

Consumo de Gás e Características Entre Dois Modelos de Incubadora de Embriões

Klaus E. Wiemer Ph.D

Northwest Center of Reproductive Sciences

12333 NE 130 Lane, Suite 220
Kirkland, WA 98033

Introdução e Contexto

A capacidade de cultivar oócitos e embriões em um ambiente precisamente controlado é de extrema importância. Um ambiente controlado possibilita aos oócitos completarem os aspectos finais da maturação do citoplasma e núcleo antes da inseminação convencional ou ICSI (Intracytoplasmic sperm injection). Oócitos que se encontram em Metáfase II são extremamente sensíveis a mudanças de temperatura e pH. Isto pode resultar em embriões anormais ou embriões deficientemente desenvolvidos. Especificamente, embriões resultantes desses oócitos estressados pelas condições do ambiente tendem a possuir blastômeros com baixa qualidade morfológica, lentas taxas de clivagem, assim como excessiva fragmentação. A incidência de multinucleação também pode aumentar. Embriões submetidos a ambientes desafiadores também tendem a apresentar menor taxa de desenvolvimento de blastocisto. Mesmo breves mudanças de temperatura e pH podem afetar negativamente o desenvolvimento embrionário subsequente.

O uso de incubadoras de baixa concentração de oxigênio está crescendo atualmente em várias clínicas e laboratórios de Reprodução Humana Assistida devido ao vantajoso ambiente fornecido para o desenvolvimento de embriões humanos. Embriões em ambiente natural (útero) normalmente são expostos a um ambiente de baixa concentração de oxigênio de 5%. A exposição à concentração atmosférica de oxigênio, que é 20%, tem chamado atenção por apresentar efeitos prejudiciais ao desenvolvimento de embriões cultivados in vitro e potencial aumento de aberrações cromossômicas. Porém, os primeiros estudos comparando os ambientes de concentração de gases eram na maioria das vezes inconclusivos. Em particular, isto ocorreu muito provavelmente devido ao uso de meios e sistemas de cultivo muito aquém do ideal. Atualmente, os sistemas de cultivo de embriões humanos são mais otimizados e enormes melhorias foram desenvolvidas nas formulações dos meios de cultura. Portanto, é possível encontrar muitas publicações

“Nós temos notado em nosso laboratório que embriões humanos cultivados em ambiente de 6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂ apresentam menores taxas de fragmentação e maiores taxas de desenvolvimento do blastocisto quando comparados a embriões irmãos cultivados em ambiente de 20% de O₂. Para realização desses estudos com oócitos irmãos, nós cultivamos embriões exclusivamente em ambientes de baixa concentração de oxigênio.”

“Na prática, isto significa que embriões cultivados em incubadoras convencionais são mais suscetíveis a baixas temperaturas por todo período de cultivo, antes da inseminação ou criopreservação. Essa exposição a baixas temperaturas assim como altas variações de temperatura podem levar a taxas reduzidas de desenvolvimento embrionário ou crescimento da incidência de embriões anormais.”

confirmando um melhor desenvolvimento de embriões em ambientes de baixa concentração de oxigênio. Nós temos notado em nosso laboratório que embriões humanos cultivados em ambiente de 6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂ apresentam menores taxas de fragmentação e maiores taxas de desenvolvimento do blastocisto quando comparados a embriões irmãos cultivados em ambiente de 20% de O₂. Para realização desses estudos com oócitos irmãos, nós cultivamos embriões exclusivamente em ambientes de baixa concentração de oxigênio.

