio de requerimientos de carbohidratos a medida que el embrión se desarrolla, también sucede con los aminoácidos. Estos cambios parecen inherentes a que hay 2 tipos de células en los blastocistos: la masa celular interna que requiere el grupo de aminoácidos esenciales, los mismos requeridos por las células somáticas, y el trofoectodermo que usa los aminoácidos no esenciales y glutamina (31). Los aminoácidos no esenciales sirven como reguladores del metabolismo, osmolitos y buffer del pH intracelular antes de la compactación.

Debido a que los embriones cambian sus requerimientos metabólicos a medida que crecen, se ha sugerido que el desarrollo óptimo de estos requerirá más de un medio de cultivo y se han formulado diversas versiones de medios secuenciales, que soportan el desarrollo al adecuarse a las necesidades cambiantes de los embriones a medida que estos se desarrollan y diferencian.

Actualmente se estudia el reemplazo de la fuente de proteína con glicosaminoglicano hialuronato en vez de albúmina, lo que eliminaría posible variación biológica y contaminación con productos sanguíneos (17).

El uso de medios secuenciales ha resultado en que 50% de los embriones llega a blastocistos, con un 50% de tasas de implantación, y un 60% de tasas de embarazos clínicos, mientras que con embriones de dos o tres días las tasas de implantación eran 10-15%, y de embarazos clínicos alrededor del 30% y 40% (17).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tres parejas con historia de infertilidad de dos o más años de evolución, por causas diferentes, fueron sometidas a estimulación ovárica con análogos de GnRH (acetato de leuprolide), FSH pura, HMG y hCG urinaria. El acetato de leuprolide se indicó a partir del día 21 del ciclo anterior y la estimulación con gonadotropinas se inició el día del sangrado

menstrual (dos o tres del ciclo), el crecimiento folicular como respuesta a la estimulación por gonadotropinas se controló con ultrasonografía transvaginal y estradiol sérico seriado, cuando se alcanzó al menos 1 000 pg/ml de estradiol sérico y un diámetro folicular de 18 mm se indicó 10 000 UI de hCG, la aspiración folicular se realizó 36 h después. Se aspiraron 37 folículos guiados con un ultrasonógrafo Combison (310 Kretz Technik, Tiefenbach, Austria) y transductor de 7,5 MHz, se utilizaron agujas de 30 cm CCD 1403001, los ovocitos recibidos en medio HTF Hepes (Irvine Scientific 9963), se entregaron al laboratorio para su evaluación.

Los ovocitos clasificados como metafase II y metafase I maduros se colocaron en medios secuenciales (17), en gotas bajo aceite mineral (Sigma M-8410) e incubados por cinco horas en CO₂ al 5% y a 37°C, en incubadora Nuaire US Autoflow. Estos ovocitos se inseminaron con 20 000 espermatozoides móviles por óvulo, seleccionados por separación en un gradiente de Percoll (SIGMA P-1644). A las 16 horas pos inseminación, los ovocitos fueron observados para detectar la presencia de pronúcleos y 24 horas después para evaluar la división celular. Un máximo de cuatro embriones fueron transferidos a los cinco días posinseminación, y los restantes se congelaron. La transferencia de embriones se realizó en medio HTF Hepes al 30% de suero sustituto con catéter Frydman 4.5 (CCD 1306045).

Desde el día de la transferencia se indicó a las pacientes como soporte de la fase lútea: progesterona micronizada por vía oral (200 mg cada ocho horas), o progesterona oleosa intramuscular (50 mg diarios), luego se evaluaron a los 12 días postransferencia para la detección de hCG cuantitativa, que se realizó por medio del ensayo DELFIA, se tomó como criterio de embarazo bioquímico más de 12 UI de hCG.

A las cinco semanas postransferencia se realizó el diagnóstico de embarazo clínico al verificarse la presencia de embriones con actividad cardíaca.

RESULTADOS

De los 37 óvulos obtenidos de las tres pacientes, fecundaron 24 lo que representa un 64,8%, todos clivaron (100% de tasa de clivaje), y 21 de ellos (87,5%) evolucionaron a blastocistos (Cuadro 1).