Estudos de pH e Temperatura

É muito comum na grande maioria dos laboratórios de fertilização humana in vitro que a incubadora seja aberta muitas vezes ao dia. Embora as leituras dos displays nos façam acreditar que está tudo correto dentro da câmara, o fato é que a temperatura de incubação e o ambiente gasoso provavelmente não estabilizarão até o fim do dia de trabalho. As variações de temperatura são mais frequentes com as incubadoras de gás triplo padrão que dependem de gás nitrogênio para liberar o oxigênio dentro da câmara. Isto resulta em um grande volume de gás nitrogênio enchendo a câmara cada vez que a porta da incubadora é aberta. Experiência em nosso laboratório mostrou que a temperatura cai até 2 graus Celsius quando a incubadora é aberta mais que 3 vezes em um intervalo de tempo de 5 a 10 minutos. Além disso, o pH pode levar horas para estabilizar. Nós descobrimos no passado, que uma vez que o pH em um sistema de cultivo de micropartículas se tornasse alcalino devido às frequentes aberturas da incubadora, este poderia levar até 3 horas para que as partículas retornem ao pH de 7,3 a 7,35.

A Figura 1 descreve a duração de tempo necessária a um meio de cultivo de tecidos em placas abertas de 15 mm e 30 mm para voltar ao equilíbrio em uma incubadora de cultivo de tecido water jacketed convencional após exposição de 5 minutos às condições de ambiente atmosférico. Os pontos medidos foram os intervalos de tempo levados para que os níveis de pH voltem para 7,35 e 7,3 em ambas placas. Nós percebemos que o pH de 7,35 está no limite máximo que embriões humanos podem tolerar, porém preferiríamos cultivá-los a um ponto próximo de 7,3. Esse gráfico descreve que ambas as placas de cultivo de tecidos atingiram um pH de 7,35 entre 50 e 70 minutos. Entretanto, nenhuma placa alcançou o pH de 7,3 mesmo 200 minutos após a exposição de 5 minutos às condições de ambiente atmosférico. Para estes dados coletados, não foi utilizado o sistema de proteção com camada de óleo para ilustrar quanto um pequeno intervalo de tempo de exposição ao ambiente afeta o pH do meio, mas ainda mais importante, quanto tempo leva o mesmo meio para retornar a um nível fisiológico normal que contribui para o ótimo desenvolvimento embrionário. É verdade que um sistema de camada de óleo é menos vulnerável a variações de pH, mas ao mesmo tempo, a camada de óleo pode retardar os tempos de recuperação do equilíbrio. Em termos práticos, no entanto, isto significaria que as placas não atingiriam um pH de 7,3 até bem após o encerramento do expediente do laboratório. Então os embriões não alcançariam mais um pH ótimo até no final do dia ou da noite. Este nível de stress poderia levar a um significativo impacto no desenvolvimento embrionário subsequente.

Em contraste, os dados na Figura 2 retratam uma diferente história. Essa figura esboça o intervalo de tempo que os meios de cultura em placas abertas de 15 mm e 30 mm levam para atingir os níveis de pH de 7,35 e 7,3 após exposição de 5 minutos às condições de ambiente atmosférico em uma incubadora MINC. Novamente, a justificativa para uso de sistemas de cultivo abertos foi determinar quão rapidamente o valor normal do pH podia ser restabelecido. Nesse caso, as áreas de superfície da placa influenciaram no tempo de recuperação. O pH de 7,35 foi atingido na MINC depois de 37 minutos na placa de 30 mm em comparação a 54 minutos na placa de 15 mm. Esses dados ilustram que independente do tamanho da placa, o meio de cultura atingiu um pH de 7,35 pelo menos 20 minutos mais rápido que um modelo mais convencional de incubadora. O efeito do tipo de incubadora em função do tempo necessário para atingir um pH de 7,3 é bastante convincente. Independentemente do tamanho da placa, um pH de 7,3 foi obtido dentro de 90 minutos após exposição ao ambiente atmosférico. Este nível não foi alcançado na incubadora convencional nem mesmo após 200 minutos de incubação. A capacidade de retornar a um pH próximo ao qual embriões humanos são normalmente cultivados é um grande salto na melhoria dos sistemas de cultivo de embriões.