De ocho blastocistos transferidos, se implantaron cuatro, lo que representa un 50% de tasa de implantación. La tasa de embarazos clínicos fue

100% (Cuadro 2).

Los blastocistos restantes fueron congelados para futuras transferencia de embriones.

Cuadro 1

Formación de blastocistos				
Paciente	N° óvulos	Fecundados	Clivados	Blastocistos
1	26	18	18	16
2	6	4	4	4
3	5	2	2	1

Tasa de fecundación: 64,8%.

Tasa de clivaje: 100%.

Porcentaje de formación de blastocistos: 87,5%.

Cuadro 2

Implantación y embarazos clínicos			
Paciente	N° embriones transferidos	N° embriones implantados	Embarazo clínico
1	3	1	Positivo
2	4	2	Positivo
3	1	1	Positivo

Tasa de implantación: 50%.

Tasa de embarazos clínicos: 100%.

DISCUSIÓN

En esta primera experiencia venezolana, en tres cultivos hubo una tasa de formación de blastocistos de 87,5%, con tres transferencias y los blastocistos excedentes fueron congelados. Además, se lograron tres embarazos clínicos (100%), con una tasa de implantación del 50%. Aunque los números son pocos, los resultados son alentadores y corroboraron lo obtenido hasta ahora en los proyectos de Garner y Lane (17) en 1998: 50% de los embriones llegan a blastocistos, con 50% de tasas de implantación, y 60% de embarazos clínicos (Cuadro 3).

La tasa de formación de blastocistos, implan-

Cuadro 3

Comparación de resultados de UNIFERTES y otros Centros

Resultados	UNIFERTES 1999 FIV	Gardner y Lane (17) 1998 FIV	Motta y col. (32) 1998 ICSI
Tasa de formación de blastocistos (%)	87,5%	50	Sin reportar
Tasa de implantación (%)	50	50	30
Tasa de embarazos clínicos (%)	100	60	40,4

tación y embarazos clínicos conseguida en casos de fecundación *in vitro* por Gardner y Lane (17) y nosotros (Cuadro 3), son muy superiores a las tasas reportadas en el mundo para transferencia con embriones de dos o tres días, cuyas tasas de implantación son 10-15%, y de embarazos clínicos del 30% y 40% (17).

En casos de inyección intracitoplasmática de espermatozoide en el óvulo (ICSI), también otros autores en Brasil, trabajando con medios secuenciales, logran elevar las tasas de implantación de 19,1% a 30,1% y de embarazo clínico de 36,8% a 40,4% (32).

El establecimiento de los embarazos es la mejor evidencia de que los medios secuenciales soportaron bien el desarrollo de los embriones y la formación de blastocistos viables, en frecuencias perfectamente aceptables y mejores que los de la técnica alternativa que es el cocultivo (4).

Es evidente que existen numerosas ventajas de cultivar y transferir blastocistos:

1. Mayor tasa de implantación y mayor tasa de embarazo: se ha demostrado que la tasa de implantación con blastocistos desarrollados en medios secuenciales es mayor que con embriones transferidos en estadios más tempranos (17). Sólo dos blastocistos son necesarios para establecer tasas de embarazo mayores del 50%, y con esto, se disminuye el riesgo de embarazos múltiples. (17).
2. Criopreservación reducida: el cultivo y la transferencia de blastocistos está asociada con una disminución en el número de embriones a criopreservar, porque sólo se congelarían aquellos

embriones que demuestran ser competentes para llegar a blastocisto.