Se avaliarmos os dados na Figura 3, nós verificamos que com a MINC o tempo de recuperação da temperatura é muito mais rápido que uma incubadora convencional water jacketed de 100 litros. Esse gráfico descreve a taxa de recuperação de temperatura após remover uma placa contendo meio de cultura, posicioná-lo em um local aquecido por 5 minutos e retornar a placa para a respectiva incubadora. As placas de cultivo da MINC retornaram à temperatura de 37° C em menos de 20 minutos, enquanto a incubadora convencional ainda não tinha voltado a 37° C nem mesmo após 200 minutos. Na prática, isto significa que embriões cultivados em incubadoras convencionais são mais suscetíveis a baixas temperaturas por todo período de cultivo, antes da inseminação ou criopreservação. Essa exposição a baixas temperaturas assim como altas variações de temperatura podem levar a taxas reduzidas de desenvolvimento embrionário ou crescimento da incidência de embriões anormais.

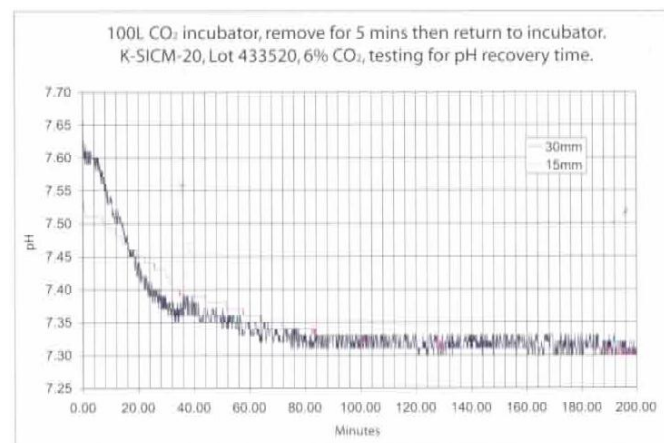


FIGURA 1

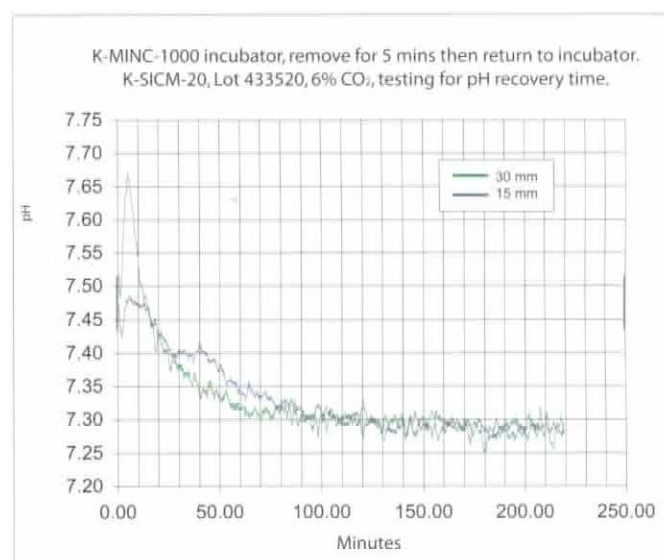


FIGURA 2

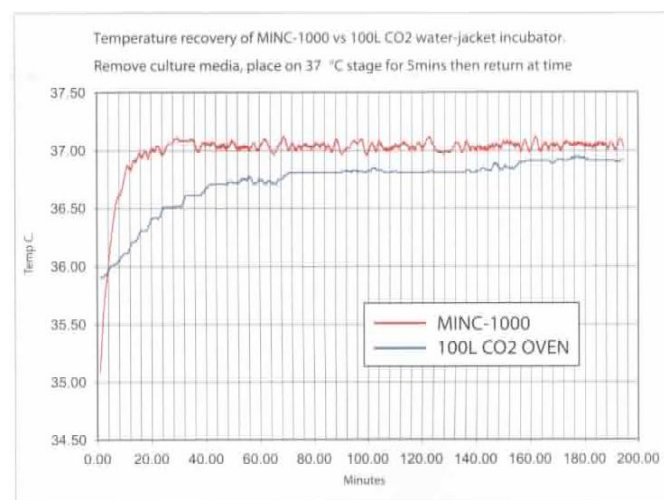


FIGURA 3

Consumo de Gás

Outro aspecto envolvendo a utilização de incubadoras convencionais de baixa concentração de oxigênio é a quantidade de gás nitrogênio consumida. Isto não apenas pode ser caro, mas pode introduzir outra variável de risco toda vez que o gás nitrogênio precisa ser trocado. Além disso, é recomendado que algum tipo de sistema de gases múltiplos seja incorporado de modo que os reservatórios de nitrogênio sejam trocados automaticamente quando o nível do reservatório estiver baixo. Sistemas de gases múltiplos continuariam ser recomendados mesmo se for usado gás de um reservatório de nitrogênio líquido de alta pressão. Uma alternativa a incubadoras convencionais desenvolvidas para cultivo de tecidos/células seria a utilização da nova incubadora da Cook recentemente atualizada. Esta incubadora é única por várias razões. Primeiramente, foi desenvolvida especificamente para cultivo de embriões. Isto significa que a temperatura estabiliza e retorna ao nível desejado muito mais rápido como apresentado nas informações e gráficos descritos acima. Em segundo, a quantidade de gás utilizado é muito menor e é fornecida como uma mistura de gases feita sob encomenda de 6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂. Devido aos resultados favoráveis que nós estávamos encontrando com nossa incubadora de gás triplo, mas desanimados pela quantidade de gases que estávamos consumindo, decidimos testar a incubadora MINC. Assim, decidimos comparar o uso de gás entre a incubadora de gás triplo Forma® e uma incubadora MINC no nosso centro. Este comparativo vem ocorrendo por aproximadamente 7 meses. Especificamente, nós comparamos os custos do reservatório de CO₂ e N₂ com a mistura de gases feita sob encomenda de 6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂.