3. Donantes de ovocitos: en humanos se trabaja con parejas infértiles, en animales se trabaja con los fértiles, así que para realmente evaluar la eficiencia de la técnica hay que estudiar qué sucede con óvulos donados (aunque todavía existe el impacto del factor masculino). Así, en óvulos donados la tasa de formación de blastocistos reportada es del 70% (20% más alta que la observada para óvulos de pacientes), además la tasa de implantación es del 65%. En casos de óvulos donados es posible conseguir tasa de embarazo del 80%.
4. No necesidad de eclosión asistida (*assisted hatching*): la técnica de blastocistos permite que el embrión realice el proceso natural de eclosión o liberación de la zona pelúcida por sí solo, espontáneamente *in vitro*, sin la necesidad de recurrir a técnicas más invasivas, menos naturales y menos fisiológicas, como la eclosión asistida que utiliza rayos láser o medio Tyrode ácido.
5. Evaluación de la viabilidad del embrión antes de la transferencia: es posible identificar aquellos embriones con poco o ningún potencial de desarrollo, por su lento crecimiento, su degeneración en cultivo, y por la introducción de test no invasivos de potencial de desarrollo. Aunque también se ha propuesto que la orientación de los pronúcleos (polarización) y la velocidad del primer clivaje pueden ser usados para predecir cuáles embriones darán lugar a un embarazo (33), esto no ha podido ser verificado hasta ahora. Porque pocos genes habrían intervenido hasta ese primer clivaje, más bien estas dos características podrían ser marcadores de la calidad ovocitaria, sólo los marcadores después del estadio de 8 células servirían para evaluar el embrión. Inclusive se propone hacer la transferencia en estado de pronúcleos sin tomar en cuenta la sincronización con la ventana de la implantación (33).
6. Estrés metabólico reducido: el oviducto y útero proveen diferentes niveles de nutrientes para el desarrollo embrionario, lo que sugiere que hay distintos niveles de requerimiento para el embrión pre y poscompactación. Como el embrión humano no entra al útero hasta la compactación, se dice que la transferencia a estadios más tempranos representa un esfuerzo metabólico. Es evidente que embriones de estadios tempranos pueden

sobrevivir en el útero, como lo demuestran los embarazos por FIV convencionales, pero lo más obvio es la gran pérdida embrionaria asociada. El embrión humano es realmente muy flexible y se adapta para sobrevivir en este útero inapropiado, pero ésta no es la situación ideal. La transferencia de blastocistos es más fisiológica.

7. Oportunidad para realizar análisis al embrión: poder cultivar los embriones por dos o tres días más, aumenta el tiempo disponible para esperar los resultados de biopsia embrionaria en casos en que sea necesaria.
8. Biopsia de trofoectodermo: permite la introducción de la técnica de biopsia de trofoectodermo para la búsqueda de enfermedades genéticas, el trofoectodermo es material no embrionario y la muestra puede consistir en varias células.

Concluimos que en esta primera experiencia venezolana, las tres transferencias de blastocistos cultivados en medios secuenciales resultaron en embarazos clínicos (100%) con una tasa de implantación del 50%, aunque los números son pocos, los resultados son alentadores y corroboran lo obtenido hasta ahora en los proyectos de Gardner y Lane (17).

Los medios secuenciales soportaron bien el desarrollo de los embriones y la formación de blastocistos viables en frecuencias perfectamente aceptables y mejores que los de la técnica de cocultivo, mejoraron notablemente las tasas de embarazo y de implantación de la fecundación *in vitro*.

REFERENCIAS

1. Hasler JF, McCauley AD, Lathrop WF, Foote RH. Effects of donor-embryo recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer programme. *Theriogenology* 1987;27:139-168.
2. Menezo Y, Guerin JF, Czyba JC. Improvement of human early embryo development *in vitro* by co-culture on monolayers of Vero cells. *Biol Reprod* 1990;42:301-306.
3. Cobo AC, Minguez Y, Perez I, Romero J, Rubio C, Ruiz A. *El Laboratorio en Reproducción Asistida* 1998. 1ª edición. Instituto Valenciano de Fertilidad. Valencia, España.
4. Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M. Improved methods for blastocyst formation and culture. *Hum Reprod* 1998;13(Suppl 4):256-265.
5. Hardy K, Hooper MAK, Handyside AH. Non invasive

- measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1989;4:188-191.
6. Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rates in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 1985;44:493-498.
 7. Edwards RG. Test tube babies. *Nature* 1981;293:253-256.
 8. Conaghan J, Handyside AH, Winston RML, Leese HJ. Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro. *J Reprod Fertil* 1993;99:87-95
 9. Quinn P. Enhanced results in mouse and human embryo culture using a modified human tubal fluid medium lacking glucose and phosphate. *J Assisted Reprod Genet* 1995;12:97-105.
 10. Menke TM, McLaren A. Mouse blastocyst grown in vivo and in vitro: Carbon dioxide production and trophoblast outgrowth. *J Reprod Fertil* 1970;23:117-127.
 11. Gardner DK. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology* 1998;49:83-102.
 12. Gardner DK, Leese HJ. Concentrations of nutrients in mouse oviduct fluid and their effects on embryo development and metabolism in vitro. *J Reprod Fertil* 1990;88:361-368.
 13. Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the "Crabtree effect". *Mol Reprod Dev* 1991;30:105-111.
 14. Gardner DK, Lane M. The 2 cell block in CF1 mouse embryos is associated with an increase in glycolysis and a decrease in tricarboxylic acid (TCA) cycle activity: Alleviation of the 2 cell block is associated with the restoration of in vivo metabolic pathway activities. *Biol Reprod* 1993;49(Suppl 1):52.
 15. Gardner DK, Sakkas D. Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: Role of medium composition. *Hum Reprod* 1993;8:288-295.
 16. Lane M, Gardner DK. EDTA stimulates development of cleavage stage mouse embryos by inhibiting the glycolytic enzyme phosphoglycerate kinase. *Biol Reprod* 1997;57(Suppl 1):193.
 17. Gardner DK, Lane M. Culture viable human blastocyst in defined sequential serum-free medium 1998; *Hum Reprod* 1998;13(Suppl 3):148.
 18. Biggers JD, Gardner DK, Leese HJ. Control of carbohydrate metabolism in preimplantation mammalian embryos. En: Rosenblum IY, Heyner S, editores. *Growth factors in mammalian development*. Boca Raton, EE.UU.: CRC Press.; 1998.p.19-32.
 19. Leese HJ. Metabolism of the preimplantation mammalian embryo. *Ox Rev Reprod Biol* 1991;13:35-72.
 20. Rieger D. Relationship between energy metabolism and development of the early embryo. *Theriogenology* 1992;37:75-93.
 21. Gardner DK, Lane M. Alleviation of the "2-cell block" and development to the blastocyst of Cf1 mouse embryos: Role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 1996;11:2701-2712.
 22. Gardner DK, Lane MW, Lane M. Bovine blastocyst cell number is increased by culture with EDTA for the first 72 h of development the zygote. *Theriogenology* 1997;47:278.
 23. Gardner DK, Lane M. Embryo culture systems. En: Trounson A, Gardner DK, editores. *Handbook of in vitro fertilization*. Boca Raton, EE.UU.: CRC Press.; 1993.p.85-114.
 24. Miller JGO, Schultz GA. Aminoacid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract. *Biol Reprod* 1987;36:125-129.
 25. Moses DF, Matkovic M, Cabrera Fisher E, Martinez AG. Aminoacid contents of sheep oviductal and uterine fluids. *Theriogenology* 1997;47:336-338.
 26. Schultz GA, Kaye PL, McKay DJ, Johnson MH. Endogenous amino acids pool sizes in mouse eggs and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil* 1981;61:387-393.
 27. Van Winkle LJ. Aminoacid transport in developing animal oocytes and early conceptuses. *Biochim Biophys Acta* 1998;947:173-208.
 28. Bavister BD, McKiernan SH. Regulation of hamster embryo development in vitro by aminoacids. En: Bavister BD, editor. *Preimplantation Embryo Development*. New York, EE.UU.: Springer Verlag; 1993.p.57-72.
 29. Gardner DK, Lane M. Aminoacids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993c;48:337-385.
 30. Lane M, Gardner DK. Non-essential aminoacids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes in vitro. *J Assist Reprod Genet* 1997b;14:398-403
 31. Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability aminoacids. *J Reprod Fertil* 1997c;109:153-164.
 32. Motta ELA, Alegretti JR, Pico M, Sousa JW, Baracat EC, Serafini P. Blastocyst vs, cleaving embryo transfer: A prospective randomized trial. *Fertil Steril* 1998;70(Suppl 1):16.
 33. Edwards RG, Beard HK. Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocyst? *Hum Reprod* 1999;14:1-4.