Resultados e Conclusões

Nós estamos atualmente comparando o desenvolvimento de embriões entre as incubadoras MINC e Forma® e encontramos embriões de qualidade muito parecidos. Esperamos publicar nossos resultados em um futuro próximo. Entretanto, nós constatamos que há significativa economia de gás. Calculamos que uma única incubadora Forma® nos custa aproximadamente USD 2.411,00 por ano com os três gases em comparação com USD 930,00 com gases misturados sob encomenda para a incubadora MINC. Isto representa uma economia de aproximadamente USD 1.500,00 por incubadora. Além disso, nós descobrimos que um cilindro de gases misturados sob encomenda é suficiente para quase 3 meses. Acreditamos que isto reduz a introdução de importantes variáveis de risco tal como contaminação de gás. Antes de usar cada cilindro de gás misturado, nós realizamos testes de controle de qualidade tal como teste de pH, assim como análise biológica tais como sobrevivência de espermatozoides ou cultivo de embriões de ratos. Nós utilizamos também um filtro de carbono para remover do cilindro quaisquer possíveis compostos orgânicos voláteis. Ademais, achamos a MINC extremamente fácil de manter e limpar.

Outro aspecto importante a considerar é o número de pacientes que pode ser cultivado em uma única incubadora. Devido ao tamanho da incubadora Forma®, se acredita que poderia seguramente cultivar 4 a 5 pacientes por incubadora. Porém, isto não é verdade porque o ambiente de cultivo dentro da incubadora nunca se mantém estável por todo o período do dia devido às frequentes aberturas da câmara. Nós constatamos que se pode seguramente cultivar 3 paciente por Forma®. Na MINC, nós podemos rotineiramente cultivar 3 pacientes na incubadora apesar da considerável diferença de tamanho.

Em resumo, nós estamos extremamente satisfeitos pela qualidade do embrião gerado do cultivo na MINC, assim como a significativa economia no consumo de gás. O tamanho da incubadora oferece significativa flexibilidade na utilização em espaços reduzidos. A capacidade de reduzir a inserção de variáveis de riscos potenciais tal como risco contaminação de gás também é significativa